



HAL
open science

Médecine régénérative : apports de la thérapie cellulaire et de la bioingénierie

Stéphanie Anaïs Cohen

► **To cite this version:**

Stéphanie Anaïs Cohen. Médecine régénérative : apports de la thérapie cellulaire et de la bioingénierie. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03106711

HAL Id: dumas-03106711

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03106711>

Submitted on 12 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTE DE
PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 14 décembre 2020 à 13h

PAR

Madame Stéphanie Anaïs COHEN
Née le 30 décembre 1988 à Paris (75016)

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**« MEDECINE REGENERATIVE : APPORTS DE LA THERAPIE CELLULAIRE ET
DE LA BIOINGENIERIE »**

THESE ARTICLE

JURY :

Président : *Docteur Alain NICOLAY*, Laboratoire de Chimie analytique, Faculté de Pharmacie,
Marseille

Membres : *Docteur Véronique ANDRIEU*, Laboratoire de Pharmacie galénique,
Faculté de Pharmacie, Marseille

Professeur Florence ALLOUCHE GHRENASSIA, Professeur associé, Université
Paris Descartes

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE - CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
----------------------------------------------	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
----------------------------------------------------------------------	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---------------------------------------------------	----------------------------------------

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Remerciements

A Monsieur le Professeur Alain Nicolay,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail à la dernière minute. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Véronique Andrieu,

Je vous suis très reconnaissante de composer ce jury et d'avoir accepté d'encadrer mon travail. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre patience depuis mon arrivée à l'Université de Marseille. Vous trouverez ici l'expression de mon plus grand respect.

A Madame le Professeur Florence Allouche Ghrenassia,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, de m'avoir guidée et inspirée depuis notre première rencontre il y a déjà six ans. Je vous exprime ici ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Hélène Boucher-Pillet,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de relire ce travail, ainsi que pour ta disponibilité et ton expertise qui m'ont permis d'aboutir à ce mémoire, témoin de ma sincère reconnaissance.

A toi, mon frère Marc Kevin, pour tous tes « bon courage » nocturnes qui m'ont certes énervée mais qui m'ont donné l'envie de me battre et d'y arriver. Je te remercie pour ton aide pour cette thèse ainsi que pour toutes tes relectures de lettres de motivation, de cv, d'emails. Merci de m'avoir guidée avec ton parcours, et de m'avoir donné le courage d'avancer comme tu le fais tous les jours avec le sourire. Merci d'être mon meilleur ami et la personne avec qui je veux conquérir le monde. Je t'aime.

A l'amour de ma vie, ma maman, qui a su trouver les mots tous les jours, toutes les minutes, toutes les secondes. Tu m'as rassurée et tu as répondu à mes questions avec patience et amour. Il y a 11 ans tu m'as promis que je sortirai de cette pièce noire pour trouver la lumière. Cette lumière je l'ai trouvée et c'est toi me l'apporte tous les jours. Tu m'as donné l'ambition qui me nourrit et les armes qui font qui je suis. Ce manuscrit est ta thèse bien plus que la mienne, sans toi je n'aurais jamais su avancer. Je t'aime.

Mon papa, tu es mon rocher, mes fondations, ma force. Tu es le seul qui ait toujours cru en moi pour tout, dans les meilleures comme dans les pires situations. Merci pour ton amour, ton soutien, ton sourire, ta joie qui me permettent de vivre sereinement depuis le jour de ma naissance. Merci d'être mon copain de sport, de voyage et de vie. Tu es plus qu'un papa, tu es ma boussole. Je t'aime.

A ma mamie Mireille, pour qui je m'épuise au travail mais je te promets de venir te voir plus souvent et de t'apporter des billets de « théâtre » pour que tu puisses te divertir. Je t'ai découverte lors de ma première année de pharmacie en 2009/2010 et depuis je t'aime.

Papy Jean-Jacques et Brigitte, nous manque tous les jours.

A ma mamie Laetitia, pour qui je ne travaille certainement pas assez mais je te promets que je fais de mon mieux pour laisser mon papa tranquille. Tu as appris à me connaître et faire de moi ta petite fille. J'aime ça et je t'embrasse très fort. Comment ne pas mentionner Prosper avec ton caractère tranché et ta grande gentillesse, j'ai appris à te connaître ses dernières années et ça me fait plaisir.

A mon Oncle Yossi, je te remercie de croire en moi, et d'avoir fait attention à toi comme si j'étais ta propre fille. J'espère pouvoir te donner raison un jour. Nos discussions me manquent, même si je refuse d'en dire trop. Je t'adore et je te fais des gros bisous.

A toi, Yohan, mon boubou, à nos fous rires, nos conversations nocturnes sans fin et nos délires tellement personnels. Je vais te faire un calin et te serrer très fort. Je prépare la bouteille de champagne que l'on ne boira pas dans le couloir. J'aurais aimé que tu sois là mais tu m'as trompée... Le temps passe mais les souvenirs restent.

A toi, Alexis, qui m'accompagne tous les jours depuis plus d'un an et qui m'as supporté dans les hauts comme dans les bas de la rédaction de cette fameuse thèse. Ça y est j'y suis arrivé, merci de m'avoir soutenu tous ce temps, d'avoir pris le temps de me consoler, de me regarder travailler et de me voir m'énervée. Il est temps qu'on rigole, qu'on voyage, qu'on s'amuse ensemble, j'ai hâte de faire tout ça avec toi.

A toi, Delphine, une rencontre inattendue mais ça fait du bien de savoir que je sais que tu sais que je sais. Objectif Larry A. ne l'oublie jamais. Le monde nous attend.

A vous, Johanna, Liv et Lital, Tata est folle et le restera. J'espère que c'est le début d'une belle et grande aventure.

A ma famille Tahitienne, Jo (et son club détente et perspective), Ysabelle (ma copine de concert qui a su me supporter et me nourrir tout ce temps), Raphael (mon élève préféré, que j'ai pu martyriser pour la bonne cause) et Dydy (ça me manque d'être ta Barbie) grace à qui j'ai pu réaliser mon rêve.

To Sean, for all our movie nights with all the candies we used to share. Mommy misses her daddy.

A Laurie et tes brioches, j'ai pu la passer avant toi et je te souhaite le meilleur pour ta dernière ligne droite.

A Léa, aux Blatas et tout le groupe 4.

Merci à tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la rédaction de cette thèse, aboutissement de mes études et départ d'une excitante et belle vie. J'ai hâte et je suis prête.

Table des matières

Introduction.....	16
I. Thérapie cellulaire ou comment soigner durablement avec des cellules ?	17
1. Thérapie cellulaire : Définition	17
2. Cellules souches	20
a. Cellules souches embryonnaires (CSE)	23
b. Cellules souches des annexes embryonnaires	29
c. Cellules souches adultes	32
d. Cellules souches pluripotentes induites (iPS : induced Pluripotent Stem cells)	58
e. Utilisation des cellules souches : Réglementations	64
f. Conclusion	66
3. Les défis de la thérapie cellulaire.....	68
a. Identification de la pathologie	68
b. Assurance d'un traitement sur le long terme :	68
c. Innocuités des produits cellulaires administrés :	68
d. Assurer une bonne vascularisation des tissus :	68
e. Localisation de la zone à greffer :	68
f. Les cellules vont-elles survivre et proliférer ?	68
4. Risques et dangers de l'utilisation des produits cellulaire.....	69
5. Perspectives d'évolution de la thérapie cellulaire.....	70
6. Réglementations concernant l'utilisation et le développement des produits de thérapie cellulaire	71
II. Ingénierie tissulaire	74
1. Définition.....	74
2. Cellules	75
a. Cellules souches embryonnaires	76
b. Cellules souches pluripotentes induites.....	77
c. Cellules souches adultes	78
3. Biomatériaux	78
a. Polymères	79
b. Biomatériaux inorganiques	80
c. Biomatériaux hybrides organique-inorganique	81
d. Modification des supports de polymères	81
e. Biomatériaux intelligents	85
f. Propriétés physico-chimiques & biologiques modulables	87
4. Technologie d'imagerie	89
5. Techniques d'ingénierie tissulaire	89
a. Effets et modulations de la topographie des tissus.....	90
b. Cultures cellulaires en 2 dimensions.....	91
c. Techniques de fabrication des supports en 3 dimensions.....	93
d. Techniques de bio fabrication pour la médecine régénérative.....	97
6. Néovascularisation des tissus	100
7. Bioréacteurs.....	100
8. Structures	101
a. Scaffold/ Support.....	101

b.	Ingénierie d'organes entiers.....	104
c.	Organoïdes et sphéroïdes.....	105
d.	Organ-on-chip ou Body-on-chip	107
e.	Surface intelligente	108
9.	Objectifs	110
10.	Devenir de l'ingénierie tissulaire	111
III. Médecine régénérative		112
1.	Définition.....	112
2.	Domaines d'applications cliniques.....	112
a.	Appareil urinaire : vessie	112
b.	Appareil respiratoire : trachée	115
c.	Appareil circulatoire : vaisseaux.....	116
d.	Appareil visuel : la cornée	117
e.	Appareil rénal : rein	119
f.	Conclusion	128
3.	Évolution et perspectives	129
b.	Marché de la médecine régénérative en 2020.....	135
4.	Dispositif d'aide et de soutien au développement de médicament de thérapie innovante :	137
Discussion		139

Tables des Figures

FIGURE 1 CLASSIFICATION PHYSIOLOGIQUES DES CELLULES AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET DE LA VIE DE L'HOMME (MAGALON ET AL. 2018).....	22
FIGURE 3 POTENTIELS DE DIFFERENCIATION DES CSE ET PAR EXTENSION LEUR POTENTIEL THERAPEUTIQUE (K. SCHWARTZ 2011) 28	
FIGURE 4 UTILISATION POTENTIELLE DES CSEH COMME PRODUIT DE THERAPIE CELLULAIRE A DES FINS DE MEDECINE REGENERATIVE (K. SCHWARTZ 2011)	28
FIGURE 5 CLASSIFICATION DES CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES (« STEM CELL RESEARCH » S. D.).....	33
FIGURE 6 POTENTIEL DE DIFFERENCIATION DES CSM (UCCELLI, MORETTA, ET PISTOIA 2008)	36
FIGURE 7 RESUME DES MECANISMES DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	37
FIGURE 8 AVANTAGES DE L'UTILISATION DES CSM EN THERAPEUTIQUE (HMADCHA ET AL. 2020)	39
FIGURE 9 PROTOCOLE D'ETUDES IN VITRO :.....	40
FIGURE 10 PRECONDITIONNEMENT DES CSM (FERREIRA ET AL. 2018)	43
FIGURE 11 MODELE DE MIGRATION DES CSM INDUITE PAR LES CHIMIO-ATTRACTEURS VERS UNE LESION TUMORALE (HMADCHA ET AL. 2020)	46
FIGURE 12 LES EFFETS PROS ET ANTIS TUMORAUX DES CSM (HMADCHA ET AL. 2020)	46
FIGURE 13 VUE D'ENSEMBLE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES ET DES MARQUEURS SPECIFIQUES AUX LIGNEES (« HEMATOPOIETIC STEM CELL DIFFERENTIATION PATHWAYS & LINEAGE-SPECIFIC MARKERS » S. D.).....	47
FIGURE 14 METHODE DE MOBILISATION PAR DES FACTEURS DE STIMULATIONS DES COLONIES DE GRANULOCYTE G-CSF (RICHMAN, WEINER, ET YANKEE 1976)	48
FIGURE 15 VUE D'ENSEMBLE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES ET DES MARQUEURS SPECIFIQUES AUX LIGNEES (« NEURAL STEM CELL DIFFERENTIATION PATHWAYS & LINEAGE-SPECIFIC MARKERS » S. D.).....	52
FIGURE 16 TRANSDIFFERENCIATION DIRECTE TRIDIMENSIONNELLE INDUITE PAR LA CULTURE (TANG, YU, ET CHENG 2017).....	53
FIGURE 17 PRINCIPE DE LA REPROGRAMMATION DE CELLULES SOMATIQUES ADULTES (STADTFELD ET AL. 2008)	59
FIGURE 18 PROTOCOLES DE REPROGRAMMATION (AZZOUNA ET CHOUCANE 2011).....	61
FIGURE 19 GENERATION DE NEURONES DOPAMINERGIQUES FONCTIONNELS A PARTIR DE LA REPROGRAMMATION DE FIBROBLASTES PAR DES NANOPARTICULES DE SILICE MESOPOREUSE NON VIRALES (CHANG ET AL. 2018)	61
FIGURE 20 REPROGRAMMATION DIRECTE DES FIBROBLASTES EN CARDIOMYOCYTES FONCTIONNELS (IEDA ET AL. 2010).....	62
FIGURE 21 PROJET DE LOI DE BIOETHIQUE 2020 APPROUVE PAR LE SENAT	65
FIGURE 22 PAYSAGE INTERNATIONAL DU MARCHE DE LA THERAPIE CELLULAIRE (SANTE 2030, LEEM).....	70
FIGURE 23 PARADIGME DE L'INGENIERIE TISSULAIRE, TROIS DOMAINES EFFICIENTS A EUX SEULS SE COMBINENT POUR CREER UNE SYNERGIE (KLIMEK ET GINALSKA 2020)	74
FIGURE 24 COMPOSANTS NECESSAIRE AU DEVELOPPEMENT DE L'INGENIERIE TISSULAIRE (CHANDRA, SOKER, ET ATALA 2020).....	75
FIGURE 25 ILLUSTRATION D'APPROCHES DE DISSIMULATION DES ILOTS VIS A VIS DU SYSTEME IMMUNITAIRE (PRIMAVERA ET AL. 2020)	77
FIGURE 26 PARAMETRES D'OPTIMISATION ET PROPRIETES D'UN BIO MATERIEL IDEAL	79
FIGURE 27 MECANISMES D'ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE (GOONOO ET BHAW-LUXIMON 2019)	83
FIGURE 28 BIOMATERIAUX INTELLIGENTS ET LEURS APPLICATIONS MEDICALES	86
FIGURE 29 ILLUSTRATION LES DIFFERENTES PROPRIETES D'UN SUBSTRAT QUI INFLUENCENT LE COMPORTEMENT CELLULAIRE (RIZWAN ET AL. 2019)	89
FIGURE 30 DIFFERENCES DE DONNEES EN FONCTION DU NOMBRE DE DIMENSION	90
FIGURE 31 UTILISATION DES SPHEROÏDES CELLULAIRES, DE L'ETUDE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES FONDAMENTAUX A L'INGENIERIE TISSULAIRE (CHANDRA, SOKER, ET ATALA 2020)	106
FIGURE 32 SOURCES CELLULAIRES ET METHODES UTILISEES POUR GENERER DES ORGANOÏDES (CHANDRA, SOKER, ET ATALA 2020)	106
FIGURE 33 BODY-ON-CHIP (HUH, HAMILTON, ET INGBER 2011).....	107
FIGURE 34 ANATOMIE RENALE COUPE TRANSVERSALE (FRANCE REIN S. D.)	120
FIGURE 35 MARCHE DE LA MEDECINE REGENERATIVE (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS 2019).	136

Table des Tableaux

TABLEAU I CLASSIFICATION DES PRODUITS DE THERAPIE CELLULAIRE	18
TABLEAU II DIFFERENTS TYPES DE SOURCES DE CELLULES SOUCHES (LES ENTREPRISES DU MEDICAMENT 2010)	22
TABLEAU III SOURCES DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES	24
TABLEAU IV DESCRIPTION DES CELLULES SOUCHES AMNIOTIQUES(De COPPI ET ATALA 2019)	31
TABLEAU V IDENTIFICATION DE TROIS GROUPES DISTINCTS DE CELLULES SOUCHES ADULTES EN FONCTION DE LEUR DEGRE DE SPECIALISATION ET LEUR CAPACITE DE RENOUVELEMENT	32
TABLEAU VII MARQUEURS DE SURFACE PERMETTANT LA CARACTERISATION DES CSH (SHIZURU, NEGRIN, ET WEISSMAN 2005) ..	49
TABLEAU VIII DIFFERENTS TYPES DE GREFFES DE CSH	50
TABLEAU IX UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES CSN	55
TABLEAU X DIFFERENTES METHODES DE REPROGRAMMATION ET DE LEURS CARACTERISTIQUES (BOUCHER 2015)	60
TABLEAU XI RESUME DES CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES UTILISABLES POUR LA RECHERCHE (HERBERTS, KWA, ET HERMSEN 2011)	67
TABLEAU XII REGLEMENTATIONS EN VIGUEUR POUR LES PTC, MTI ET MTI-PP	71
TABLEAU XIII IMPACT DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS	85
TABLEAU XIV TECHNIQUES DE FABRICATION DES CULTURES CELLULAIRES A 2 DIMENSIONS (MAGHSOUDI ET AL. 2017; JENKINS ET LITTLE 2019; PASIRAYI ET AL. 2011).....	92
TABLEAU XV TECHNIQUES DE FABRICATION DES DES SUPPORTS	94
TABLEAU XVI LES DIFFERENTES INSUFFISANCES RENALES	119
TABLEAU XVII THERAPIES DE COMPENSATION DE LA FONCTION RENALE	121
TABLEAU XVIII LES ENJEUX DE LA MEDECINE REGENERATIVE	129
TABLEAU XIX THERAPEUTIQUES AYANT BENEFICIE DE PROTOCOLES ACCELERES	135
TABLEAU XX NOMBRES D'ESSAIS CLINIQUE UTILISANT LE MEDECINE REGENERATIVE (ALLIANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE 2019)	136

Glossaire

ABM : Agence De La Biomédecine
ACT : Advanced Cell Technology
AMM : Autorisation De Mise Sur Le Marché
AMP : Aide Médicale à La Procréation
ANR : Agence Nationale De La Recherche
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits De Santé
ATU : Autorisation Temporaire D'utilisation
bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor ou Facteur De Croissance Basique Des Fibroblastes
BMP : Protéines Morphogénétiques Osseuses
BPF : Bonnes Pratiques De Fabrication
BPI : Banque Publique d'investissement
CAT: Committee for Advanced Therapy
Cellule NK : cellule Natural killer
CHMP ; comité des médicaments à usage humain
CNAM : Caisse nationale d'assurance maladie
CNRC : Comité national de recherche clinique
Combined ATMP: Médicament Combiné De Thérapie Innovante
CPN : Cellule Progénitrice Neurale
CSAD : Cellule Souche Mésoenchymateuse Du Tissu Adipeux
CSE : Cellule Souche Embryonnaire
CSEh : Cellule Souche Embryonnaire humaine
CSEm : Cellule Souche Embryonnaire murine
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSM : Cellule Souche Mésoenchymateuse
CSM-MB : Cellule Souche Mésoenchymateuse de la Moelle Osseuse
CSSP : Cellule Souche De Sang Périphérique
CSU : Cellule Souche Unipotente
DAR : Dispositif d'assistance Rénale
dMEC : Matrice Extracellulaire Décellularisée
DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Media
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée À L'âge
DPI : Diagnostic Préimplantatoire
ECC : Cellule Embryonnaire Carcinomique
EFS : Établissement Français du Sang
EGC : Cellule Embryonnaire Germinale
EGF : Facteur De Croissance Épidermique
EMA : European Medicines Agency
EpiSC : Cellule Souche Épiblastique
EPO : Érythropoïétine Humaine Recombinante
EPR : Épithélium Pigmentaire De La Rétine
ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FDA: Food and Drug Administration
FGF-2 : Facteur de croissance homéostatique des fibroblastes
FIV : Fécondation In Vitro
GEE : Groupement Européen d'éthique Des Sciences et Des Nouvelles Technologies

GTCM: Germ cell tumour marker
GTMP : Médicament De Thérapie Génique
GVHD : Graft versus Host Disease : Maladie Du Greffon Contre L'hôte
GVT : Graft Versus Tumor : réaction du greffon contre la tumeur
HE4 : Anticorps De La Protéine De L'épididyme Humain 4
Inserm : Institut National de la Santé et de La Recherche Médicale
iPS : Induced Pluripotent Stem Cells ou Cellule Souche Pluripotente Induite
IRA : Insuffisance Rénale Aigue
IRC : Insuffisance Rénale Chronique
IVG : Interruption Volontaire De Grossesse
MCI : Masse Cellulaire Interne
MEC : Matrice Extracellulaire
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
MTI-PP : Médicaments De Thérapie Innovante Préparés Ponctuellement
OCDE : Organisation De Coopération et De Développement Économiques
OMS : Organisation mondiale de la santé
P-collagène : collagène de type I polymérisé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor
PEG : Polyéthylène-Glycol
PGC : Cellule Germinale Primordiale
PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PIP : Plan D'investigation Pédiatrique
PIPAAm : Poly (N-isopropyl acrylamide)
PLGA : Acide Polylactique-Co-Glycolique
PLLA: Acide Polylactique
PMDA: The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
PRIME : PRiority Médecine
PRT : Programme de Recherche Translationnelle
PTC : Produit De Thérapie Cellulaire
RBA : Risk Based Approach
RMAT: Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation
RT : Reverse Transcriptase
SCI : Spinal Cord Injury : lésion de la moelle épinière
SCID : Immunodéficiences combinées sévères
SCNT : Transfert Nucléaire Somatique
sCTMP : Médicament de Thérapie Cellulaire Somatique
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC : Système nerveux central
SRBCE : Système Bio Artificiel De Cellules Épithéliales Rénales
SSEA: Stage-Specific Embryonic Antigen
TEP : Médicament issu de l'ingénierie tissulaire et cellulaire
TERT : Télomérase Reverse Transcriptase
TRA-1-81 : Tumeur rejection antigen
USD : Dollar Américain
VEGF : Facteur De Croissance Endothélial Vasculaire

Introduction

La médecine régénérative est un domaine interdisciplinaire émergent qui vise à remplacer ou à régénérer des cellules, des tissus ou des organes humains afin de restaurer ou d'établir des fonctions normales. Ces thérapies en développement apportent de grands espoirs aux patients atteints de pathologie souvent lourde et avec très peu de réponse thérapeutique. Le concept de régénération vient alimenter les possibilités de réparation de l'homme qui a permis de titrer dans l'album rétrospectif, 1973-2003, du quotidien *Libération* : « Le nouvel être humain. Pièce par pièce la technologie remplace les organes défaillants. » Mais la « médecine régénérative » fait mieux que remplacer, elle « régénère ». En effet, elle ne rapporte pas une pièce neuve pour remplacer une pièce défectueuse, elle permet une « régénération » de l'organe déficient, comme la régénération du foie de Prométhée. Les thèmes mythiques du langage de la « médecine régénérative » sont des thèmes ontologiques. Ils concernent la création, la mortalité, la connaissance, l'acquisition d'un savoir technique nécessaire à la survie de l'homme, la régénération. Le langage de la « médecine régénérative » renvoie au mythe fondateur de la création de l'homme par les dieux (Dosquet 2010).

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la situation des thérapies cellulaires en 2020. En réalisant une description approfondie des cellules utilisées, nous avons mis en lumière les recherches et les thérapeutiques innovantes. Puis avec pour objectif de comprendre la complexité de l'environnement de développement, nous avons détaillé les défis, les risques et les réglementations auxquels la thérapie et ses acteurs font face. Enfin, nous avons complété cette première partie avec les perspectives d'évolution du marché de la thérapie cellulaire.

Dans la seconde partie, nous nous sommes consacrés à la description des cellules, des biomatériaux, des technologies d'imagerie, et des techniques disponibles à l'élaboration de produit d'ingénierie tissulaire. Puis, dans le but de comprendre la complexité du développement, nous avons détaillé l'ensemble des structures à disposition des laboratoires et des chercheurs pour développer des thérapies d'ingénierie tissulaire et de médecine régénérative.

La promesse d'une remarquable performance a fortement attiré l'attention sur ces nouvelles thérapies, mais qu'en est-il de leurs applications cliniques ? Dans cette troisième partie, nous avons abordés certains des domaines d'applications de la médecine régénérative. L'objectifs de cette étude est donc de définir les bases expérimentales de chaque domaine afin de mieux appréhender les résultats des essais cliniques. Outre les applications, l'identifications des leviers d'évolutions économiques et réglementaires, nous semblait essentiel d'être mis en exergue.

Les avancées de médecine régénérative sont potentialisées par la synergie entre la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire et la thérapie génique. L'objectif est de soigner durablement les patients. Nous verrons que les recherches ont pu prouver le concept et que nous sommes à l'aube de l'émergence de nombreuses thérapeutiques. De plus en plus de thérapies sont autorisées et commercialisées mais pour répondre à la demande il faudra changer d'échelle et produire industriellement.

I. Thérapie cellulaire ou comment soigner durablement avec des cellules ?

Au cours de l'évolution, la capacité de réparation des organes et tissus s'est perdue pour laisser place à la simple cicatrisation de ces derniers. La salamandre, petit amphibien vertébré, a la plus forte capacité de régénération (queue, mâchoires, pattes ainsi qu'une partie de l'œil et du cœur). Lorsqu'une patte est amputée, la réparation s'effectue grâce aux cellules souches qui ont gardées la mémoire tissulaire de la patte amputée. Lors d'un processus de 40 jours, la patte se régénère en 3 phases :

1. Cicatrisation
2. Formation d'un bourgeon de cellules indifférenciées
3. Différenciation des cellules formant une structure 3D

La médecine régénérative, notamment *via* la thérapie cellulaire vise à retrouver cette fonction de réparation qui a disparue au cours de l'évolution.

La thérapie cellulaire est déjà utilisée :

- En cancérologie : pour les hémopathies malignes, on utilise les cellules souches hématopoïétiques pour régénérer une hématopoïèse fonctionnelle suite à une chimiothérapie.
- En greffe de peau : génération d'un épiderme fonctionnel pour les grands brûlés
- Endocrinologie : cas de greffes d'îlots de Langerhans qui sont injectés par la veine porte puis bloqués dans les vaisseaux hépatiques. C'est un produit cellulaire à finalité thérapeutique autorisé par l'Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)(Haute Autorité de Santé 2020).

La thérapie cellulaire s'étend également à d'autres applications de façon expérimentale :

- Infectiologie : dans le cadre de patient VIH positif sous anti rétroviraux, ne pouvant pas renouveler leur stock de lymphocyte T CD4+, on pourrait envisager des cellules dont les récepteurs TCR sont génétiquement modifiés. Une modification de ce récepteur permettrait de limiter voir de supprimer la pénétration du virus dans la cellule et permettrait d'envisager un arrêt des trithérapies.
- Cardiopathies : une première approche consistait à traiter l'insuffisance cardiaque, sans réponses aux thérapies habituelles, avec un patch de cellules souches de muscle squelettique régénérant le muscle cardiaque. Un deuxième essai clinique (ESCORT) a été réalisé, avec des progéniteurs cardiaques différenciés à partir de cellules souches embryonnaires (Desgres et Menasché 2019).
- Maladies neurodégénératives : des greffes de cellules souches neurales ont été réalisées chez les modèles animaux pour la maladie de parkinson, ce qui a permis d'augmenter le taux de dopamine dans le cerveau.
- Déficiences hépatiques, cirrhose et fibrose : pour les patients souffrant d'insuffisance hépatocellulaire aigue, une greffe d'hépatocytes encapsulés peut être envisageables.
- Greffe de cartilage : amplification des chondrocytes suivie d'une greffe afin d'enrichir la matrice cartilagineuse.

1. Thérapie cellulaire : Définition

La thérapie cellulaire est un ensemble de techniques qui **préviennent ou traitent** des pathologies par l'administration de cellules vivantes qui :

- remplacent des cellules déficientes ou absentes
- permettent de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie *via* l'action métabolique, trophique, immunologique ou pharmacologique des cellules ou des tissus. Dans ces situations les cellules ne sont pas toujours utilisées pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le donneur et chez le receveur.

Elle trouve ses principaux domaines d'application en médecine régénérative, oncologie et immunothérapie. Tout comme la thérapie génique, protéique et vaccinale, la thérapie cellulaire appartient à la **classe des biothérapies**. C'est un type de traitement novateur qui se démocratise progressivement grâce à une automatisation des processus de production permettant une réduction importante des coûts.

Le premier concept de thérapie cellulaire avait comme premier objectif de **réparer des fonctions organiques *in situ*** par un transfert *in vivo* de cellules vivantes qui peuvent ou non être traitées *in vitro* au préalable.

Depuis 2007, le concept de guérison ou de traitement *via* la thérapie cellulaire a évolué, on ne parle plus seulement de **préparation de thérapie cellulaire (PTC)** mais de **médicaments de thérapie innovante (MTI)**.

Les PTC ne sont pas modifiées de façon substantielle et sont destinées à être utilisées pour la même fonction essentielle chez le donneur et le receveur.

Un médicament est considéré comme une thérapie innovante s'il subit des modifications substantielles ou si sa fonction essentielle n'est pas la même chez le donneur et le receveur.

Le règlement ne décrit pas les modifications substantielles, il liste uniquement des **manipulations qui ne sont pas considérées comme substantielles** comme :

- 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.

Une modification est considérée comme substantielle si elle entraîne « une modification des propriétés biologiques initiales des cellules ou du tissu » selon l'Annexe I de la directive 2001/83/CE. On peut citer comme **modifications substantielles** :

- la culture cellulaire *ex vivo* (amplification)
- la transfection de gène d'intérêt dans des cellules
- la digestion enzymatique
- une succession de modifications, chacune non substantielle, peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés de cellules / tissu et constituer au final une modification substantielle.

Ces cellules utilisées ont été choisies, multipliées et modifiées *ex vivo* selon 5 étapes majeures :

1. Prélèvement : celui-ci peut s'effectuer sur un sujet donneur (traitement allogénique) ou sur le patient lui-même (traitement autologue).
2. Purification : elle permet de sélectionner un type cellulaire spécifique
3. Modification substantielle des cellules pour les MTI ou sans modification pour les PTC
4. Amplification des cellules
5. Réimplantation des cellules au niveau du site d'action

Tableau I Classification des produits de thérapie cellulaire

Au sein même des MTI plusieurs catégories sont définies, ce qui permet de réglementer spécifiquement tous les types de produits en fonction des modifications effectuées. Par exemple, il y a des MTI de TC et d'ingénierie tissulaire qui sont les mêmes produits mais qui n'ont la même finalité thérapeutique. Cette modification va donner une fonction précise à ces cellules (cas des corrections d'anomalies génétiques). On peut prendre l'exemple d'un traitement d'immunothérapie avec des lymphocytes cytotoxiques utilisés dans le traitement de pathologies infectieuses :

→ Les lymphocytes CD8+ sanguins spécifiques d'un antigène et isolé par la technique des streptamères sont considérés comme une PTC.

*→ Lymphocytes CD8+ isolés par tri des cellules produisant de l'IFN γ après activation *ex vivo* sont des MTI.*

PTC	Pas modifiées de façon substantielle et destinées à être utilisées pour la même fonction essentielle chez le donneur et le receveur		
MTI	- subit des modifications substantielles Ou - si sa fonction essentielle n'est pas la même chez le donneur et le receveur	Médicament issu de l'ingénierie tissulaire et cellulaire (TEP)	<ul style="list-style-type: none"> - contient ou est constitué de cellules ou de tissus modifiés, et - est présenté comme ayant des propriétés ou est utilisé ou administré à des êtres humains en vue de régénérer, de réparer ou de remplacer un tissu humain. <p>Exemples : Chondrocelect®, Maci®, Holoclar®, Spherox® et Alofisel®</p> <p>Produit d'ingénierie tissulaire : 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</p> <ul style="list-style-type: none"> → Origine humaine, animale ou les deux → Peut contenir des cellules ou tissus viables ou non viables, mais pas uniquement → Peut contenir des substances supplémentaires (biomolécules, biomatériaux...) <p>Un produit qui répond à la fois à la définition de "produit issu de l'ingénierie tissulaire" et à celle de "médicament de thérapie cellulaire somatique" est un produit issu de l'ingénierie tissulaire.</p>
		Médicament de thérapie cellulaire somatique (sCTMP)	<ul style="list-style-type: none"> - contient ou est constitué de cellules ou de tissus qui ont fait l'objet de manipulations importantes de sorte que les caractéristiques biologiques, les fonctions physiologiques ou les propriétés structurales pertinentes pour l'utilisation clinique prévue ont été modifiées, ou de cellules ou de tissus qui ne sont pas destinés à la (les) même (s) fonction (s) essentielle (s) chez le receveur et le donneur ; - est présenté comme ayant des propriétés ou est utilisé ou administré à des êtres humains en vue de traiter, prévenir ou diagnostiquer une maladie par l'action pharmacologique, immunologique ou métabolique de ses cellules ou tissus <p>Exemples : Provence® et Zalmoxis®</p>
		Médicament de thérapie génique (GTMP)	<ul style="list-style-type: none"> - contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré à des êtres humains en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ; - son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acide nucléique recombinante qu'il contient, ou au produit de l'expression génique de cette séquence. <p>Le règlement 2007/1394 tranche : 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.</p> <p>Exemples : Glybera®, Imlygic®, Strimvelis®, Kymriah® et Yescarta®</p>
		Médicament combiné de thérapie innovante (Combined ATMP)	<ul style="list-style-type: none"> - doit incorporer, en tant que partie intégrante du produit, un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la directive 93/42/CEE ou un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs au sens de l'article 1 (2) (c) de la Directive 90/385/CEE, et - sa partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables, ou - sa partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'agir sur le corps humain avec une action qui peut être considérée comme primaire par rapport à celle des dispositifs visés.
MTI-PP	<p>MTI expérimentaux préparé de façon ponctuelle à l'attention d'un patient déterminé</p> <p>Limites du statut MTI-PP : Ces produits doivent : être préparés de façon ponctuelle selon des normes de qualité spécifiques et utilisés au sein du même État membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé</p> <p>Exemple : Essai clinique ponctuel et précoce sur un petit nombre de patients</p>		

2. Cellules souches

L'unité de travail de la thérapie cellulaire est **la cellule**, en particulier les différentes cellules souches puisque :

- Elles offrent la possibilité d'un auto-renouvellement (à des degrés plus ou moins important en fonction du type de CS)
- Elles ont une capacité de différenciation en une ou plusieurs lignées
- Elles ont des capacités de prolifération dépendantes de leur fonction, certaines prolifèrent très peu car le tissu cible n'a pas besoin d'être renouvelé fréquemment (tissu cérébral) et certaines prolifèrent beaucoup car le tissu cible est renouvelé fréquemment (la peau).

Le type de cellules souches sélectionné dépendra de la pathologie en question et du domaine d'application. Dans le cas des maladies rétinienne (DMLA, rétinite pigmentaire), on utilise des cellules limbiques ou rétinienne issues de la différenciation de cellules souches embryonnaires.

Les cellules souches adultes sont à la **base de tous les organes et tissus** de notre corps. Ainsi le réservoir initial de cellules souches formé après la fécondation permet la création de cellules hautement spécialisées. Tout au long de notre vie, ces cellules souches permettront de remplacer les tissus lésés et les cellules perdues chaque jour (comme celles de notre peau, de nos cheveux, de notre sang et de la paroi de notre intestin). Ces cellules répondent donc aux besoins de l'organisme en nouvelles cellules dans le cadre d'un renouvellement physiologique (on parle d'homéostasie cellulaire ou tissulaire) ou pathologique.

Une cellule souche est une cellule **indifférenciée, immature**. Elles ont 2 propriétés essentielles :

- **Capacité d'auto-renouvellement** : division « à l'infini » physiologique et non pathologique à l'identique.
- **Capacité de différenciation** : elles donnent naissance à des cellules matures différenciées qui composent nos organes et nos tissus.

Les CSE ne peuvent pas être identifiées par leurs caractéristiques morphologiques, contrairement aux autres cellules souches. On peut identifier les cellules souches par leurs marqueurs de surface mais on privilégiera les marqueurs de pluripotence par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Au stade morula, il y a des cellules souches pluripotentes dans tout l'organisme. En fonction des conditions physiologiques, du stade de développement, des besoins de l'organisme, ces cellules vont soit :

- S'auto-renouveler afin de conserver un stock de cellules souches
- Se différencier afin de donner le tissu d'intérêt

Cette différenciation cellulaire se fait à la suite de signaux de 3 types :

- Signaux internes : expression de certains gènes
- Signaux externes : contact physique de cellules
- Signaux moléculaires

Tableau I Classification des cellules en fonctions de leurs potentiels de prolifération : ensemble des cellules humaines présentes au sein d'un organisme humain (à l'exception des iPS)

Cellules souches		Cellules souches pluripotentes induites		Cellules différenciées	
<p>Des cellules qui ont à la fois la capacité de s'auto-renouveler (fabriquer plus de cellules souches par division cellulaire) et de se différencier en cellules matures et spécialisées.</p> <p>Lors de leur division, les CS peuvent se diviser de 3 façons différentes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 division donne 2 cellules filles identiques à la cellule mère (auto-renouvellement total) - 1 division donne 2 cellules filles différenciées (différenciation) - 1 division donne 1 cellule fille identique à la cellule mère et 1 cellule fille différenciée 				<p>Sa division donne uniquement des cellules spécialisées</p>	
<p>Cellules souches embryonnaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Potentiel de prolifération infini - Petit nombre - Facilement amplifiable et une durée quasi-illimitée au stade indifférencié <i>in vivo</i> 		<p>Cellules souches adultes ou somatiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Différenciation limitée : les cellules souches présentes dans différents tissus du corps qui peuvent donner naissance à certains ou à tous les types de cellules matures présents dans le tissu ou l'organe particulier dont elles proviennent. - Rare - En fonction du type de CSA, les cellules sont plus ou moins difficile à isoler et cultiver. 		<p>IPS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Donnent 2 cellules souches identiques en se divisant - Potentiel de prolifération infini - Différenciation difficile et illimitée - Nombreuses et faciles à cultiver 	<p>Cellules différenciées adultes</p>
Totipotentes	Pluripotentes	Multipotentes	Unipotentes	Pluripotentes	
<p>- issues de l'ovocyte fécondé jusqu'au 4^e jour après la fécondation</p> <p>- Capables de se différencier en tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaire (placenta, cordon ombilical)</p> <p>- Permet le développement d'un embryon</p>	<p>- Issu de la masse interne du blastocyste</p> <p>- Capables de se différencier en TOUS type de cellulaires d'un organisme à l'exception des tissus extra-embryonnaires</p> <p>- à l'origine des trois feuillets primaires (ectoderme, mésoderme, et endoderme)</p>	<p>Capables de donner un grand nombre de types de cellules mais pas tous. Elles sont déjà quelque peu spécialisées et peuvent produire une partie ou la totalité des types de cellules matures que l'on trouve dans le tissu ou l'organe particulier dans lequel elles résident.</p> <p>Par exemple, les cellules souches neurales présentes dans le cerveau adulte sont capables de fabriquer des neurones et deux types de cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes.</p>	<p>Capacités d'auto-renouvellement limitées</p> <p>Donnent un seul type de cellule mature</p> <p>Ex : cellules souches épidermiques se différencient seulement en kératinocytes</p>	<p>Les IPS sont des cellules souches qui ont été modifiées ("induites") à partir de cellules non pluripotentes pour devenir pluripotentes. En d'autres termes, une cellule ayant une fonction spécialisée (par exemple, une cellule de la peau) qui a été "reprogrammée" à un état non spécialisé similaire à celui d'une cellule souche embryonnaire.</p>	<p>Ex : injection de cellules sanguines spécialisées (GR, GB et plaquettes)</p> <p>→ Transfusion sanguine</p>
<p>Ne sont pas utilisées pour des raisons éthiques.</p>	<p>- Issues d'embryons surnuméraires par FIV ou issu de lignées commerciales détenues par des laboratoires</p> <p>Sous le contrôle de l'Agence de biomédecine</p>	<p>Issues des niches telle que moelle osseuse.</p>		<p>Sans problème éthique vis-à-vis de l'embryon</p>	

Figure 1 Classification physiologiques des cellules au cours du développement et de la vie de l'Homme (Magalon et al. 2018)

La puissance de développement est réduite à chaque étape, ce qui signifie qu'une cellule souche unipotente n'est pas capable de se différencier en autant de types de cellule qu'une cellule pluripotente.

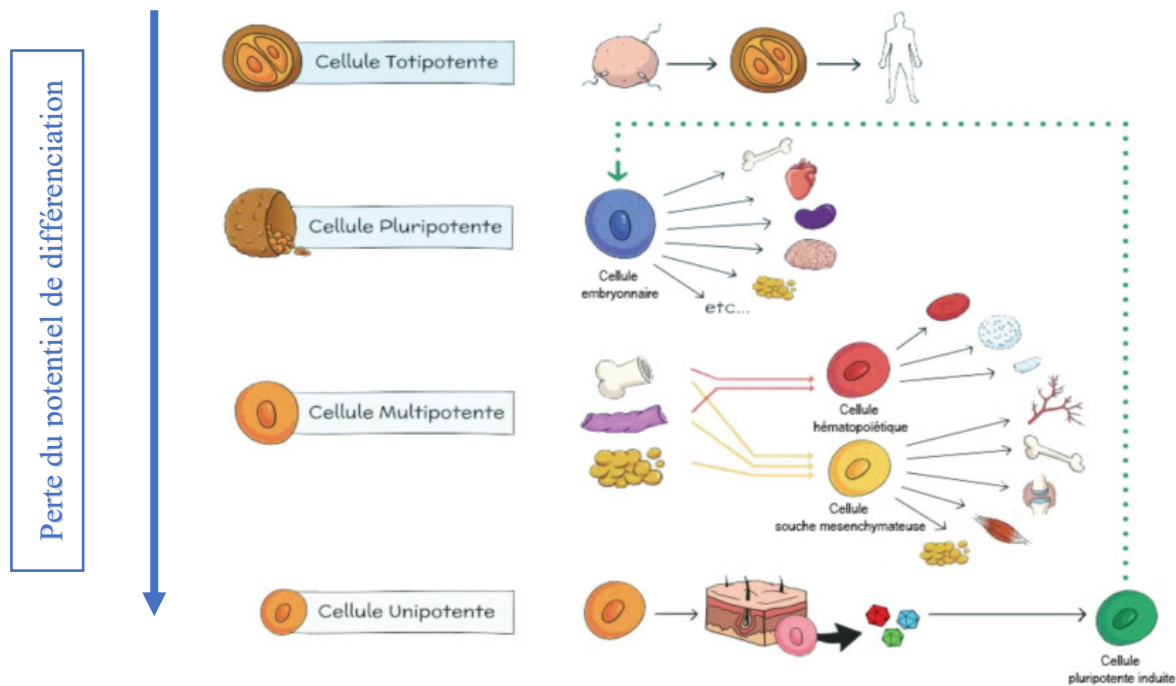


Tableau II Différents types de sources de cellules souches (Les entreprises du médicament 2010)

Sources	Autologue	Allogénique	Lignées cellulaires	Xenogéniques
Définition	Cellule provenant du même organisme	Cellules provenant d'un individu de la même espèce	Cellules immortalisées	Cellules provenant d'une espèce différente
Facilité d'approvisionnement	+/-	+++	Infini	+++++
Tolérance	Excellente	Moyenne	Mauvaise	Mauvaise
Risques	- délais de traitement plus long	- Réactions immunitaires (nécessitent des traitements par immunosuppresseurs), sauf IPS ou les cellules sont marquées en fonction de leur profil immun (HLA) - problème éthique si cellule embryonnaire - Donneur porteurs de prédisposition à certaines maladies	- Réactions immunitaires - Tumeurs	- Réactions immunitaires - Transmission de virus d'une espèce à un autre
Modifications / Corrections	Nécessaire	Rare	Aucune	
Exemples d'utilisations ou d'applications cliniques	Bébés bulles : correction des cellules par thérapie génique afin de combler les problèmes de défense immunitaire	Leucémies, anémies : Greffe de moelle osseuse Développement en cours d'haploallogreffe au Japon, pour combattre la problématique de coût et de temps.		Formation de chimères, c'est interdit par la loi Française.
	Utilisées en thérapie cellulaire		Pas utilisées en thérapie cellulaire	

a. Cellules souches embryonnaires (CSE)

Les cellules souches embryonnaires sont présentes à un stade très précoce de développement de l'embryon. Elles possèdent 3 propriétés majeures :

- **Capacité d'auto-renouvellement**
- **Capacité de prolifération quasi-infinies**
- **Pluripotence** : elles sont douées d'un fort potentiel de différenciation

Ces caractéristiques rendent les CSE particulièrement intéressantes pour le développement de solutions thérapeutiques (médecine régénérative, maladies génétiques, mise au point de certains traitements).

L'utilisation et les recherches effectuées sur ces CSE sont strictement encadrées par la loi en raison des problématiques éthique et morale sur leurs conditions d'utilisation et leurs domaines d'application.

A. Cellules souches totipotentes

A travers le processus d'embryogenèse, l'œuf fécondé est une cellule qui va former un organisme.

Jusqu'au stade de la morula, les cellules sont totipotentes :

- Elles peuvent générer la formation d'un organisme entier *in vivo* ainsi que les tissus extra-embryonnaires (placenta, cordon ombilical)
- *In vitro*, une cellule totipotente ne peut pas générer un embryon

Pour des questions éthiques, ces cellules totipotentes ne sont pas utilisables pour la thérapie. De même, on ne sait pas les isoler car le stade est trop précoce donc on ne peut pas les utiliser pour la recherche.

B. Cellules souches pluripotentes

1. Définition et propriétés :

Ces cellules pluripotentes sont prélevées au niveau de la masse interne du blastocyste, **entre le 5^e et 7^e jour post-fécondation**.

- Elles ont le potentiel de générer **tous les types de cellules** présents dans l'organisme.
- *In vitro* ou *in vivo*, elles ne pourront jamais générer un organisme complet et des annexes embryonnaires.

Outre les cellules souches embryonnaires pluripotentes, ils existent des cellules souches douées de pluripotence :

- Cellules embryonnaires de carcinomes
- Cellules embryonnaires germinales
- Cellules souches de l'épiblaste

In vivo, dès la gastrulation (**10^e jour** post-fécondation) :

- Les cellules perdent leur pluripotence
- Le développement embryonnaire conduit à la **spécialisation** de ces cellules.
- Cette différenciation dépend de l'environnement de la cellule : la cellule pluripotente peut se différencier en plus de **200 types de cellules** (Coulombel 2007)

Par contre *in vitro*, on peut choisir des conditions de culture et d'amplification spécifiques permettant soit :

- **D'induire la différenciation cellulaire** : on place les cellules dans un milieu adéquat
- **De maintenir les propriétés de prolifération et de pluripotence** : cela est réalisé après l'extraction et la mise en culture des blastomères.

2. Sources des CSE :

Il existe plusieurs sources de CSE dont l'obtention est plus ou moins éthique et dont la faisabilité-efficacité sont variables

Tableau III Sources de Cellules souches Embryonnaires

<p>Blastocyste</p>	<p>- Première source de CSE : la plus utilisée</p> <p>- Les cellules du blastocyste ont déjà une certaine spécification et peuvent être sujettes à une différenciation rapide. Cette différenciation peut être évitée selon 2 techniques :</p> <p>1) Immunochirurgie :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un blastocyste est incubé sans zone pellucide avec des anticorps qui se fixent à la surface du trophoctoderme provoquant ainsi une lyse du trophoctoderme. - Cette méthode permet l'optimisation de la dérivation mais dépend de la taille et de la qualité de la masse interne. - Des phénomènes de différenciation et d'apoptose peuvent se produire durant la première semaine de croissance du blastocyste. C'est donc une technique très incertaine. <p>2) Culture des blastocystes à un stade avancés avec un foie de rat buffle dans un milieu conditionné par un média jusqu'au 8e jour : on obtient davantage de cellules de la masse interne et celles-ci ne se différencient pas plus.</p>
<p>Morula (Strelchenko et al. 2004)</p>	<p>- La morula représente un stade plus avancé de l'embryon.</p> <p>- Elle a permis de créer des lignées dérivées de CSE d'une efficacité similaire aux cellules de la masse interne et du blastocyste entier.</p>
<p>Embryon à croissance arrêtée</p>	<p>- On dérive les CSE à partir d'embryons non viables dont la croissance a été arrêtée</p> <p>- Cela permet de ne pas toucher à l'intégrité de l'embryon, ainsi on évite certaines problématiques éthiques.</p>
<p>Transfert de noyaux de cellules somatiques (Yamada et al. 2014)</p>	<p>- On utilise un ovule énucléé avec un noyau de cellules somatiques permettant d'obtenir un blastocyste dont on dérivera les CSE : le taux de réussite du procédé est de 25%.</p> <p>- La réussite dépend de plusieurs facteurs, en particulier :</p> <ul style="list-style-type: none"> - La donneuse : méthylation sévère de la lysine 9 dans l'histone H3 du génome - Le protocole de stimulation : en introduisant KDM4A on arrive à augmenter le taux de réussite. <p>- Les résultats de cette technique sont satisfaisants mais difficilement reproductibles car l'opérateur doit être formé pendant des années pour ne pas perturber l'ovule et le noyau de la donneuse.</p> <p>- C'est un protocole qui permet de ne pas altérer l'embryon en tant que tel.</p>
<p>Parthénogenèse (Daughtry et Mitalipov 2014)</p>	<p>- Elle permettrait de générer des CSE à partir d'ovocytes activés non fertilisés, sans détruire un embryon et contourner le problème d'immunocompatibilité car l'ovocyte ne contiendrait que les gènes du HLA de la mère et non plus ceux du père et de la mère. Cela permettra d'abaisser la variabilité et le nombre de lignées nécessaires à la compatibilité (Revazova et al. 2007).</p> <p>- Sans empreinte paternelle, le développement des parthénotes est impossible. Pourtant, il semblerait que le phénotype, le comportement et le potentiel de différenciation de ces cellules soient les mêmes que les CSE.</p> <p>- Même si cette solution est très attrayante, des soucis d'aneuploïdies, de troubles génétiques, épigénétique et d'instabilité subsistent.</p>
<p>Blastomère simple (Giritharan et al. 2011)</p>	<p>- Dans le cadre des diagnostics préimplantatoires (DPI), les chercheurs ne retirent qu'un seul blastomère. Durant les analyses du blastomère, l'embryon continue à se développer puis les blastomères pourront être implantés.</p> <p>- Cette technique est jugée comme sûre et a donné naissance à de nombreux bébés en bonne santé.</p> <p>- Une méthode de dérivation basée sur cette technique est en cours de développement avec un taux de réussite entre 25% et 30%.</p> <p>- L'avantage de ces CSE est qu'elles présentent un profil transcriptionnel similaire au CSEh (cellule souche embryonnaire humaine) classique tout en évitant la destruction d'embryon</p>

3. Caractéristiques des CSE :

Elles expriment :

- Les facteurs de transcription Oct-4, NANOG et Rex-1
- Les antigènes de surface cellulaire SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81
- L'activité élevée de la phosphatase alcaline endogène

Elles conservent une activité télomérase élevée et peuvent continuer à s'auto-renouveler indéfiniment.

Protocole de développement de lignées de CSE(J. A. Thomson et al. 1998):

Le milieu de culture est constitué des éléments suivants :

- Cellules nourricières (souvent irradiées pour stopper leur croissance) baignant dans du DMEM¹ à 20% de sérum de veau fœtal
- 1mM de Glutamine
- 0,1 mM de bêtamercaptoéthanol
- 1% d'acides aminés non essentiels
- +/- antibiotiques
- Facteur de croissance bFGF (*basic fibroblast growth factor*) : il maintient l'état indifférencié

Dans ce type de culture, les cellules nourricières :

- Servent de support
- Maintiennent leur croissance et l'état indifférenciés aux CSE.

Dans un premier temps on utilisait des fibroblastes embryonnaires murins mais le mieux étant de se servir de composants humains comme les cellules néonatales de prépuces humain (Amit et al. 2003) ou du sérum d'origine humaine (Richards et al. 2002). Des milieux chimiques ont été définis et utilisent des protéines complexes et des petites molécules comme la laminine ou la fibronectine.

- Au bout de quelques mois, on obtient des colonies de cellules qui continueront à se développer
- Ces cellules seront transférées sur une autre monocouche par dissociation enzymatique ou mécanique : c'est ce que l'on appelle « le passage ».
- Le transfert mécanique des lignées CSEh permet leur maintien, le tri sélectif des cellules indifférenciées et d'obtenir des colonies de tailles plus ou moins identiques. Par contre, le passage mécanique est long et laborieux : il peut entraîner des anomalies chromosomiques.
- Le transfert chimique est privilégié en routine afin de manipuler une grande quantité de cellules simplement et rapidement.

Capacités de prolifération illimitées et caractère pluripotent des CSE pluripotentes *in vitro* :

Plusieurs critères de ces cellules ont été mis en évidence (J. A. Thomson et al. 1998) :

1) Caractéristiques morphologiques :

- Cellules avec un gros noyau et des colonies circulaires aux contours réguliers.
- Présence de marqueurs de surface : les gangliosides SSEA-3 et SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen*). Par contre absence de SSEA-1 comme chez la souris puisque chez l'homme il permet la différenciation trophoblastique). Présence des kératanes sulfates TRA-1-60 et TRA-1-81 (*Tumour rejection antigen* : ce sont des protéoglycanes) et d'autres marqueurs comme GTCM2 (*Germ cell tumour marker*)(J. A. Thomson et al. 1998).

2) Caractéristiques caryotypiques : anomalies sur les chromosomes 12, 17, 18 et X

3) La sous unité TERT de la télomérase (télomérase reverse transcriptase) : elle est fortement exprimée et empêche ainsi la dégradation des télomères. Cette forte activité télomérasique est liée à la forte capacité de prolifération.

4) Caractéristiques de pluripotence par des tests de pluripotence : formation de tératomes *in vivo* chez la souris immunodéficiente, différenciation *in vitro*, complémentation d'un blastocyste tétraploïde et formation de chimères avec transmission germinale.

¹ DMEM : Dulbecco's Modification of Eagle's Media

Mécanismes de maintien de l'autorenouveau et de la pluripotence (Boucher 2015)

L'expression de facteurs de transcription est codée par 4 « gènes de pluripotence » (Hoffman et Carpenter 2005): Oct4 (Niwa, Miyazaki, et Smith 2000), Sox2, Nanog (Calloni et al. 2013) et SALL4 régulent seuls ou en collaboration la pluripotence par l'intermédiaire de boucles d'autorégulations et de rétrocontrôles (Chambers et al. 2003). Ils sont soit activés, soit réprimés et ils comprennent des gènes qui codent pour le remodelage de la chromatine, ainsi que des protéines modificatrices d'histones et des facteurs de transcription de différenciation de lignées cellulaires.

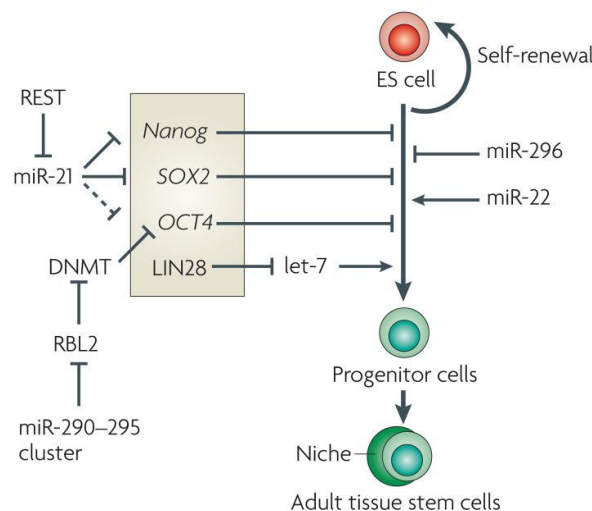
- Conformation de la chromatine : « ouverte et non fermée » comme chez l'adulte, permettant l'expression des gènes de la pluripotence.
- Facteurs épigénétiques : les sites cibles de fixation de gènes spécifiques du développement sur la chromatine ne sont plus accessibles par les protéines régulatrices telles que la déméthylase et l'histone méthyltransferase. Ce mécanisme réprime l'engagement des CSE dans un processus de différenciation (T. I. Lee et al. 2006)
- Les micro-ARN : ils forment, avec les facteurs de transcription, un réseau de régulation de l'autorenouveau et de la pluripotence des CSE
- Facteurs de croissance : par exemple bFGF qui empêche la différenciation

Tous ces mécanismes ne sont pas connus. Par conséquent, il est difficile d'appliquer des protocoles rigoureux standardisés :

- Les cellules ne sont donc pas complètement différenciées
- Tous les phénotypes cellulaires ne sont pas obtenus : quand c'est le cas, il n'y a qu'un enrichissement du milieu de culture qui nécessitera une phase de tri cellulaire.

Ces cellules sont un espoir majeur pour la thérapie cellulaire.

Figure 2 Mode de régulation de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Boucher 2015)



Les CSE naïves ou amorcées

Il existe 2 états pour les CSE murines (CSEm) (Klimanskaya 2019):

1) CSE naïves :

- Elles expriment les facteurs de pluripotence tels que Oct4, NANOG, Sox2
- Les deux chromosomes X sont actifs
- Elles sont polarisées et forment un dôme.
- Leur métabolisme est glycolique
- Elles ont tendance à survivre mieux à la dissociation unicellulaire
- Elles ont une meilleure capacité de prolifération
- Elles se différencient mieux *in vivo* que *in vitro*

Elles possèdent donc des capacités recherchées en médecine régénérative.

2) CSE amorcées :

- Elles proviennent de l'épiblaste
- Elles expriment les facteurs de pluripotence tels que Oct4, NANOG, Sox2
- Un seul chromosome X est actif
- Elles forment des colonies plates.
- Leur métabolisme est une phosphorylation oxydative.

Les CSEh sont plus proches des CSEm amorcées. Les CSEh peuvent être dérivées *de novo* ou être converties à l'état naïf, grâce à cocktail de molécules qui activent et inhibent certains mécanismes.

- Cette différence d'état de base et de la majorité des cellules peut créer des différences lorsque l'on utilisera un modèle de souris pour une étude préclinique.
- On ne retrouvera pas les mêmes caractéristiques et les mêmes mécanismes : les CSEm seront majoritairement naïves alors que les CSEh seront amorcées (donc moins aptes à proliférer et plus différenciées).

4. Applications des cellules souches embryonnaires

Les cellules utilisables pour une application en thérapeutique doivent répondre à certains critères :

- Être fonctionnelles *in vivo*
- Non tumorigène
- Exempte d'agents pathogènes

Pour un développement et une production efficace de ce produit cellulaire, il est nécessaire d'avoir une source fiable et durable de cellules. Les cellules pluripotentes semblent donc être une bonne source car elles sont disponibles en quantité quasi-illimitée et peuvent donner l'intégralité des types cellulaires présents au sein du corps humain.

La cellule souche embryonnaire humaine (CSEh) présente un intérêt certain car c'est une source cellulaire **quasi-illimitée** et **facilement accessible** (notamment grâce à des lignées de CSEh entretenues et bien caractérisées). La pluripotence permet **d'obtenir l'ensemble des types cellulaires** de l'organisme et ainsi **cibler l'ensemble des tissus** et organes du corps humain. Ces cellules permettent de :

- Découvrir des processus de développement humain précoce
- Créer des modèles cellulaires pour les recherches pharmacologiques : screening à haut débit de molécules potentielles (identification de toxicité et preuve d'innocuité), y compris pour les maladies rares grâce aux CSE issues du DPI qui sont difficiles à modéliser en temps normal
- Étudier des maladies
- Étudier la génomique fonctionnelle : caractérisation des gènes
- Remplacer des tissus, des organes et restaurer leurs fonctions après des étapes de différenciation ou de spécialisation cellulaire (Il est interdit et dangereux d'administrer des CSEh. Les CSEh ne sont pas utilisées en clinique sauf après différenciation en cellules souches adultes ou cellules matures. Un des paramètres qualité pour l'utilisation des CS issues de CSEh est justement l'absence de CSEh résiduelles ou l'absence de marqueurs de pluripotence).

L'avantage majeur dans l'utilisation de CSE est son potentiel de **pluripotence**. En effet, il existe de nombreux besoins médicaux non couverts pour certains types cellulaires, que les CSE permettent d'obtenir après engagement dans la voie de différenciation correspondante.

Les matières premières utilisées dans la fabrication doivent répondre aux critères de sécurité et être entièrement caractérisées avec les critères qualité suivants :

- Stérilité,
- Absence de mycoplasme
- Absence de virus communs et latents

-Absence d'endotoxine.

La sécurité du produit cellulaire est de la plus haute importance, le processus de fabrication doit permettre l'élimination de cellules pluripotentes résiduelles dans le produit final pour ne pas générer de tératomes. Les tests démontrant l'absence de cellules pluripotentes résiduelles doivent avoir une sensibilité élevée :

- test d'inoculation sur des animaux immunodéprimés
- test de croissance cellulaire en gélose molle
- test de pureté afin de s'assurer que le dérivé est de haute qualité

Exemples d'utilisation des cellules souches embryonnaires

Figure 2 Potentiel de différenciation des CSE et par extension leur potentiel thérapeutique (K. Schwartz 2011)

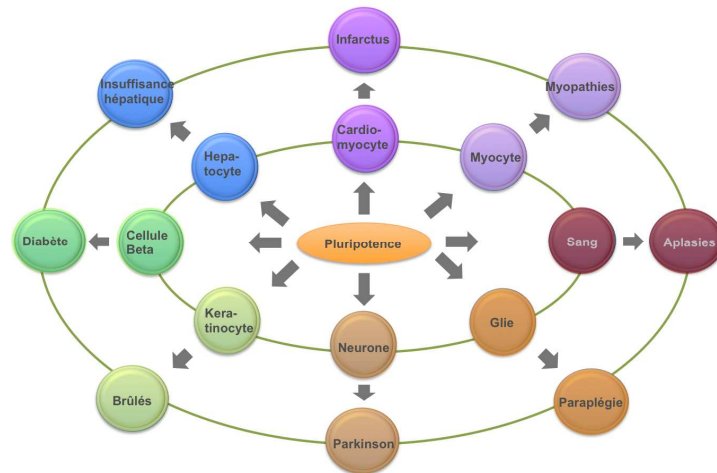
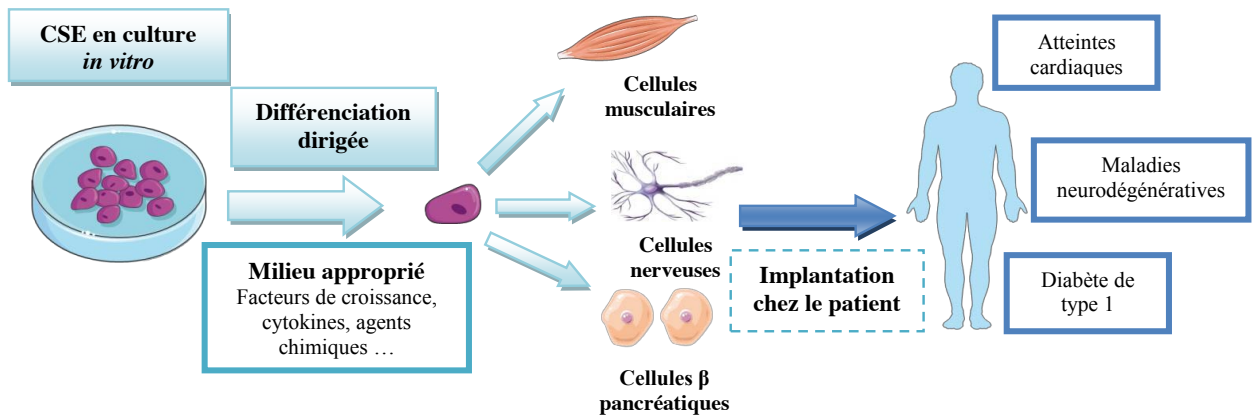


Figure 3 Utilisation potentielle des CSEh comme produit de thérapie cellulaire à des fins de médecine régénérative (K. Schwartz 2011)



Limites des cellules souches embryonnaires

Pour le moment, aucun traitement issu de la différenciation des CSEh n'est autorisé en raison des **problèmes éthiques**, des **propriétés tératogènes** et des **transformations à long terme**.

Même si ces cellules sont très immatures et qu'elles n'ont pas un pouvoir immunogènes importants, l'immunocompatibilité reste un obstacle. En effet, l'utilisation de cellules souches embryonnaires comme cellules médicaments constitue une allogreffe dont la probabilité d'histocompatibilité (compatibilité HLA) est extrêmement faible. Quand les cellules commencent leur différenciation, elles expriment des antigènes d'histocompatibilité à leurs surfaces.

Pour pallier cette limite, de nombreuses solutions plus ou moins optimales existent :

- **Utilisation d'un traitement immunosuppresseur** : c'est un traitement lourd qui n'est pas efficace dans tous les cas et qui comporte de nombreux effets secondaires et indésirables imposant de nombreuses contraintes aux patients (même s'ils ne sont pas aussi contraignants que ceux utilisés lors des transplantations).
- **Utilisation du clonage thérapeutique** : elle consiste à inclure un noyau d'une cellule somatique de la personne à traiter dans un ovocyte énucléé pour obtenir par division cellulaire des CSE totipotentes puis pluripotentes. Ces cellules sont donc compatibles histologiquement et il n'y a pas de risque de rejet du greffon.
- **Création d'une banque de CSE** regroupant les différentes combinaisons de marqueurs HLA présents dans la population. Nous étudierons cette possibilité un peu plus tard notamment avec des Haplobank comprenant des Haploines issues de CSE mais surtout d'IPS.
- **Utilisation des IPS** : nous découvrirons les avantages de l'usage de ces cellules en termes d'immunocompatibilité mais leurs limites à la création de traitement rapidement disponible.
- **Utilisation de la bio-ingénierie** : dans le cas des cellules β de Langerhans pour le traitement de diabète, celles-ci sont recouvertes d'une matrice plastique poreuse qui permet le passage de l'insuline mais qui ne permet pas au système immunitaire d'identifier ces cellules comme n'étant pas compatibles sur le plan immunitaire.

Les conditions de développement des cellules *in vivo* ne sont que partiellement et artificiellement réunies *in vitro*, elles maximisent donc les anomalies génétiques qui pourraient générer des cellules pré tumorales. Il faut donc tester et contrôler strictement la production de cellules pour usage thérapeutique. Pour les essais, on utilise des **cellules de grade clinique** ayant suivi des normes de qualité strictes agréées par les autorités. C'est le cas pour toutes les cellules utilisées en thérapeutique.

5. Législation des CSE

Les cellules pluripotentes utilisées en thérapie cellulaire et pour la recherche sont **issus d'embryons surnuméraires** secondaire à des FIV² suite à l'abandon d'un projet parental.

- Leurs utilisations pour la recherche nécessitent le consentement de cession gratuite de l'embryon de la part des parents.
- Aucun embryon n'est créé pour la recherche car la loi l'interdit. La plupart du temps ces cellules pluripotentes sont issues de lignées commerciales détenues par des laboratoires.
- Pour étudier des maladies génétiques particulières, il est nécessaire d'utiliser des embryons qui peuvent provenir de diagnostics préimplantatoires (DPI). Le DPI³ est proposé aux couples qui peuvent transmettre une maladie génétique incurable et grave.
- En France, toutes ces pratiques sont effectuées sous le contrôle de l'Agence de biomédecine.

Les embryons sont devenus accessibles pour la recherche et le développement de thérapeutiques grâce aux lois de bioéthique de 2004, 2011 et 2020 (à paraître). La loi de bioéthique est révisée et complétée tous les 7 ans, n'empêchant pas entre-temps des modifications par ordonnance.

b. Cellules souches des annexes embryonnaires

Les annexes embryonnaires contiennent des cellules souches dont les propriétés n'ont été découvertes que très récemment. Ces cellules souches proviennent du **liquide amniotique** et du **sang de cordon ombilical**. Le sang de cordon permettra ainsi des greffes de cellules souches hématopoïétiques allogéniques.

² FIV : Fécondation *in vitro* : Une procédure dans laquelle un ovule et des spermatozoïdes sont réunis dans une boîte de pétri afin de fertiliser l'œuf. L'ovule fécondé commence à se diviser et, après plusieurs divisions, forme l'embryon qui peut être implanté dans l'utérus d'une femme et donner lieu à une grossesse.

³ DPI : diagnostic préimplantatoire

Les cellules souches amniotiques

Ces cellules souches fœtales ouvrent de nouveaux horizons en médecine régénérative : dénuées de problèmes éthiques, elles sont accessibles sans procédure invasive et douloureuse et elles peuvent être mise en réserve.

Les **cellules souches mésenchymateuses amniotiques** présentent les caractéristiques typiques des CSM (cellule souche mésenchymateuse) :

- Morphologie de type fibroblastique
- Capacité clonogène
- Potentiel de différenciation multilinéaire
- Propriétés immunosuppressives
- Expression d'un profil d'expression génique mésenchymateux et d'un ensemble mésenchymateux d'antigène de surface

En comparaison aux CSM, ces cellules ont l'avantage d'être plus faciles à isoler et possèdent de meilleures capacités de prolifération.

Les **cellules souches du liquide amniotique** sont intermédiaires entre les cellules souches embryonnaires et adultes. En effet :

- Elles expriment à la fois des marqueurs embryonnaires et CSM
- Elles sont capables de se différencier en lignées représentatives de toutes les couches germinales embryonnaires
- Elles ne sont pas tumorigènes

Étant donné l'identification récente de ces cellules, de nombreuses caractéristiques restent inconnues mais ces cellules souches du liquide amniotique semblent être d'excellentes candidates pour la thérapie cellulaire, la bio-ingénierie et la médecine régénérative.

Tableau IV Description des cellules souches amniotiques (De Coppi et Atala 2019)

	Cellules épithéliales amniotiques	Cellules souches mésenchymateuses amniotiques	Cellules souches du liquide amniotique
Caractéristiques	<p>Obtenues par digestion enzymatique différentielle</p> <p>Contiennent des marqueurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> → Spécifiques à l'embryon : les antigènes spécifiques de stade (SSEA) 3 et 5, Tra-1-60, Tra-1-81 → Marqueurs mésenchymateux CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 → HLA : -A, -B, -C, CD13, CD10, CD166 et CD117 	<p>Morphologie : uniforme en forme de fuseau et de fibroblaste</p> <p>Origine : uniquement foetale et pas maternelle</p> <p>Contiennent des marqueurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> → Mésenchymateux : CD90, CD73, CD105 et CD166 → Pour molécules d'adhésion : CD29, CD44, CD49e et CD54 → Antigènes appartenant au CMH-I <p>On les retrouve dans :</p> <ul style="list-style-type: none"> → La moelle osseuse adulte en quantité infinitésimale → Tissus adultes : tissu adipeux, muscle squelettique, foie et cerveau → Tissus foetaux : moelle osseuse, foie et sang → Tissus extra embryonnaires : placenta et amnios 	<p>Morphologie : forme ovale et ronde</p> <p>Origine : uniquement foetale et pas maternelle</p> <p>Profil de marqueurs cellulaires comparable à celui des CSM :</p> <ul style="list-style-type: none"> → Mésenchymateux : CD73, CD90 et CD105 → Molécules d'adhésion : CD29 et CD44) → Antigènes appartenant au CMH-I <p>-sous population infinitésimale : nombre de cellule suit une courbe gaussienne au cours de la grossesse</p>
Propriétés	<ul style="list-style-type: none"> -Multipotentes -différenciation en cellules neuronales qui synthétisent la lignée acétylcholinérgique, la norépinephrine et la dopamine -capacité d'immunosuppression 	<ul style="list-style-type: none"> -Multipotentes -large potentiel de différenciation vers des lignées mésenchymateuses : lignée adipogènes, ostéogène et chondrogènes (similaires aux CSM de la moelle osseuse) -capacité de prolifération plus rapide in vitro -régulation à la hausse des gènes impliqués dans les voies de transduction du signal, dans la maturation et la contraction utérine par rapport aux autres CSM 	<ul style="list-style-type: none"> - état pluripotent indifférencié - différenciation en ostéocytes, adipocytes et fibroblastes - culture sans couche d'aliment et avec du sérum -pas de différenciation in vitro -grand potentiel clonogène → Lignées clonales se développent rapidement en culture → Maintiennent une longueur de télomères constants
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Neuroprotectrices et neurorégénératives 	<ul style="list-style-type: none"> -obtenir facilement à partir de liquide amniotique -le taux de réussite de l'isolement est de 100% dans des conditions de culture très simples (facteurs de croissance de fibroblastes) -taux de prolifération rapide sans potentiel tumorigène, avec un caryotype normal -Stabilité en culture entre les passages, en Cryo préservation et en décongélation -capacité de reprogrammation en iPS 100 fois supérieure et beaucoup plus rapide (6 jours contre 16,5 jours en moyenne) que les cellules somatiques -effets trophiques et protecteurs sur les systèmes nerveux central et périphérique -effet immunosuppresseur similaire à celui des CSM de MO 	<ul style="list-style-type: none"> - contenu en ADN diploïde homogène sans preuve de réarrangement chromosomique jusqu'à 250 doublons de population -conservent une morphologie, un temps de doublement, un taux d'apoptose, une distribution du cycle cellulaire et une expression des marqueurs constants jusqu'à 25 passages -sur culture en suspension : capables de se différencier spontanément vers des tissus représentatifs des trois couches germinales embryonnaires -facilement manipulable in vitro -transduction virale plus efficace que CSM, après infection elles conservent leur profil antigénique et leur capacité à se différencier en différentes lignées
Inconvénients			<ul style="list-style-type: none"> -Fluctuations importantes des protéines impliquées dans différents réseaux : les protéines de signalisation, antioxydantes, protéasomiques, du cytosquelette, du tissu conjonctif et des chaperons
Applications potentielles	<ul style="list-style-type: none"> -Efficacité thérapeutique de restauration de la fonction hépatique dans un modèle murin : diminution de l'inflammation, de la fibrose et de l'apoptose des hépatocytes (Manuelpillai U, 2010) - Outils importants pour le traitement des ulcérations et des défauts épithéliaux cornéens (Ahmad S, 2010) ou conjonctifs (Bouchard CS, 2014) -Maladies ophtalmiques -Fibroses pulmonaires -Fibrose hépatique -Sclérose en plaques -Troubles métaboliques congénitaux -Hypercholestérolémie familiale - Lésions de la moelle épinière -Maladie de Parkinson 	<ul style="list-style-type: none"> -Capacité d'intégration dans le tissu cardiaque normal et ischémique puis se différencient en cardiomyocytes et cellules endothéliales -capacité de se différencier en muscle lisse dans la vessie chez le rat - source de cellules appropriée pour l'ingénierie tissulaire des malformations congénitales → Meilleurs résultats pour des greffons diaphragmatiques plutôt que des implants foetaux à base de myoblaste acellulaires dans un modèle ovin → Culture sur mailles biodégradables dans des conditions chondrogènes pour obtenir des greffons cartilagineux artificiels implanté in utero chez des agneaux foetaux. 	<p>Plusieurs études précliniques ont permis d'observer le potentiel clinique des cellules souche du liquide amniotique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Système musculo-squelettique -Cœur -Système nerveux -Rein -Système hématopoïétique -Rein -Poumon -Intestin

c. Cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont **rare**s. Elles sont présentes en pool dans des niches ayant un microenvironnement particulier composé de cellules stromales et d'une matrice extracellulaire (possédant des facteurs solubles de connexion neurales et sanguines). Ce microenvironnement est favorable à (**Tableau V**) :

- Leurs capacités de prolifération
- Leur forme à l'état indifférencié
- Leur communication avec les différents tissus

Ces cellules souches adultes permettent de conserver l'homéostasie tissulaire du corps humain en répondant à des stimuli physiologiques ou pathologiques.

Leur division cellulaire est de 2 types :

- Symétrique : elle permet d'augmenter le pool
- Asymétrique : elle permet de répondre à un besoin de cellules spécialisées.

En comparaison aux CSEh, ces cellules souches adultes sont moins prolifératives mais elles ont une capacité plus forte de différenciation et de spécialisation. En effet :

- Ces cellules ne peuvent pas donner tous les types cellulaires et des lignées immortelles
- Ces cellules sont spécialisées par tissu et subissent les phénomènes de sénescence

En ce qui concerne l'isolement et la caractérisation de ces cellules souches adultes :

- **In vivo**, certains types cellulaires sont difficile à isoler et à caractériser les cellules souches adultes : leur caractérisation s'effectue en fonction des capacités d'auto-renouvellement sur le long terme, de différenciation et de régénération tissulaire (les cellules souche hématopoïétiques et mésenchymateuses sont faciles à isoler)
- **In vitro**, on peut cultiver, expandre et caractériser les cellules souches adultes. Cependant, l'absence de leur microenvironnement peut entraîner une modification de leurs propriétés.

Enfin d'un point de vue éthique, ces cellules souches adultes multipotentes, oligopotentes et unipotentes suscitent moins de débat en comparaison aux CSEh puisqu'on ne touche pas à l'intégrité de l'embryon. En effet, on va chercher directement les cellules au niveau de la niche concernée chez l'adulte et dans les annexes embryonnaires.

Tableau V Identification de trois groupes distincts de cellules souches adultes en fonction de leur degré de spécialisation et leur capacité de renouvellement

	Cellules souches adultes Généralistes	Cellules souches adultes Spécialisées	
Capacité de différenciation	Forte →Tissus mésodermiques →Potentiellement : tissus ectodermiques endodermique (Caen 2010)	Faible	
Capacité de régénération tissulaire		Tissu à potentiel renouvellement élevé	Tissu à potentiel de renouvellement faible
Propriétés		Facile à identifier	Comportement <i>in vitro</i> aberrant
Exemples de localisation tissulaire	- Sang de cordon - Cordon - Placenta ⁴ - Moelle osseuse : cellules stromales mésenchymateuses	- Tissus épithéliaux : épiderme, muqueuses intestinales - Tissu hématopoïétique	- Tissus rénaux - Tissus pulmonaire - Tissus nerveux

⁴ Origine fœtale

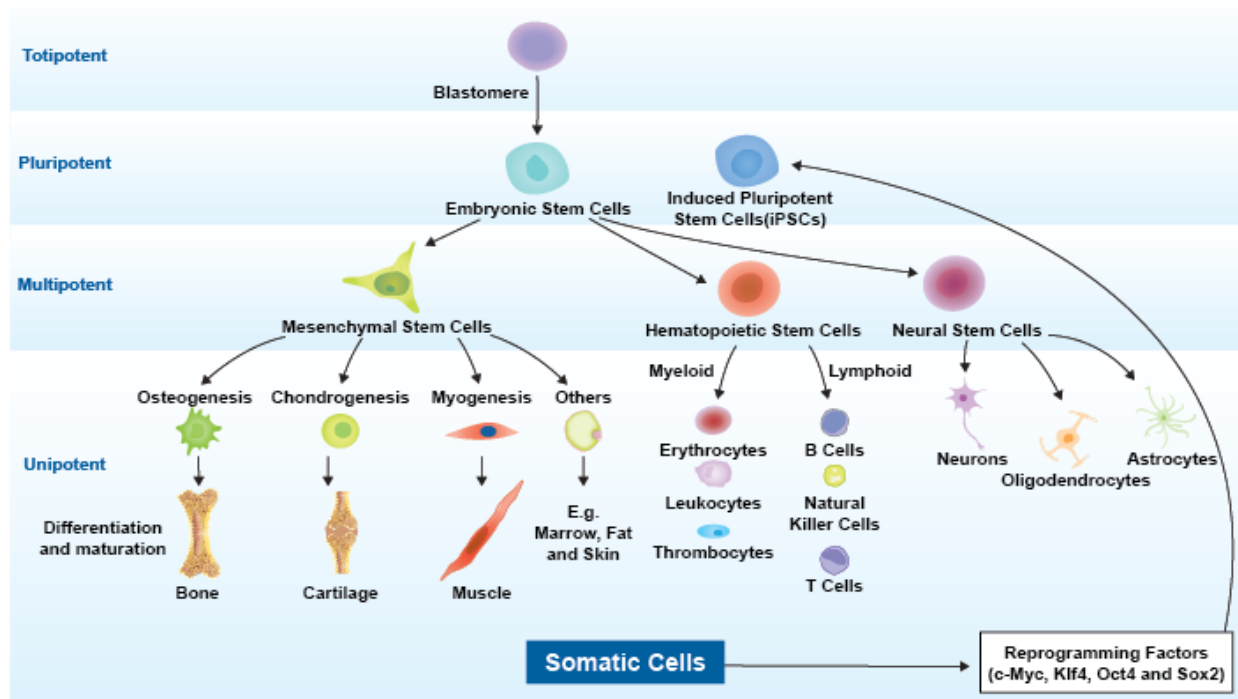
A. Cellules souches multipotentes

Les cellules souches adultes multipotentes peuvent donner un grand nombre de types de cellules mais elles sont toutes déjà partiellement spécialisées. Ainsi, elles peuvent produire tout ou partie des types cellulaires matures que l'on retrouve dans le tissu ou l'organe dans lequel elles sont situées.

On s'intéresse dans ce travail à trois types de cellules souches multipotentes :

- Cellules souches hématopoïétiques
- Cellules souches mésenchymateuses
- Cellules souches neurales

Figure 4 Classification des cellules souches multipotentes (« Stem Cell Research » s. d.)



1. Les cellules souches mésenchymateuses

Elles se définissent comme des **progéniteurs multipotents** et **auto-renouvelables à durée limitée**.

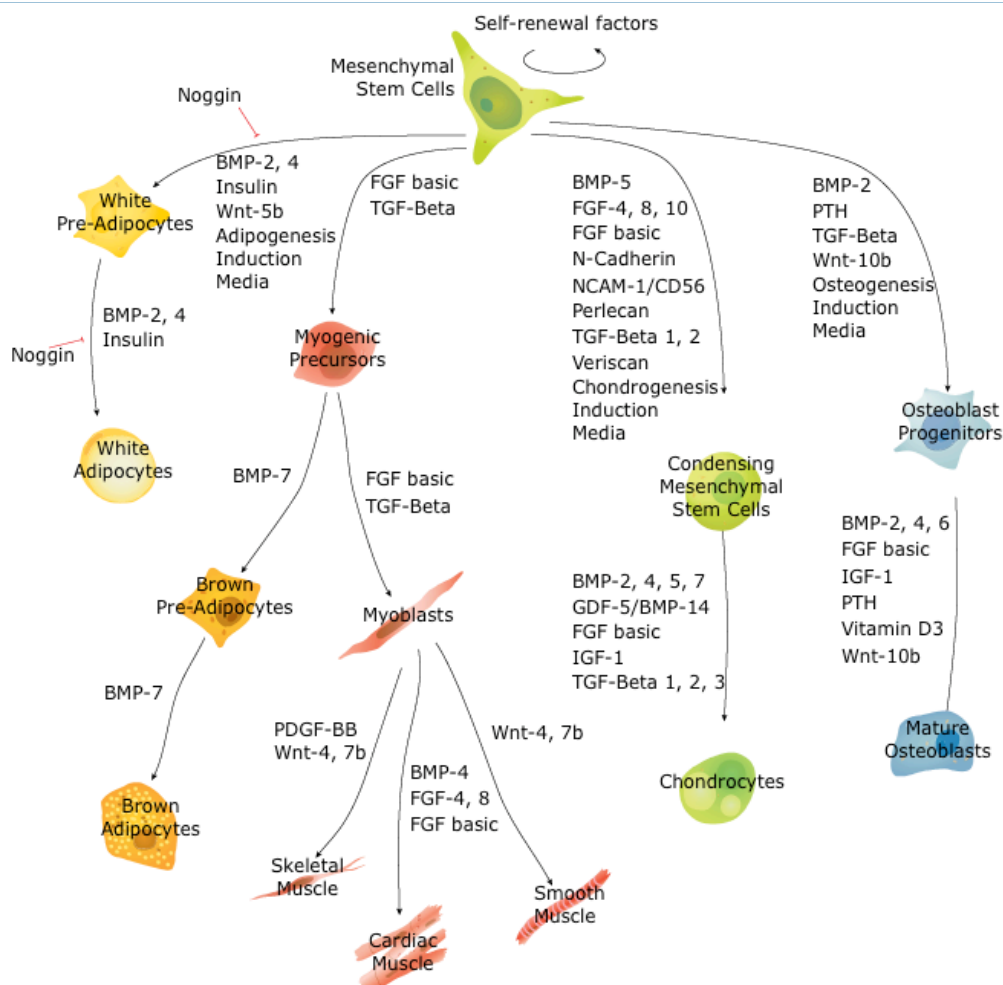
- Elles ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse par (FRIEDENSTEIN et al. 1968) où elles ont un rôle de support stromal : elles permettent de maintenir l'état de quiescence (Charbord 2010) des cellules souches hématopoïétiques (Sacchetti et al. 2007).
- Plus tard, les CSM ont été identifiées chez l'adulte dans le tissu adipeux, le sang périphérique, les ligaments croisés, la pulpe dentaire, le périoste, l'os trabéculaire, les trompes de Fallope, le sang des menstruations et les polypes endométriaux ainsi que dans les annexes embryonnaires (liquide amniotique, placenta, cordon ombilical). (A. I. Caplan 1991; Zuk et al. 2002; Romanov, Svintsitskaya, et Smirnov 2003; Bianco, Robey, et Simmons 2008; Sheng 2015; Ullah, Subbarao, et Rho 2015)

La différenciation de ces cellules est tri-linéaire (Delorme et al. 2009):

- **Adipocytes**
- **Chondrocytes**
- **Ostéocytes**

Figure 6 Vue d'ensemble des cellules souches mésenchymateuses et des marqueurs spécifiques aux lignées (« Mesenchymal Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers » 2014)

Les facteurs décrits ci-dessous sont connus pour influencer la **multipotence**, la **prolifération** et l'**engagement** de la lignée des CSM. Les CSM et leur descendance différenciée peuvent être identifiées par l'expression d'une combinaison unique de marqueurs de surface cellulaire et de facteurs de transcription.



Standard de caractérisation des CSM par l'International Society for Cellular Therapy (Dominici et al. 2006).

Dans un souci d'harmonisation, le comité de l'ISCT a proposé des standards de caractérisation des CSM en établissant des critères minimums de définition :

- 1) L'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture *in vitro*.
- 2) L'expression de certains marqueurs de surface tels que CD73, CD90, CD105 et l'absence d'expression des marqueurs CD34, CD45, CD14 ou CD11B, CD79A, CD19 ou HLA-DR (>95% des cellules en culture).
- 3) La capacité de multipotence : différenciations en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes (cellules d'origine mésodermique).

Ces critères de caractérisation minimums ne sont plus valables, car on ne connaît que partiellement les propriétés d'identification des CSM. Des critères supplémentaires ont été mis en avant :

- 4) Capacité de différenciation en cellules d'origine endodermique et ectodermique (Wei et al. 2013)
- 5) Présence de nouveaux marqueurs de surfaces : CD165, CD276 et CD82 (Al-Nbaheen et al. 2013)

Aujourd'hui, les CSM ont l'avantage (Shammaa et al. 2020):

- D'être des cellules génomiquement stables, hautement accessibles, faciles à isoler et à amplifier
- D'avoir une immunité privilégiée
- D'avoir une utilisation non tératogène et sans véritables problématiques éthiques (Wei et al. 2013)
- De jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet lorsque les CSM sont perturbées, elles peuvent générer de l'arthrose (Murphy et al. 2002) et la maladie de Gaucher (Campeau et al. 2009)
- D'avoir un fort potentiel d'amplification *in vitro* : ainsi 25 ml de moelle osseuse peut générer 100 à 150 millions de CSM en 3 semaines (Pittenger 2008).

L'inconvénient majeur des CSM réside dans leur **capacité limitée de prolifération et de différenciation** (Banfi et al. 2000) qui s'explique par l'absence d'activité télomérasique dans les CSM en culture *in vitro* : ainsi, la longueur des télomères diminue jusqu'à la sénescence cellulaire.

1.1. Rôles physiologiques des CSM

Les CSM possèdent des caractéristiques distinctives :

- **La facilité d'isolement et de culture**
- **La plasticité**
- **Le tropisme intrinsèque vers la zone lésée (homing)**
- **Activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique dans les tissus menacés**
- **Action immunomodulatrice par la fonction paracrine**
- **Activité antimicrobienne**
- **Effet de clairance bactérienne.**
- **Elles peuvent activer d'autres cellules souches résidentes et stimuler la néoangiogenèse (Wannemuehler et al. 2012).**

1.1.1. Les propriétés fonctionnelles rendent les CSM adéquates pour la régénération et la réparation des tissus.

Ces propriétés comprennent :

- a) La capacité des CSM à se **différencier** en plusieurs lignées cellulaires
- b) Leur capacité à migrer vers les tissus lésés (**homing**)
- c) Une activité paracrine favorisant l'angiogenèse, l'activité **anti-apoptotique**, les effets **anti-inflammatoires** et leur aptitude à sécréter des facteurs bioactifs solubles
- d) Une capacité de **soutien à l'hématopoïèse** et des **fonctions stromales**

1.1.1.1. Potentiel de différenciation des CSM et phénomène de transdifférenciation :

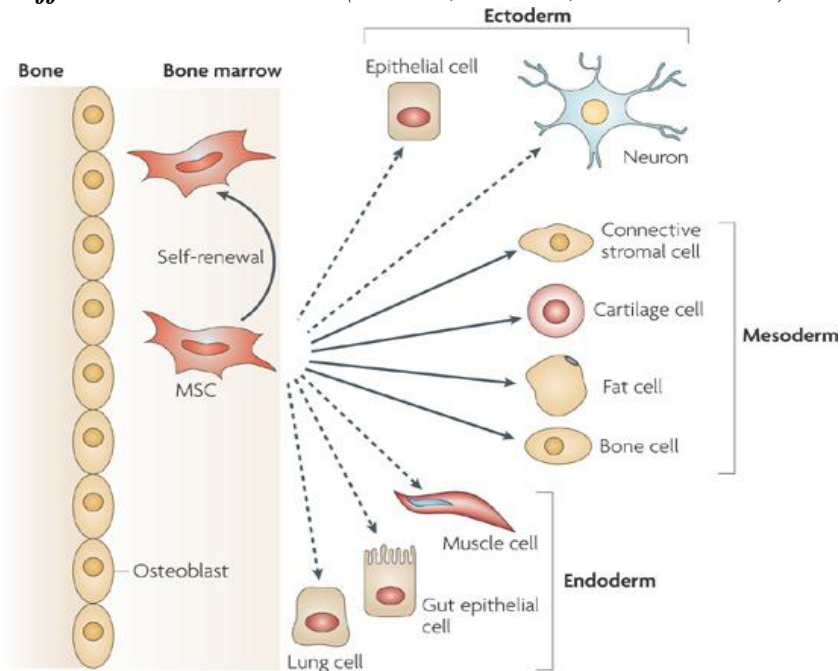
In vivo les CSM vont se différencier naturellement en **tissu d'origine mésodermique**. *In vitro*, on arrive à obtenir des différenciations vers des **lignées ectodermiques** (cellules épithéliales, neurones ...) et **endodermiques** (cellules musculaires, épithélium intestinal et cellule pulmonaire...) (Uccelli, Moretta, et Pistoia 2008). On a ainsi réussi à potentialiser *in vitro* des CSM :

- En cardiomyocytes (Planat-Bénard et al. 2004)
- En neurones (Sanchez-Ramos et al. 2000)

Cependant il est nécessaire d'émettre certaines réserves concernant ces résultats *in vitro* qui forcent le potentiel de différenciation naturel des CSM vers des tissus d'origines endo et ectodermiques (Phinney et Prockop 2007). En effet :

- De très nombreux facteurs (récepteurs intra et extracellulaires, facteurs de croissance, de signalisation, de transcription) et mécanismes inconnus ou partiellement connus influencent l'auto-renouvellement et la différenciation.
- Des limitations méthodologiques ou des événements de fusion cellulaire remettent en cause le phénomène de transdifférenciation. (Theise 2005; Prockop 2009)

Figure 5 Potentiel de différenciation des CSM (Uccelli, Moretta, et Pistoia 2008)



1.1.1.2. Phénomène de homing :

Le homing est un mécanisme de **migration cellulaire sélective** des CSM vers une lésion et la **délivrance de signaux trophiques**. Ce processus est rendu possible grâce à l'expression au niveau du tissu endommagé, de récepteurs et de ligands spécifiques qui permettent le trafic, l'adhésion et l'infiltration des CSM vers le site lésé (Rastegar et al. 2010). Trois étapes sont nécessaires :

1. Attraction chimique des CSM par chimiotaxie : des chimiokines, des cytokines (EGF, IGF, PDGF, VEGF, SDF-1, TNF α , IL-1, IL-6, IL-8), des stimulateurs (VCAM-1, MCP-1, MCP-3, G-CSF) et l'hypoxie entraînent la mobilisation des CSM. L'expression de récepteurs de chimiokines est induite par SDF-1, TLR et TNF α , ce qui attire également les CSM.
2. Adhésion des CSM aux cellules lésées grâce aux molécules d'adhésion (sélectines et intégrines)
3. Infiltration des CSM vers les sites d'inflammation grâce aux métalloprotéases (MMP, TIMP)

1.1.1.3. Fonctions paracrines :

Le microenvironnement tissulaire est modifié par la sécrétion de facteurs de signalisation paracrines (Halabian et al. 2015; Hirvonen 2014). Ces sécrétions ont des effets de type stromal sur le compartiment fonctionnel : elles régulent la prolifération, la différenciation et l'activité antioxydante (Arnold I. Caplan et Dennis 2006). Cette sécrétion sollicite les macrophages et les cellules endothéliales ainsi que les signaux susceptibles de stimuler les cellules souches résidentes pour aider le processus de réparation des tissus (Augustin 2012). Par conséquent, le mécanisme de régénération est déclenché par la stimulation des programmes de réparation endogènes *via* la prolifération croissante des cellules différenciées ou l'activation des cellules souches résidentes (van Poll et al. 2008).

En plus de leur capacité à générer la régénération tissulaire, les signaux interviennent dans la trophicité des CSM avec les effets pro-angiogéniques et anti-apoptotiques qui permettent de réguler la réponse des tissus aux lésions (Martinaud et al. 2010). L'activité paracrine des CSM permet donc une activité trophique des CSM au niveau des tissus lésés (**Figure 6**) :

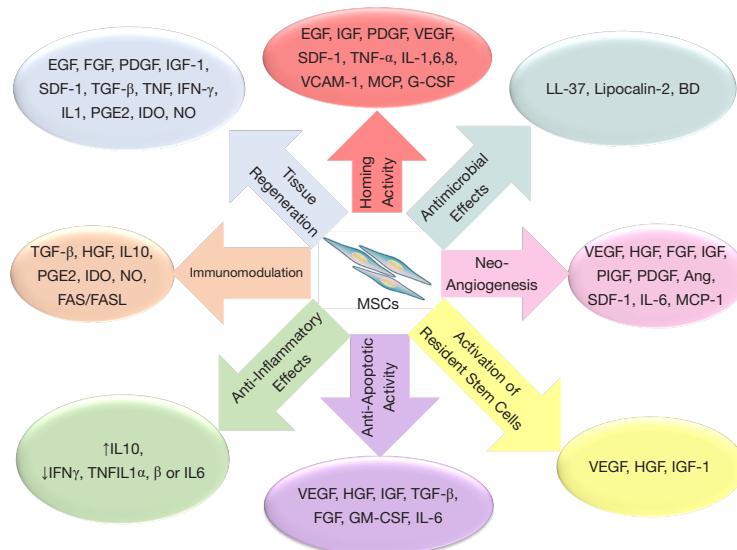
- 1) Activité pro-angiogénique : les CSM sécrètent des facteurs angiogéniques comme les cytokines angiogéniques (telles que VEGF, FGF1, 2, HGF, Ang-1, 2 et SDF-1) qui favorisent la **néovascularisation** des tissus lésés. La sécrétion de facteurs solubles par les CSM les rend capables **d'améliorer la vascularité** des tissus en stimulant la nouvelle croissance des cellules endothéliales et la néoangiogénèse.

- 2) Activité anti-apoptotique : les CSM peuvent protéger les cellules lésées et préserver la fonction des organes en inhibant la mort cellulaire programmée grâce à la signalisation paracrine. Les mécanismes anti-apoptotiques des CSM comprennent
- La régulation vers le haut de la réparation de l'ADN
 - La régulation vers le bas des voies de mort mitochondriale
 - L'augmentation de l'activité antioxydante
 - La modification de l'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques.

Les médiateurs sécrétés par les CSM comprennent le SDF-1, l'IGF-1, le Nrf2, le HIF, le HO-1 et le VEGF qui régulent les protéines pro-apoptotiques vers le bas. (Pardis et al. 2019)

- 3) Effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques : les effets anti-inflammatoires des CSM protègent l'hôte en atténuant la gravité de la réponse immunitaire à l'inflammation *via*
- Une diminution équilibrée de la cytokine pro-inflammatoire
 - Une augmentation de la cytokine anti-inflammatoire
 - Une augmentation des facteurs anti-fibrotiques (modulateurs de l'inflammation).
- 4) Activation des cellules souches résidentes : les facteurs de croissance sécrétés par les CSM peuvent être impliqués dans la mobilisation des populations de cellules souches résidentes. Les CSM ont sécrété le VEGF (en tant que mobilisateur clé des cellules souches), le HGF et l'IGF-1 pour stimuler la population endogène de prolifération de cellules souches par le biais d'interactions complexes paracrines et cellules-à-cellules.

Figure 6 Résumé des mécanismes des cellules souches mésenchymateuses



1.1.1.4. Soutien à l'hématopoïèse et fonctions stromales des CSM :

Les CSM sont un soutien à l'hématopoïèse et jouent une fonction stromale au niveau de la niche hématopoïèse de la moelle osseuse (Sacchetti et al. 2007). En effet

- Au repos, 90% des cellules hématopoïétiques sont à l'état quiescent (phase G0/G1 du cycle cellulaire).
- En cas de stimulation, les CSM s'activent et régulent la prolifération, la différenciation et la libération des cellules souches hématopoïétiques.

1.1.2. Les CSM ont également des propriétés immunomodulatrices puisqu'elles :

- Inhibent la prolifération des cellules T et B (J.-Y. Song et al. 2019)
- Suppriment l'activation des cellules tueuses naturelles (Sotiropoulou et al. 2006)
- Empêchent la génération et la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes (English, Barry, et Mahon 2008; Spaggiari et al. 2009)
- Promeuvent la génération de cellules T régulatrices qui exercent des effets immunosuppresseurs (Maccario et al. 2005).

Les CSM ont des activités **immunosuppressives** et **pro-inflammatoires** en fonction de leurs phénotypes. La polarisation des cellules (de manière similaire à la polarisation des macrophages) est initialement induite par les TLR et elle est spécifique au ligand.

Cette polarisation permet d'orienter la cellule vers 2 phénotypes différents en fonction des besoins (Waterman et al. 2010):

- CSM1 à activité pro-inflammatoire : stimule la chimiotaxie et les processus de réparation ultérieurs. Elles interviennent donc dans les premières phases de réparation tissulaire.
- CSM2 à activité immunosuppressive : agit sur les lésions tissulaires inflammatoires. Elles prennent le relai des CSM1 afin de calmer les processus inflammatoires.

Ce phénomène de polarisation maintient l'**homéostasie tissulaire** au niveau des lésions. Cette polarisation dépend de :

- Différences dans les interactions TLR-ligands et la signalisation de type TLR
- Facteurs tels que les concentrations de ligands (faibles concentrations permettant le phénotype CSM1)
- La durée d'amorçage
- Microenvironnement (cytokines, facteurs de croissance, stimulants)
- Infections/maladies
- Lésions tissulaires
- Moment de l'engagement des cellules CSM-T

1.2. Utilités thérapeutiques des CSM

Les CSM sont un outil efficace pour la thérapie cellulaire des maladies inflammatoires (à médiation immunitaire et dégénérative) en raison de leur potentiel immunomodulateur, immunosuppresseur et régénérateur.

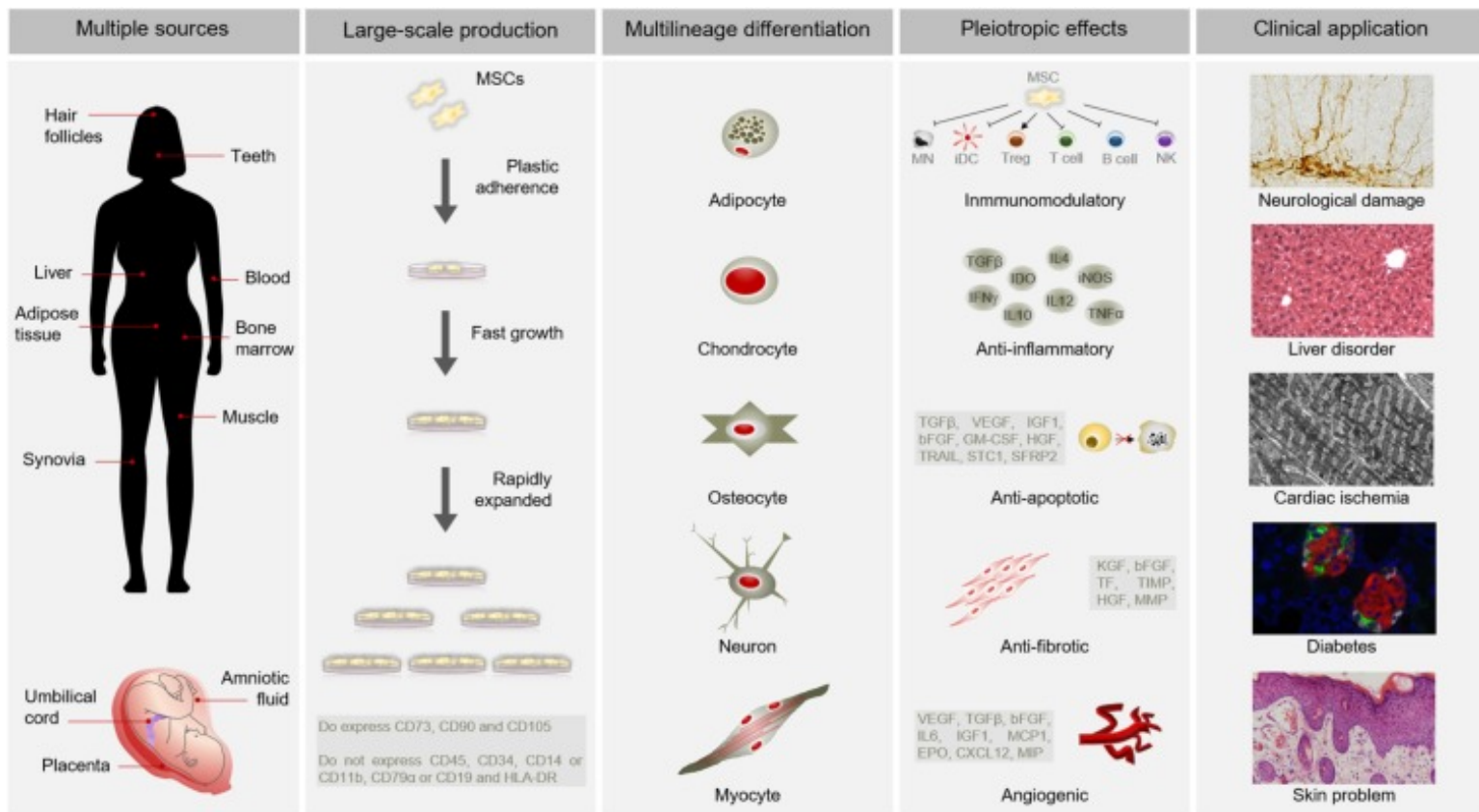
Les cellules souches mésodermiques représentent une faible densité des cellules médullaires (0,001 à 0,01% selon Pittenger et al., 1999), mais c'est pourtant la source la plus utilisée à ce jour car l'isolement et l'amplification *in vitro* sont des processus assez aisés (Escacena et al. 2015) mais ils sont cependant limités par une diminution des capacités prolifération et de différenciation dues à la sénescence cellulaire (Banfi et al. 2000).

Les sources sont facilement accessibles par des méthodes peu invasives (sang périphérique et tissu adipeux ou CSM isolées à partir de la Gelée de Warthon du cordon ombilical). Les CSM peuvent permettre de produire un médicament spécifique au patient dans le cas d'un usage autologue. Les CSM peuvent aussi être utilisées en allogénique grâce à leur propriété immunomodulatrice.

Figure 7 Avantages de l'utilisation des CSM en thérapeutique (Hmadcha et al. 2020)

La plasticité des CSM confère des avantages en matière de régénération des tissus grâce à :

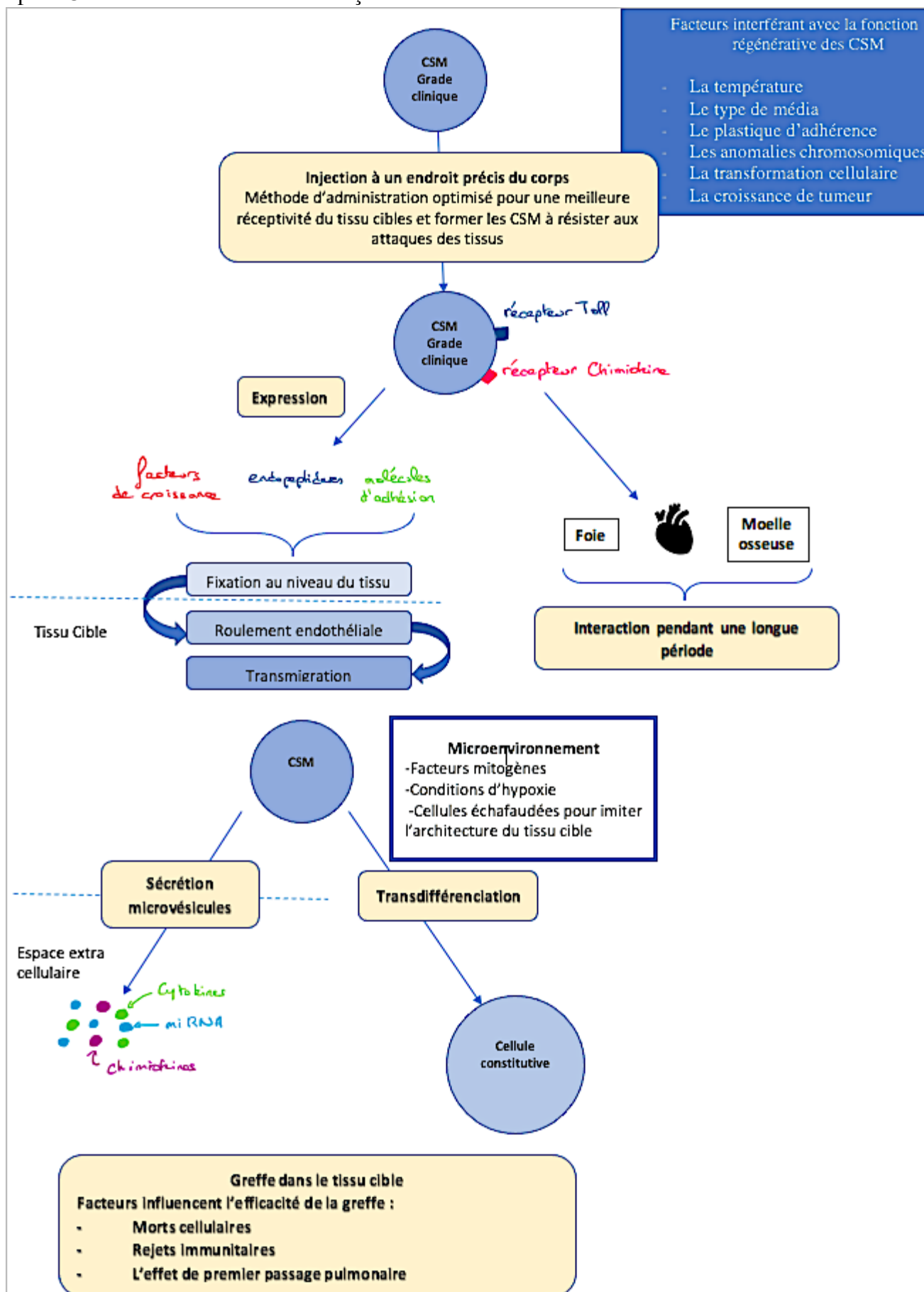
- Leur potentiel de différenciation de sources et de lignées différentes
- Leur capacité de migrer vers des sites endommagés en réponse à des signaux environnementaux
- Leur aptitude à favoriser la régénération des tissus grâce à la libération de facteurs paracrines ayant des effets pléiotropiques.
- Leur capacité à inhiber le système immunitaire
- Leur capacité à favoriser la survie des cellules
- Leur compétence à induire l'angiogénèse



Même si l'analyse des essais cliniques, de la première génération de thérapies utilisant les CSM ont montré leur innocuité (Lalu et al. 2012), il reste de nombreuses zones d'ombre sur la compréhension de leur efficacité thérapeutique et leurs mécanismes d'actions en raison de l'hétérogénéité des CSM.

Figure 8 Protocole d'études in vitro :

Grâce aux propriétés des CSM, on peut réaliser de nombreuses études *in vitro* qui aboutiront à de nouvelles thérapies. Ces études sont menées de la façon suivante



Plusieurs paramètres rentrent en compte dans l'efficacité et l'innocuité de ces thérapies :

Sources de CSM	- Moelle osseuse, cellules adipeuses et annexes embryonnaires - Selon la source, les CSM sont hétérogènes : différent par leurs propriétés d'adhérence plastique, leur taux de prolifération , leur nombre de passage jusqu'à la sénescence
Mode de conservation des cellules	- Choix de cellules fraîches issues de cultures et au métabolisme actif - Choix de cellules congelées : elles peuvent subir des altérations transitoires du métabolisme et de leur intégrité en rapport au processus de cryostockage et de décongélation (X. Yuan, Logan, et Ma 2019), ce qui a un impact sur la persistance <i>in vivo</i> puisque ces cellules activent davantage le système immunitaire et sont soumises à une clairance plus rapide. Mais elles ont l'avantage d'être conservées de nombreuses années. (Sierra-Parraga et al. 2020)
Physiologie des cellules	- La nécrobiologie et le métabolisme cellulaire entrent en jeu entre l'hôte et le produit cellulaire : en réponse aux cellules mourantes/mortes et aux particules subcellulaires, le receveur va réagir ce qui va affecter l'efficacité thérapeutiques.
Donneur	Ces 3 critères ont un impact sur les activités immunosuppressives et le rendement - Age (vieillesse <i>in vivo</i> des donneurs) : plus le donneur est âgé plus le ratio de cellules apoptotiques est grand, le taux de survie lent et la capacité de différenciation faible. (Andrzejewska, Lukomska, et Janowski 2019) - Genre (Siegel et al. 2013) - Comorbidité
Conditions et normes de production	- Conditions d'amplification - La composition du milieu de culture ou l'amorçage des cellules - La préparation aux environnements <i>in vivo</i> difficiles (Boland et al. 2019) - L'impact du vieillissement <i>in vivo</i> .
Type de produit	En fonction de la qualité et de la quantité dont on a besoin.
Besoin individuel	De la quantité de cellule nécessaire, du timing (besoin immédiat, moyen et long terme) et le type de pathologie du receveur.
Protocole complémentaire	<u>Protocole de traitement complémentaire</u> : ce protocole doit permettre d'obtenir un bénéfice thérapeutique optimal à court moyen et long terme
Dosage du produit	Il est nécessaire d'administrer un nombre suffisant de cellules pour atteindre la dose efficace : - Actuellement, une dose thérapeutique typique de CSM est entre 1 et 10. 10 ⁶ cellules/kg, on parle de CSM/kg. Les volumes varient en fonction de la voie d'administration et du tissu cible. La plupart des blessures corporelles de cette taille ne posent pas de problème et il est clair que cette dose "thérapeutique" de CSM est destinée à initier ou augmenter une réponse de réparation de l'organisme plutôt qu'à servir de remplacement "cellule pour cellule" (Pittenger et al. 2019). - Ainsi lors d'un infarctus du myocarde, 1/8 ^{ème} du volume du cœur est détruit : la dose thérapeutique n'est donc pas suffisante pour remplacer l'intégralité du tissu détruit mais on va s'appuyer sur les fonctions réparatrices des CSM pour régénérer le tissu. Cela prouve que la greffe de cellules n'a que peu d'impact par elle-même puisque moins de 1% des cellules greffées sont retrouvés sur le site greffé.
Mode d'administration	- Le mode d'administration de la thérapie (locale ou systémique) influe sur les réponses immunitaires innées et adaptatives de l'organisme ainsi que sur la survie et la fonctionnalité des CSM, ce qui altère le résultat clinique (Sierra-Parraga et al. 2020). Trois voies de perfusion sont possibles : - <u>Systémique</u> : intraveineuse, intra artériel et inhalation - <u>Locale</u> : topique, pulvérisation cellulaire, gel, injection sous cutanée avec un hydrogel, injection intrapéritonéale, intramusculaire, intracardiaque et intrathécale - <u>Construction d'un support (procédé local)</u> : on encastre des cellules au sein d'une structure (ex : des greffes vasculaires ou encore des injections intra-osseuse)

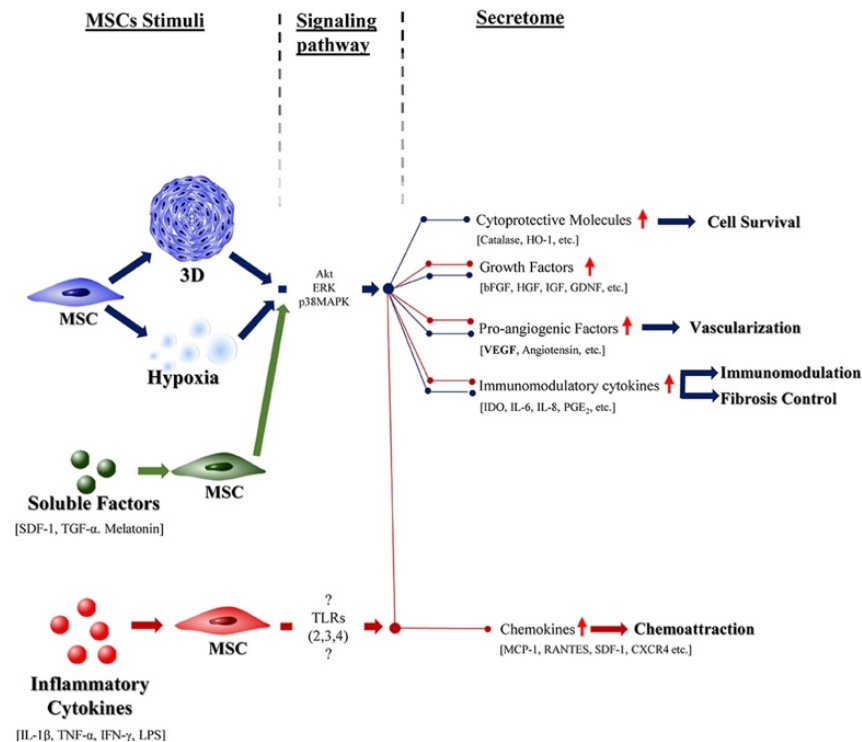
	<p>Dans le cadre de leurs recherches sur le traitement des lésions post-traumatiques du système nerveux périphérique, Masgutov étudie un nouveau mode d'administration. Les cellules autologues sont facilement greffées mais ne persistent pas au niveau de la lésion. Les cellules sont éliminées ou inhibent la régénération par la formation de cicatrices et le développement de neurones. Masgutov et ses équipes utilisent de la colle de fibrine pour fixer les CSM sur les sites lésés et fournir un support de matrice extracellulaire.</p> <p>L'étude suggère donc que la thérapie des CSM utilisant de la colle de fibrine est une méthode sûre et efficace de greffe de cellules dans les cas de lésions du nerf sciatique, et que cette méthode d'administration de stimulants de régénération pourrait être bénéfique pour le traitement réussi d'autres affections du système nerveux central et périphérique. (Masgutov et al. 2019)</p>
<p>Évaluation de la sécurité avant, pendant et après le traitement</p>	<p>- On peut utiliser le modèle murin dans le cadre de la maladie du greffon contre l'hôte pour comparer les avantages thérapeutiques des origines tissulaires (cordon ombilical, moelle épinière, et tissus adipeux). Grégoire et al. ont ainsi comparé l'impact de la source de CSM sur la fonction des cellules T :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Les effets sur les cellules immunitaires sont différents selon l'origine du tissu (puissance de l'inhibition des lymphocyte et induction du rapport de cellules T). ○ Aucune source de CSM n'a été significativement efficace pour empêcher la mort par la maladie du greffon contre l'hôte GVHD. ○ L'étude suggère de vérifier le profil de sécurité des cellules d'origines adipocytaire et ombilicale qui ont une activité pro coagulante <i>in vitro</i>. (Grégoire et al. 2019) <p>- Afin de limiter les mécanismes de protection et la sensibilité aux attaques du système du complément, une étude analyse l'impact de l'allo-sensibilisation après administration locale de CSM adipocytaires allogéniques (Darvadstrocel). Ce phénomène de pré sensibilisation pourrait réduire le taux de rejet immunologique : c'est une piste de développement de gestion des problématiques d'immunogénicité (histocompatibilité donneurs-receveurs, réponses immunitaires) (Avivar-Valderas et al. 2019)</p>
<p>Mécanisme d'action du produit et de ses dérivés</p>	<p>A) La diaphonie multifactorielle qui se base sur 2 éléments :</p> <p>1) Préconditionnement des CSM (figure 9):</p> <p>- Ce préconditionnement des CSM s'appuie sur leur fonction paracrine induisant des échanges constants de ces cellules avec leur microenvironnement. Ce préconditionnement des CSM permet de moduler leurs</p> <p>(1) Potentiel de différenciation, (2) Marqueurs, (3) Phénotype immunologique, (4) Propriétés immunorégulatrices. On peut pré conditionner les CSM de 4 façons :</p> <p>a) En agissant sur leur structure 3D :</p> <ul style="list-style-type: none"> - En conditionnant les CSM sous forme de sphéroïdes, il y a une production de facteurs de survie, de prolifération cellulaire et de vascularisation. - Une des explications est l'hypoxie créée au niveau des couches internes <p>b) En utilisant des facteurs pharmacologiques (atorvastatine, ocytocine, curcumine...):</p> <ul style="list-style-type: none"> - On utilise par exemple des cellules contenant de l'héparine et de l'albumine au lieu du plasma cela permet d'obtenir de meilleures réponses thérapeutiques. (Ringden et al. 2018) <p>c) En utilisant des conditions d'hypoxie :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ces conditions renforcent les propriétés régénératrices et réparatrices des CSM (Hu et al. 2016), maintiennent leur multipotence (Hawkins, Sharp, et McKay 2013), augmentent leur capacité de prolifération (Berniakovich et Giorgio 2013) et augmentent leur sécrétion de molécules cytoprotectrices (Lan et al. 2015) - Les protocoles peuvent varier en fonction de la tension en oxygène et altérer la capacité de différenciation ainsi que leur production paracrine <p>d) En utilisant des cytokines, facteurs de croissances et des hormones :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les cytokines pro-inflammatoires augmentent la production de facteurs impliqués dans la réponse immunitaire, ce qui entraîne une chimio-attraction de cellules immunitaires, une modulation de l'inflammation, une amélioration de la migration et du homing. - Facteurs de croissance et hormones stimulent l'angiogenèse et inhibent la fibrose par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines inflammatoires, de constituants de la matrice et d'enzymes dégradantes. <p>2) Utilisation de la richesse du sécrétome des CSM :</p>

- Le sécrétome des CSM contient des facteurs solubles, cytokines, chimiokines, molécules immunomodulatrices et des facteurs de croissance dans des vésicules extracellulaires, dont la sécrétion permet une communication entre les CSM et les cellules immunologiques.
- Ces éléments confèrent aux CSM leurs propriétés pro-régénératrices : modulation du système immunitaire, inhibition de la fibrose et de l'apoptose, stimulation de la vascularisation, recrutement d'autres cellules et remodelage des tissus.
- Ainsi dans l'étude de Linero (Linero et Chaparro 2014), des CSM issues de tissus adipeux ont pu régénérer des lésions mandibulaires chez le lapin. *In vitro* on a pu déceler des 43 facteurs pro-angiogéniques notamment certains ayant un rôle décisif dans la régénération osseuse.
- D'autres études ont prouvé que les tissus lésés pouvaient être réparés grâce à l'activité paracrine et les vésicules extracellulaires issus des CSM (infarctus du myocarde, dommages neuronaux, maladies rénales). Cependant, ces études sont rares malgré la sécurité et la faisabilité de ces méthodes.

B) **La diaphonie secondaire ou signalisation directe** : une signalisation directe indépendante des vésicules extracellulaires existe. Une étude (Carreras-Planella et al. 2019), démontre l'effet immunomodulateur des CSM sur les cellules B indépendamment des vésicules extracellulaires. Cette diaphonie secondaire est dépendante du système immunitaire du receveur et du tissu de l'hôte

- L'inconvénient de ce mécanisme est la durée variable d'initiation des réponses secondaires qui complique les tentatives de modélisation de la cinétique et du dosage en pharmacologie cellulaire.

Figure 9 Préconditionnement des CSM (Ferreira et al. 2018)



1.3. Domaines d'application des CSM

Les cellules souches mésenchymateuses ont plusieurs domaines d'applications : les troubles et maladies d'origine immunitaire, le cancer et la médecine régénérative

1.3.1. Troubles immunitaires

Les CSM sont capables d'améliorer l'immunité dans les modèles animaux de :

- Septicémie (Németh et al. 2009)
- Maladies auto-immunes (Constantin et al. 2009; Rafei et al. 2008)
- Maladies neurodégénératives (T. Ma et al. 2013)
- Maladie du greffon contre l'hôte (Polchert et al. 2008)

Ces thérapies ne sont pas accessibles à tous en raison du coût de fabrication et de la réglementation. En effet, les résultats des essais cliniques et des thérapies mises en place dans certains pays dépendent des variabilités qualitatives entre les préparations de CSM. L'absence de procédures de fabrication normalisées, telles que l'hétérogénéité des donneurs, la variabilité de l'origine des tissus (tissu adipeux et moelle épinière), la cryopréservation des cellules, l'expansion des cultures, la dose et le moment d'administration, l'hétérogénéité des biomarqueurs inflammatoires de l'hôte et l'immunogénicité figurent également parmi les variables (Galipeau 2013; Galipeau et Sensébé 2018).

La normalisation des CSM de qualité clinique permettra de mieux servir les futurs essais cliniques et facilitera l'approbation clinique internationale. Il est tout aussi important d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de polarisation des CSM et leur devenir après l'accouplement (Duijvestein et al. 2010; Lechanteur et al. 2016; Russell et al. 2018; Grégoire et al. 2019).

1.3.2. Traitements et gestion du cancer

On compte 25 essais cliniques visant à utiliser les CSM pour cibler directement le cancer (14 essais) et minimiser les effets secondaires des traitements anticancéreux (9 essais) :

On cherche à utiliser **l'effet chimio-attractif** des CSM (

Figure 10) :

- Comme les tissus lésés, les microenvironnements tumoraux recrutent des CSM notamment *via* la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 (Kalimuthu et al. 2017). D'autres molécules contrôlent la migration des CSM vers les tumeurs.
- On utilise le potentiel des transporteurs des CSM afin de délivrer sélectivement des charges anticancéreuses au niveau des tumeurs. Leur capacité inhérente à migrer vers les sites tumoraux leur permet d'être utilisées comme un vecteur thérapeutique délivrant des agents suppresseurs de tumeur.

La stratégie consiste à améliorer la charge utile et la capacité de livraison des CSM. Plusieurs techniques sont utilisées et doivent être améliorées :

- CSM modifiés par génie génétique : elles vont exprimer les agents suppresseurs de tumeurs.
- CSM conçues pour transporter des miARN spécifiques : ces CSM ont des propriétés anticancéreuses
- CSM contenant des virus oncolytiques
- CSM chargées de médicaments anticancéreux
- CSM chargées de médicaments encapsulés dans des nanoparticules : cette technique permet une accumulation préférentielle des CSM sur le site cible, en empêchant la libération par éclatement et en réduisant les effets secondaires.

La fonction paracrine est utilisée dans la régulation du cancer et celle-ci est médiée par de multiples facteurs pouvant être directement sécrétés dans l'espace extracellulaire ou conditionnés dans des vésicules extracellulaires pour être diffusés dans le milieu de la tumeur (Rani et al. 2015). Ces facteurs affectent :

- Les processus cellulaires impliquant le cycle de vie des cellules tumorales (Fathi, Sanaat, et Farahzadi 2019),
- La survie des cellules,
- L'angiogenèse
- L'immunomodulation

Les CSM peuvent réguler le cancer par 2 effets :

1) **Effet anti-tumoral (Figure 11)** : les CSM induisent un arrêt du cycle cellulaire et réduisent la croissance du cancer (Lu et al. 2019). Cet effet anti-tumoral est lié à certaines propriétés des CSM :

- Libération d'agents cytotoxiques par les CSM induisant l'apoptose dans différents types de cancer. Ainsi les CSM de la moelle osseuse favorisent l'apoptose et suppriment la croissance des cellules du gliome U251 par une régulation à la baisse de la voie de signalisation PI3K/AKT (Lu et al. 2019).
- Les CSM inhibent l'angiogenèse tumorale. Ainsi les CSM de la moelle osseuse restreignent la croissance vasculaire dans les xénogreffes de gliomes Gli36 par une régulation à la baisse de l'axe PDGF/PDGFR.
- Les CSM provoquent des réponses immunitaires anti-tumorales par la libération de médiateurs inflammatoires, tels que la cytokine multifonctionnelle TGF β . Outre les fonctions pro-tumorales, la signalisation de TGF β a des effets suppressifs sur le cancer (Guasch et al. 2007).

2) **Effet pro-tumoral (Figure 11)** : les CSM se différencient pour contribuer directement à la progression du cancer (Aoto, Ito, et Aoki 2018). Cet effet pro-tumoral est lié à certaines propriétés des CSM :

- Effets pléiotropiques des CSM : les CSM peuvent augmenter l'invasion tumorale, inhiber l'apoptose des cellules tumorales en sécrétant des facteurs de survie (VEGF et bFGF) et soutenir l'angiogenèse tumorale.
- L'immunomodulation des CSM contribue à la pathogénèse du cancer en libérant des facteurs inflammatoires qui favorisent les effets immunosuppresseurs.
- La différenciation des CSM en cellules capables de favoriser la tumorigenèse
- La chimio-attraction des CSM : ainsi, l'engouffrement des cellules cancéreuses du sein par les CSM entraîne des modifications du profil du transcriptome des cellules tumorales. Cet engouffrement des CSM améliore la transition épithéliale-mésenchymateuse, la solidité, l'invasion et les métastases du cancer du sein (Y.-C. Chen et al. 2019).

L'utilisation des CSM pose un problème de sécurité et d'innocuité. Des facteurs influencent l'effet que peut avoir les CSM au niveau de la tumeur (Bajetto et al. 2017), en particulier :

- La source de tissus des CSM
- La dose
- Le timing d'administration des CSM
- La méthode d'administration des cellules
- Le type d'interaction : direct (cellule à cellule) ou indirecte (libération de facteurs solubles)
- L'état pathologique du patient (Pérez, de Lucas, et Gálvez 2018; Rivera et al. 2019)

Il est important de noter qu'une étude clinique récente a montré que les CSM dérivées de la moelle osseuse ne parvenaient pas à se fixer sur les sites de cancer de la prostate, une observation liée à l'absence de signaux inflammatoires, qui dictent généralement la migration des CSM (Schweizer et al. 2019).

Ces données pourraient également remettre en question l'inanité des CSM allogéniques non modifiées à héberger des tumeurs sans reprogrammation (Serakinci et Cagsin 2019).

Malgré les avancées, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions entre cellules cancéreuses et CSM afin de :

- Garantir une haute sécurité clinique
- Trouver des solutions pour améliorer la greffe et la survie efficace des CSM pour ainsi potentialiser leurs applications thérapeutiques.

Nous verrons plus tard dans ce travail comment l'alliance entre les CSM et les biomatériaux peut améliorer la rétention des cellules greffées.

Figure 10 Modèle de migration des CSM induite par les chimio-attracteurs vers une lésion tumorale (Hmadcha et al. 2020)

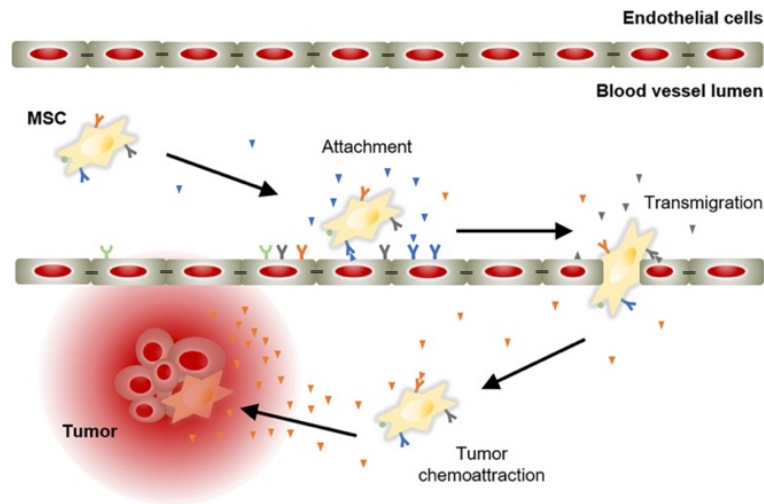
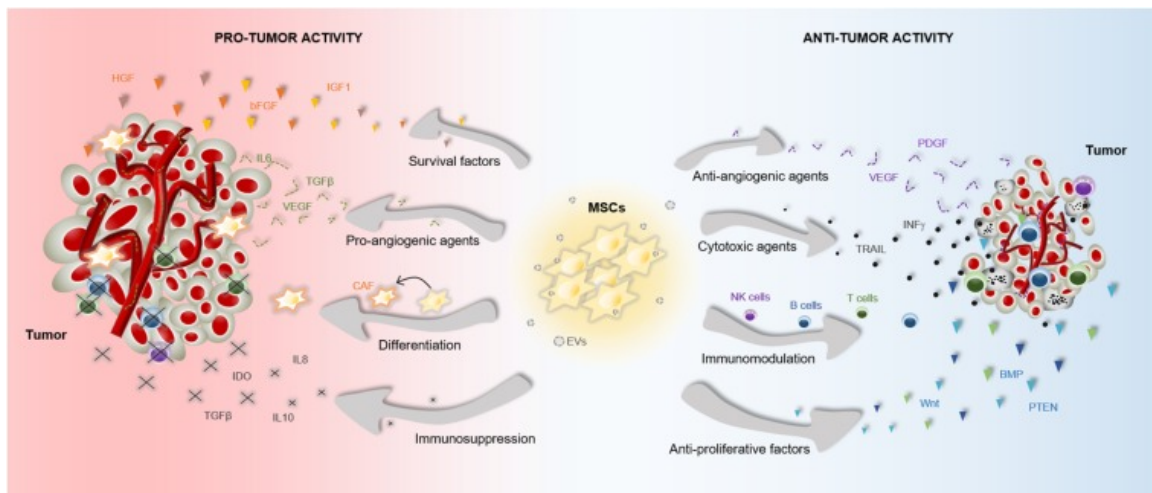


Figure 11 Les effets pros et antis tumoraux des CSM (Hmadcha et al. 2020)



1.3.3. Immunothérapie contre le cancer

Les CSM peuvent susciter une immunité générale et/ou spécifique à un antigène, sans être eux-mêmes immunogènes car (Shammaa et al. 2020):

- Les CSM sont spécifiques au contexte pro-inflammatoire : elles renforcent l'immunité humorale et cellulaire.
- Les CSM sont génétiquement modifiables, ce qui en fait des véhicules appropriés pour produire et sécréter des cytokines ou des antigènes solubles qui évoquent des réponses immunitaires. Les CSM peuvent agir comme des APC (cellules présentatrices d'antigènes) capables de traiter et de présenter des antigènes exogènes pour activer les cellules immunitaires. Cet actif fait surface en réponse au traitement par l'IFN- γ qui induit l'expression par les CSM de molécules MHC I/II.

1.3.4. Médecine régénérative

Plus tard dans ce travail, nous verrons plus en détails les applications des cellules souches mésenchymateuses à la médecine régénérative pour traiter de multiples pathologies : diabète, atteintes osseuses et cartilagineuses, troubles neurologiques, pathologies cardiaques...

Cependant à la suite de nombreuses études, on se rend compte que l'administration de CSM n'est que **transitoire** sur le site de lésion. Les CSM doivent activer des mécanismes dans la niche de l'hôte afin de contribuer à la réparation des tissus.

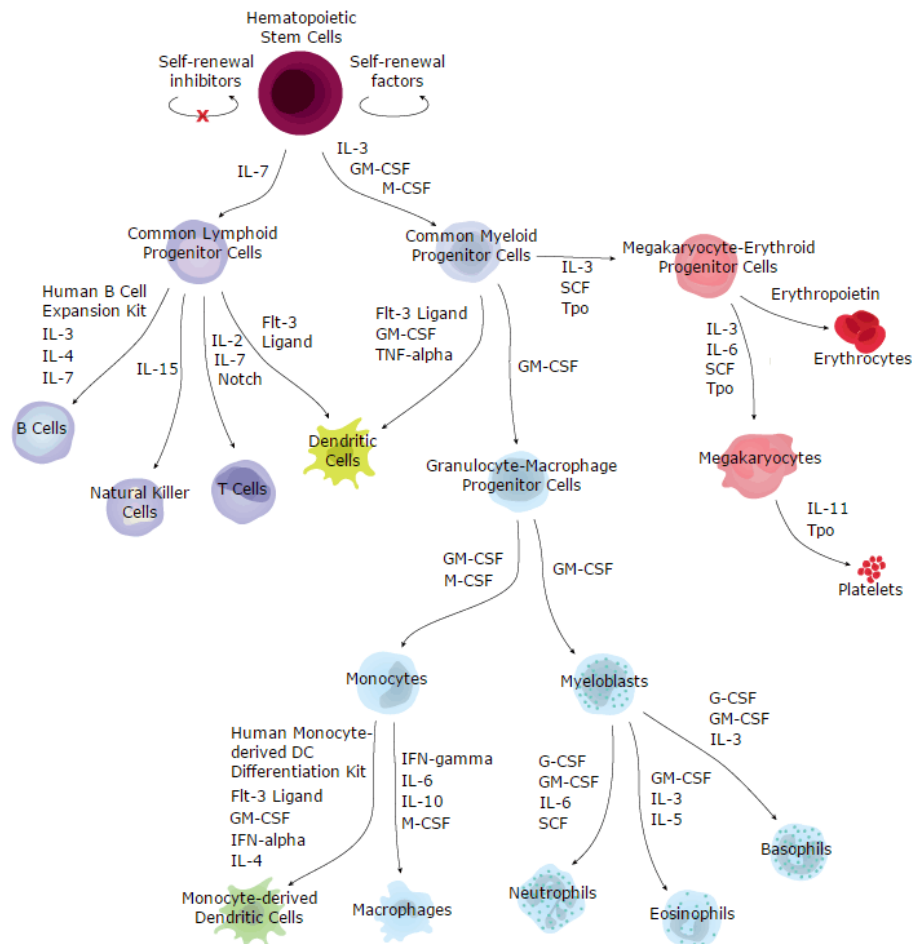
Nous verrons également que l'utilisation combinée de CSM et de biomatériaux permet l'optimisation des capacités des CSM malgré leur courte présence et leur disparition.

Aujourd'hui 921 essais cliniques ont utilisé les CSM comme intervenants primaires, dont 704 entre 2011 et 2019. Il montre le potentiel des CSM pour améliorer les maladies dégénératives et leurs implications dans le maintien de la physiologie des tissus.

2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

2.1. Définition et vue d'ensemble des CSH

Figure 12 Vue d'ensemble des cellules souches hématopoïétiques et des marqueurs spécifiques aux lignées (« Hematopoietic Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers » s. d.)



Les CSH se définissent comme des **progéniteurs multipotents** et **auto-renouvelables**. Les CSH sont le point de départ du processus d'**hématopoïèse** à partir duquel les cellules sanguines différenciées et matures naissent et se renouvèlent constamment afin d'assurer l'homéostasie du tissu sanguin.

- Elles génèrent deux lignées de **progéniteurs oligopotents** : **myéloïdes** et **lymphoïdes**. Ces progéniteurs différenciés ont des marqueurs spécifiques de lignées à leurs surfaces (récepteurs de cytokines et protéines de différenciation).
- Le système hématopoïétique doit assurer la production nécessaire afin de maintenir l'équilibre du système puisque les cellules sanguines matures ont une durée de vie limitée. L'hématopoïèse produit les monocytes, lymphocytes, plaquettes, érythrocytes, neutrophiles, les éosinophiles, et les basophiles.

L'autorenouvellement maintient un pool de CSH tout au long de la vie. Cependant, ce pool est limité dans le temps *in vivo* et *in vitro* :

- Ce pool est régulé par des chimiokines, des cytokines, des molécules et leurs récepteurs de signalisation intracellulaire. Les cytokines et les facteurs de croissance (interleukines et les facteurs de stimulation des colonies) activent la signalisation intracellulaire responsable de la différenciation.

- Il n'est pas possible de générer des lignées de cellules souches hématopoïétiques (comme on le ferait pour les cellules souches embryonnaires) puisqu'à mesure des divisions cellulaires, les télomères se raccourcissent puis les cellules entre en sénescence et enfin en apoptose.
- Le LTC-IC : long term culture-initiating cell, est un test qui permet après culture de cellules médullaires dans un milieu contenant des facteurs hématopoïétiques, l'identification de précurseurs pouvant générer des cellules sanguines. (Sutherland et al. 1990)

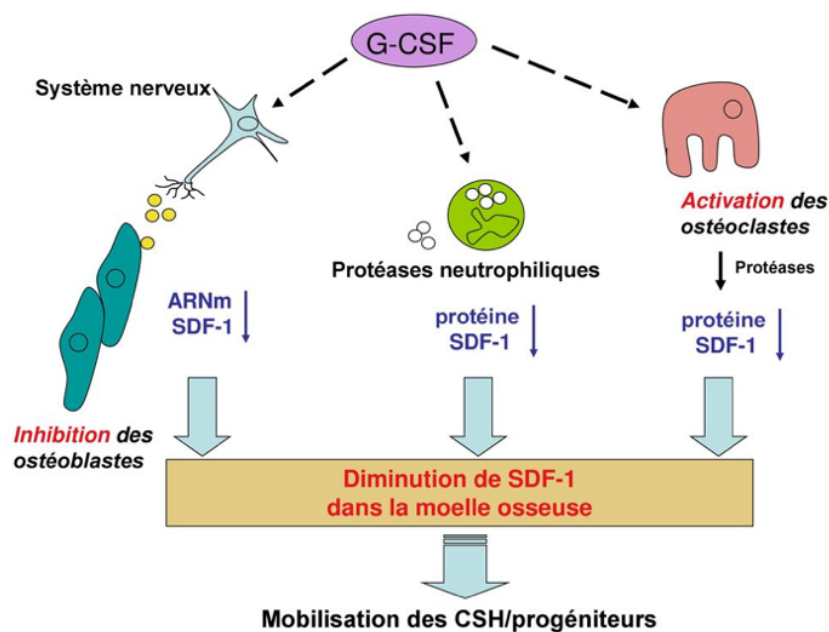
On retrouve l'hématopoïèse au sein du :

1) Placenta et foie du fœtus

2) Sang de cordon : on tire profit de l'immaturation du système immunitaire fœtal, ce qui donne un faible pouvoir d'immunogénicité aux CSH. Cette source est très utilisée dans les greffes allogéniques

3) Sang périphérique : il contient 0,1% de CSH. Afin de faire affluer les CSH vers le sang périphérique (facile d'accès), on utilise pour ces mobilisations le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) (**Figure 13**) ou l'antagoniste du récepteur CXCR4 (plerixafor). Cette technique de mobilisation est utilisée pour les greffes autologues et allogéniques (dans le cas de don de moelle osseuse, on peut choisir la technique de prélèvement).

Figure 13 Méthode de mobilisation par des facteurs de stimulations des colonies de granulocyte G-CSF (Richman, Weiner, et Yankee 1976)



4) Moelle osseuse :

- Les CSH représentent 0,01% des cellules de la moelle osseuse.
- Elle est utilisée lors des greffes allogéniques.
- La structure spatiale de la moelle osseuse est ordonnée : elle constitue un microenvironnement de soutien pour le maintien de l'hématopoïèse grâce aux facteurs de croissance, à la matrice extracellulaire et aux chimiokines.
- La survie, la prolifération et la différenciation des CSH se font grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques : une cellule reste au sein de la niche pour assurer la fonction de réserve et l'autre quitte la niche pour se différencier et proliférer.

Au sein de la moelle osseuse, il y a deux niches identifiées :

- Niche vasculaire localisée au niveau de la région médullaire centrale : cette niche vasculaire est mobilisée par la migration trans-endothéliale afin de rejoindre la circulation périphérique.
- Niche ostéoblastique au niveau de la surface endostéale : cette niche contient la grande majorité des CSH et produit un environnement propice à la quiescence (phase G0) et à la survie des CSH. Les molécules d'adhésion (N-cadhérine, intégrines) permettent aux CSH de rester au sein de cette niche en se fixant à la matrice extracellulaire (Gigant et al. 2001)

On caractérise les CSH non pas par leur morphologie mais par :

- L'absence de marqueurs de surface (CD38, CD10, CD14, CD15)
- La présence de certains autres marqueurs de surface

Tableau VI Marqueurs de surface permettant la caractérisation des CSH (Shizuru, Negrin, et Weissman 2005)

Marqueurs de surface	Rôles et fonctions
CD34, Thy-1	Glycoprotéine responsable de l'adhérence et des migrations des CSH
CD133	Glycoprotéine (Wognum, Eaves, et Thomas 2003)
CD117	Protéine réceptrice des cytokines SCF
CXCR4	Protéine réceptrice des cytokines SDF-1
VLA-4, VLA-5	Intégrines responsables de l'adhérence aux protéines de la matrice extracellulaire

Les CSH peuvent reconstituer le système hématopoïétique d'un individu greffé (en cas d'hémopathies malignes ou d'anémie) grâce à leurs capacités de greffe :

- Autologue : cellules du patient greffées (en cas de chimiothérapie, on procède à un prélèvement des cellules avant celle-ci puis les CSH sont réinjectées).
- Allogénique : cellules d'un donneur apparenté ou non, nécessite une histocompatibilité du système HLA
- Synergique : cellules d'un donneur qui est le jumeau identique du patient receveur

Malgré les 40 ans de recul que l'on a sur les greffes de CSH restent risquées car des limites subsistent. En effet, *in vitro* :

- Le nombre de CSH est limité par la sénescence
- Le recueil des CSH est difficile notamment pour le maintien de la qualité des prélèvements
- Il y a des risques d'infection ou d'immunoréaction
- Il faut un donneur compatible (même s'il y a un accroissement du nombre de donneurs)

Les propriétés fonctionnelles et structurelles font des CSH des éléments clés dans le traitement des :

- Insuffisances de la moelle osseuse
- Malignités
- Tolérance immunitaire
- Maladies auto-immunes

Les CSH sont extrêmement bien connues et disponibles pour un usage clinique : elles constituent un bon outil pour le développement de traitements de médecine régénérative.

2.2. Les différents types de greffe de CSH

Traitement préparatoire (conditionnement). Il faut administrer au patient une chimiothérapie ou une radiothérapie à forte dose (ou les deux) avant une greffe de cellules souches pour :

- réduire le risque que les cellules immunitaires du receveur d'une greffe allogénique de cellules souches standard rejettent le greffon (cellules greffées)
- détruire entièrement toute maladie qui pourrait survivre au moment de la greffe chez les patients atteints d'un cancer du sang
- éliminer les lymphocytes (globules blancs) dysfonctionnels qui s'attaquent aux cellules sanguines en développement du patient, causant dans certains cas un dysfonctionnement de la moelle osseuse, comme dans le cas de l'anémie aplasique

Les conditionnements myéloablatifs reposent sur l'association de chimiothérapies seules ou sur l'association d'un traitement par chimiothérapie et d'une irradiation corporelle totale. Pour éviter le rejet de la greffe, lorsque le greffon n'est pas géno-identique, le conditionnement comprend, le plus souvent, l'administration de sérum anti-lymphocytaire.

L'objectif du **conditionnement non-myéloablatif** est l'utilisation de doses suffisamment fortes pour éviter le rejet, mais suffisamment faible pour permettre aux cellules du greffon une action contre les cellules tumorales du receveur.

Tableau VII Différents types de greffes de CSH

Origine des cellules	Type de prélèvement	Donneur	Avantages	Inconvénients	Indications
Cellules souches de moelle osseuse	Prélèvement de moelle sous anesthésie générale au bloc opératoire par ponction des crêtes iliaques et aspiration de 600 ml à 1200 ml de moelle osseuse selon les masses corporelles - 48 heures d'hospitalisation pour le donneur - Les travaux de Thomas ont démontré que la procédure de perfusion de moelle osseuse pouvait se faire en toute sécurité. Cependant, il est nécessaire de procéder à une chimiothérapie et une irradiation intensive complète de l'ensemble du corps (Thomas et al. 1957).	Autogreffe	- Bonne faisabilité - Moyenne d'âge plus élevée - Mortalité moindre car : → Pas de GVH → immunodépression moindre	- Aplasie courte avec risque de mucite - Plus de rechute car → pas de GVH → immunodépression moindre	Lymphomes et myélomes
		Allogreffe	- Pas de douleurs, ni fatigue post prélèvements - Nombre de CSH plus élevé que dans la moelle osseuse - Taux de rechute plus faible dû à l'effet de la GVT maximisé par le nombre de cellules T régulatrices	- Aplasie - Le rejet du greffon - La réaction du greffon contre l'hôte ou GVH : les cellules T du donneur ont la capacité de repérer et entraîner la mort des cellules tumorales du receveur (Barnes et al. 1956) - GVHD : cellules réactives T du donneur dans l'attaque des tissus de l'hôte. même si le donneur est histocompatible et qu'un traitement immunosuppresseur est mis en place, la moitié des patients ayant subi une greffe allogénique contractent la GVHD (Blazar, Murphy, et Abedi 2012). Il existe 2 approches visant à renforcer les effets positifs du GVT et supprimer ceux du GVHD : → Ciblage des antigènes de l'histocompatibilité (Bonnet et al. 1999) → Utilisation des cellules T régulatrices pour maintenir l'effet de la GVT et modifier la GVHD et des cellules NK pour augmenter les effets de la GVT et éviter la GVHD. (Zorn 2006; Miller et al. 2005) - La maladie veino-occlusive - immunodépression : infections fongiques et parasitaires - Séquelles iatrogènes : Stérilité, cataracte, nécrose de la tête fémorale et psychologiques	- Hémopathie maligne chimio-sensible mais dont les facteurs pronostiques font craindre une rechute : → Leucémie aiguë → myélodysplasie → lymphome ou myélome → Leucémie myéloïde chronique - hémopathie non maligne de pronostic sévère : → Constitutionnelle : Fanconi, drépanocytose, thalassémie homozygote → Acquisée : aplasie médullaire avec critères de gravité.
Cellules souches de sang périphérique	Prélèvements ambulatoires sur 1-3 jours (après traitement de mobilisation aux cytokines de 5 jours) - Pas d'anesthésie générale - Afin d'éviter les échecs dû à l'insuffisance de CSH et progénitrices présentes dans la circulation périphérique, les chercheurs ont procédé à des procédures de mobilisation (Figure 13)	Autogreffe	- Pas de douleurs, ni fatigue post prélèvements - Nombre de CSH plus élevé que dans la moelle osseuse - Taux de rechute plus faible dû à l'effet de la GVT maximisé par le nombre de cellules T régulatrices	Nécessite une chimiothérapie mobilisatrice induisant une aplasie brève	- Restauration de l'hématopoïèse pour les leucémies granulocytaires chroniques. (Goldman 1979). - Cancer solide avec des chimiothérapie très myéloblastiante afin de permettre une meilleure sortie d'aplasie.
		Allogreffe	- Pas de douleurs, ni fatigue post prélèvements - Nombre de CSH plus élevé que dans la moelle osseuse - Taux de rechute plus faible dû à l'effet de la GVT maximisé par le nombre de cellules T régulatrices	- Douleurs osseuses chez certains donneurs - Rupture de la rate (McCullough et al. 2008) - Augmentation de l'incidence de GVHD chronique du aux nombres importants de cellules T régulatrices. Mais le nombre de GVHD aiguë et le taux de mortalité restent stables par rapport aux greffes de moelle osseuse	Hémopathie maligne chimio-sensible mais dont les facteurs pronostiques font craindre une rechute : → Leucémie aiguë → myélodysplasie → lymphome ou myélome → Leucémie myéloïde chronique Hémopathie non maligne de pronostic sévère : → Constitutionnelle : Fanconi, drépanocytose, thalassémie homozygote → Acquisée : aplasie médullaire avec critères de gravité.
Cellules souches de sang de cordon	Le sang de cordon est utilisable sans lien de parenté entre le donneur et le receveur : il est prélevé à la naissance et se conserve dans des banques publiques et privées en fonction de la réglementation du pays.	Allogreffe ou autogreffe	- Bonne tolérance - Source de CSH en cas d'absence de donneur HLA compatible - Risque de GVH moindre - Meilleure prise du greffon car capacité proliférative 10 à 20 fois supérieure. - Intérêt dans les minorités ethniques - Grand nombre de CSH très immatures - Pas de respect strict de l'HLA compatibilité.	- Risque d'infection dû au retard de greffe (Brunstein et al. 2010) - Le volume sanguin disponible : pour les adultes. (Eliane Gluckman et al. 2011) → Deux collectes peuvent être utilisées mais cela a un coût et une augmentation de l'incidence de la GVHD. (Wagner et al. 2014) → Une expansion ex vivo peut se faire mais il n'y a pas d'amélioration significative. (Kiernan et al. 2017)	Cas où le patient n'a pas de donneur apparenté ou compatible.

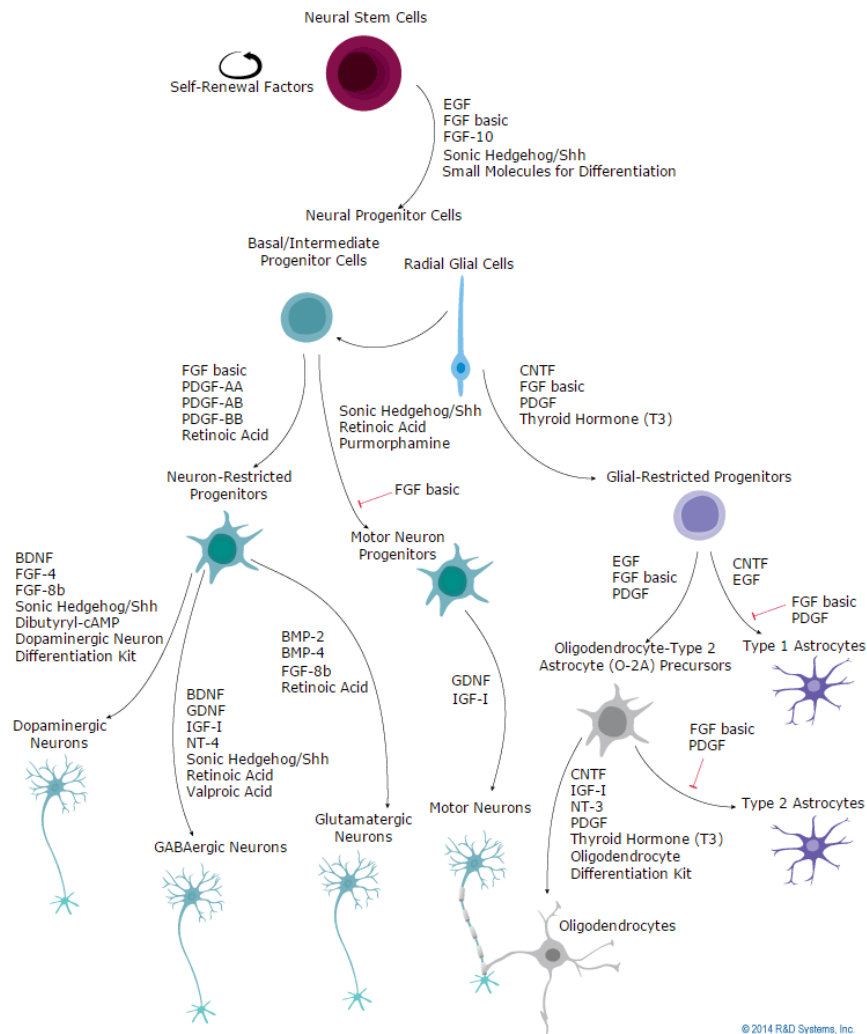
2.3. Utilisations thérapeutiques des CSH

Hémopathies malignes et cancers solides	<p>On peut utiliser la greffe de CSH qui est considéré comme un produit de thérapie cellulaire.</p>
Immunodéficience combinée sévère (SCID)	<p>La forme la plus répandue SCID présente un ensemble de défauts génétiques sur le chromosome X :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ces défauts modifient la chaîne gamma des interleukine (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) et perturbent le développement des cellules T et NK - Ces défauts présents dans les gènes activent la recombinaison, ce qui conduit à des récepteurs d'antigènes des cellules B et T non fonctionnels. <p>Les nourrissons atteints n'ont donc pas d'immunité humorale et cellulaire.</p> <p>L'ADA-SCID est la seconde SCID la plus répandue :</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'adénosine désaminase présente un défaut, provoquant une accumulation de désoxyadénosine et de désoxyadénosine triphosphate dans les cellules qui sont toxiques pour les lymphocytes. - Un traitement à base d'enzyme de substitution (PEG-ADA : adénosine désaminase conjuguée au polyéthylène glycol) existe mais comporte de nombreux effets indésirables. <p>La greffe de CSH allogénique a été identifiée comme un traitement de choix de la SCID mais son succès dépend de :</p> <ul style="list-style-type: none"> - De l'âge : la greffe fonctionne mieux sur les patients de moins de trois mois et demi - Des infections : la greffe fonctionne mieux sur les patients qui n'ont pas d'infection - Du donneur <p>Le protocole de traitement utilise :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Des greffons modifiés ou non et sans cellules T - Si le donneur est apparenté, il n'y a pas de conditionnement (taux de survie : 94%) - Si le donneur n'est pas apparenté, on procède à un conditionnement myéloablatif ou une immunosuppression (taux de survie : 58%) <p>De nouvelles pistes de thérapie génique sont explorées pour combler les manques de la thérapie cellulaire</p>
Transplantation d'organes solides	<p>Des traitements expérimentaux de greffe de CSH sont utilisés afin :</p> <ul style="list-style-type: none"> - D'induire la tolérance du système immunitaire - Permettre la transplantation de tissus sans rejet chronique et traitement immunosuppresseur. <p>En cas de tolérance, le système immunitaire répond aux antigènes étrangers mais accepte les tissus du donneur. Des essais cliniques ont été réalisés dans le cadre de la transplantation rénale.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une greffe de CSH induit un chimérisme durable à transitoires chez certains receveurs, ce qui permet le retrait des immunosuppresseurs. <p>Il est nécessaire de poursuivre ces pistes de recherches pour apporter une solution à long terme et sur plusieurs types tissulaires différents. (Oura, Cosimi, et Kawai 2017)</p>
Maladies auto-immunes	<p>Ces maladies entraînent la défaillance de l'auto-tolérance centrale et périphérique provoquant alors la génération de cellules T et B auto-réactives qui endommagent les tissus et les organes.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une grande partie de la population mondiale est touchée par ces maladies mais il n'existe aucun traitement. Différents degrés de ces maladies existent et certaines formes graves entraînent des résistances aux anti inflammatoires et immunosuppresseurs. - En greffant des CSH autologues : <ul style="list-style-type: none"> - Les CSH éliminent les cellules immunitaires auto-réactives et rétablissent le système immunitaire. - Le caractère génétique initial rend le risque de rechutes important. - La thérapie doit être mise en place le plus tôt possible. - La greffe allogénique peut être envisagée pour une guérison plus définitive mais il y a un risque élevé de GVHD. (Hügler et van Laar 2010)

3. Les cellules souches neurales (CSN)

3.1. Définition et vue d'ensemble des CSN

Figure 14 Vue d'ensemble des cellules souches neurales et des marqueurs spécifiques aux lignées (« Neural Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers » s. d.)



La neurogenèse et la prolifération se produisent tôt dans la vie : le système nerveux central (SNC) contient des cellules progénitrices mitotiquement inactives et incapables de générer de nouvelles cellules après une lésion. Les CSN possèdent des capacités de **prolifération, de multipotence** (différenciation dans les lignages neuronal, astrocytaire et oligodendrocytaire) et de migration qui s'expriment de manière différentielle selon leur environnement.

Dans le cerveau adulte on retrouve des niches de CSN :

- **zone sous-ventriculaire** qui contient une population de cellules hétérogènes :

→ **Les cellules de types B** : elles ont les propriétés des CSN de type astrogliale : à l'état quiescent dans les conditions physiologiques, elles peuvent être amenées à proliférer. C'est notamment le cas après une irradiation (Morshead et al. 1994).

→ **Les cellules de type C ou PAT** : ce sont des progéniteurs amplificateurs de transit à division rapide. Elles maintiennent la neurogenèse. En se différenciant, elles donnent des neuroblastes.

La neurogenèse continue et le soutien par les CSN de la zone ventriculaire permet le maintien du système olfactif chez les souris (Imayoshi et al. 2008).

- **zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe** : c'est la région responsable de la mémoire et de l'apprentissage siège une production de cellules granuleuses gliales (Morshead et al. 1994). Les cellules

ont un potentiel de prolifération plus limité, ce sont des cellules progénitrices (Bull et Bartlett 2005). La neurogenèse au sein de l'hippocampe permet d'augmenter la population de neurones (Imayoshi et al. 2008).

- **couche germinale externe du cervelet**

- **zone sous- ventriculaire du canal central** de la moelle épinière et la limite de l'ampoule (Conti et Cattaneo 2010; W. Li et al. 2011)

- **bulbe olfactif** où l'on retrouve des cellules de type C et des neuroblastes qui ont migrés *via* le flux migratoire rostral dont le phénomène reste inconnu (Curtis et al. 2007).

En liaison avec leur rôle majeur dans l'embryogenèse du système nerveux, les CSN présentent une **capacité migratoire élevée** en réponse à divers facteurs chimiotactiques :

- Les CSN expriment un grand nombre de récepteurs aux chimiokines (Ara et al. 2008)
- Les CSN répondent également à différentes molécules de guidage axonal, que l'on retrouve les zones lésées en phase aiguë dans différents modèles animaux ainsi les CSN pourraient être préférentiellement recrutées dans ces zones (Belmadani et al. 2006).

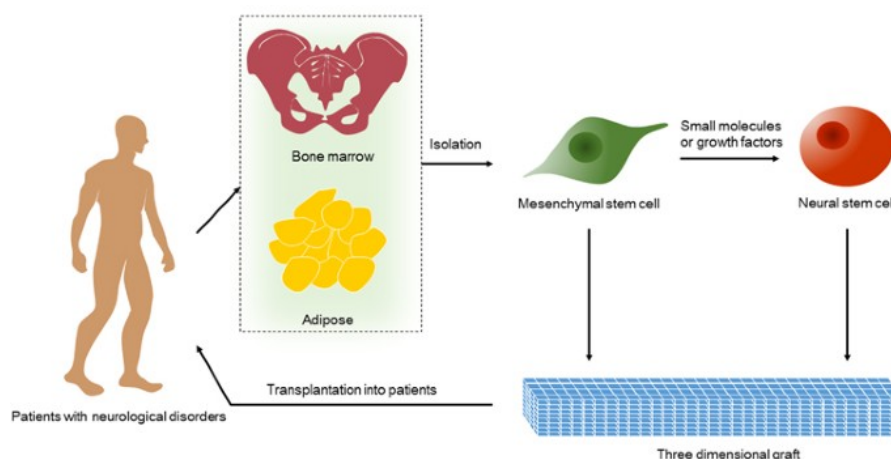
3.2. Sources des CSN

Deux options sont disponibles dans une perspective d'utilisation thérapeutique pour optimiser les propriétés des CSN :

- **CSN endogènes** : elles sont mobilisables principalement afin de moduler l'environnement lésionnel, leur capacité à générer des neurones est limitée.
- **CSN exogènes**, on greffe des cellules dérivant de culture *in vitro* (Tang, Yu, et Cheng 2017) :
 - Isolées directement à partir des tissus cérébraux fœtales ou adultes et de la moelle épinière (A. Lee et al. 2005) (Belenguer et al. 2016).
 - Issues de la différenciation de cellules pluripotentes : CSE et iPS
 - Transdifférenciation à partir de cellules différenciées issues du sang, du sang de cordon de l'urine et de la peau (Selman et Kafatos 1974) (Shahbazi et al. 2016).
 - Transdifférenciation directe tridimensionnelle induite par la culture : laquelle les cellules sont dans un état transitoire partiellement reprogrammé. On peut obtenir des échantillons de CSN à partir de CSM en utilisant un protocole d'induction en 3 étapes (Feng et al. 2014)(Figure 15).

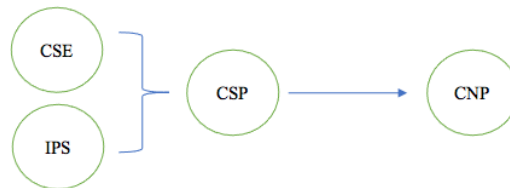
En recréant un système 3D de culture, on imite l'environnement physique complexe du corps humain, ce qui permet de retrouver des conditions pour renforcer l'auto-renouvellement et la multipotence des CSN. En utilisant un support 3D on obtient une transdifférenciation plus sûre et plus pratique pour la génération d'iPS.

Figure 15 Transdifférenciation directe tridimensionnelle induite par la culture (Tang, Yu, et Cheng 2017)

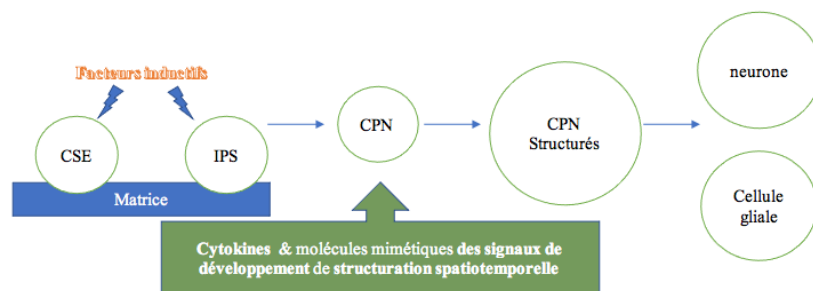


3.3. Induction neurale et différenciation des cellules souches pluripotentes

Des protocoles de culture de cellules souches neurales ont été créés afin d'isoler et de faire proliférer les cellules souches neurales à différents stades de développement. Plusieurs protocoles existent mais ils ont en commun la **génération de "rosettes" neurales**, qui contiennent des cellules progénitrices neurales. Ces rosettes **représentent le tube neural**. On génère des rosettes par des techniques de propagation et d'expansion de CPN préalablement isolés.



Culture monocouche : (Liem et al. 1995; X.-J. Li et al. 2009; Mariani et al. 2012)



Les CSE ou les IPS sont plaquées sur la matrice et exposées à des facteurs inductifs, ce qui permet d'obtenir les premiers CPN. On ajoute au milieu des CPN des cytokines et des molécules imitant les signaux de développement pour la structuration spatiotemporelle durant l'embryogenèse. Une fois les CPN structurés, ils se

différencient en cellules matures avec les phénotypes caractéristiques des différentes régions du système nerveux. Grâce à cette méthode de culture on obtient des **organoïdes cérébraux** qui imitent les propriétés du cerveau humain, notamment la formation de régions cérébrales discrètes présentant une organisation cellulaire laminaire caractéristique (Nakatomi et al. 2002).

Culture de neurosphères : ne permet pas de maintenir les CSN et crée des populations de cellules hétérogènes

Étape 1 : Protocole de prolifération

- 1) Région spécifique du SNC est micro dissociée
- 2) Dissociation mécanique ou enzymatique
- 3) Substrat est plaqué dans un milieu défini sans sérum en présence de facteurs mitogènes : Facteur de croissance épidermique (EGF) et/ou le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF)
- 4) Prolifération CSN et CPN
- 5) Formation de groupes de cellules au bout de 2 à 3 jours : groupes de cellule
- 6) Détachement de la surface et se développement en suspension des groupes
- 7) Au jour 7 : on obtient des neurosphères de 100 à 200 µm de diamètre, composées d'environ 10 à 100 Kcellules
- 8) Passage des neurosphères mécaniquement ou enzymatiquement dans les mêmes conditions que la culture primaire et le cycle peut recommencer.

On peut procéder à cette étape de prolifération pendant 10 semaines sans qu'il n'y ait perte de capacité proliférative.

Étape 2 : Protocole de différenciation

- 1) Neurosphères intactes ou cellules dissociées
- 2) Plaquage sur un substrat adhésif (milieu faible teneur en sérum)
- 3) Différenciation en astrocytes, neurones et oligodendrocytes

Culture monocouche adhérente : permet de maintenir les CSN

Étape 1 : Protocole de prolifération

- 1) Fixation des CSN et CPN sur matériel de culture, dans un milieu sans sérum, complété par l'EGF et/ou le bFGF, en présence d'un substrat tel que la poly-L-ornithine, la laminine ou la fibronectine.
- 2) Génération d'une monocouche de cellules adhérentes

- 3) Prolifération qui arrive à confluence entre le 5e et 10e jours
- 4) Passage par traitement enzymatique à cycle recommence

Étape 2 : Protocole de différenciation :

- 1) Élimination des mitogènes
- 2) Exposition à un milieu faible teneur en sérum
- 3) Différenciation en astrocytes, neurones et oligodendrocytes

3.4. Utilisations des cellules souches neurales en thérapeutiques :

Les stratégies thérapeutiques se basent sur les greffes de CSN afin de combler les lésions et défaillances du système nerveux central. L'absence de régénération spontanée du tissu nerveux accentue le besoin de thérapeutique. L'objectif est de fournir un produit de **qualité**, facilement « **approvisionnementnable** » et de s'assurer de l'**efficience**, de la **sécurité** et de l'optimisation de ces greffes pour la translation clinique. En effet, les sources sont réduites, et les techniques d'isolement et de purification sont bloquantes. Malgré la réussite des essais précliniques, il faut être prudent pour le développement d'essais cliniques.

Les CSN :

- ont une **grande capacité de plasticité** pour le traitement des maladies du système nerveux, elles peuvent donner naissance à de nombreux types de cellules.

- génèrent l'environnement idéal pour leur développement, la prolifération et la différenciation. Grâce à leurs capacités de sécrétion de facteurs solubles (facteurs neurotrophiques, facteurs de croissance et cytokines), les CSN se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

Les pathologies du système nerveux dont les origines sont souvent peu connues (voire inconnues), entraînent différents types de défaillances : perte de sensation (vision, audition, toucher, odorat, goût), de fonction motrice, de mémoire et mort cérébrale. La protection neurale ou le remplacement des cellules peut contribuer à la récupération fonctionnelle neurologique après une blessure aiguë ou chronique grâce à la régénération neurale.

Tableau VIII Utilisations thérapeutiques des CSN

Maladies neurodégénératives Dues à des problèmes des cellules neurales ou gliales du cerveau qui entraînent : -Des troubles de la mémoire -Des troubles cognitifs -Des troubles des mouvements corporels -De la démence	Maladie d'Alzheimer - Niveaux importants de protéines β -amyloïdes solubles et insolubles - Nombre de mitochondries neuronales de l'hippocampe réduit	Grefe des CSN combinées avec : - La cérébrolysine contrôlant le métabolisme des protéines précurseurs amyloïdes - Des peptides auto-assemblés qui offrent une niche protectrice - Des nanoparticules de facteur de croissance nerveuse → Augmentation du nombre de mitochondries et leurs protéines + améliorations fonctions cognitives. - Cas d'un modèle immunodéficient, les CSN se sont greffées et ont migrés dans tout l'hippocampe sans changement dans l'expression des facteurs neurotrophiques, ni augmentation de la densité synaptique. Cet échec peut s'expliquer par une absence de différenciation terminale. L'incohérence des données renforce l'idée qu'une évaluation de l'efficacité et de la sécurité des cellules greffées est nécessaire. (Marsh et al. 2017)
	Maladie de Huntington - Maladie héréditaire à dominance autosomique - Atrophie du noyau caudé - Troubles émotionnels - Déficience cognitive - mouvements involontaires.	- Grefe CSN fœtales dans le striatum des rongeurs → récupération partielle aux niveaux comportemental et anatomique (McBride et al. 2004). - Grefe de CSN + théalose → augmentation de l'espérance de vie des rongeurs (Yang et Yu 2009). - Optimisation de la greffe : le moment de la greffe, la préparation de ces cellules, l'activité des CSN, présence ou non de cellules auxiliaires (CSM qui sécrètent des facteurs neurotrophiques) (Johann et al. 2007)
	Maladie de Parkinson Perte des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire et de leurs terminaisons dans le striatum	- Grefe CSN → stimule différenciation astrocytes de rats + sécrétion de facteurs de croissance exogènes → inhibition des cellules microgliales → ralentissement de la propagation de la lésion. En agissant sur microenvironnement de la lésion (Zuo et al. 2015). → survie des cellules à long terme effets thérapeutiques et la production de neurones dopaminergiques (Wu et al. 2015). - Un essai clinique de phase I/IIa a été réalisé (Gonzalez et al. 2016).
	Sclérose latérale amyotrophique (SLA) - Lésions localisées au niveau du cortex cérébral, tronc cérébral et moelle épinière	Dans la SLA, il y a une dégénérescence et une perte des motoneurons provoquant une atrophie musculaire généralisée, une faiblesse puis la mort (Eisen et Hudson 1987). Dans un modèle de SLA, la régénération des motoneurons a été induite par des facteurs neurotrophiques (un dérivé du cerveau, un des cellules gliales) sécrétés par les CSN humaines (Xu et al. 2006).
Épilepsie	Déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition du SNC qui entraîne un dysfonctionnement transitoire cérébral	Près d'un tiers des épileptiques du lobe frontal sont résistants aux traitements. - Grefe de CSN dans les sites épileptiques de l'hippocampe : ils induisent la production de neurones spécifiques. Ces neurones synthétisent le neurotransmetteur inhibiteur γ -acide aminobutyrique et les astrocytes sécrètent des facteurs anticonvulsifs. Ces deux actions entraînent le ralentissement du dysfonctionnement (Shetty 2012)
Paralysie cérébrale	- formations de lésions stables du SNC - troubles permanents des mouvements dès l'enfance	Aucun traitement curatif n'existe pour le moment. Des pistes de greffe de CSN transduits avec le facteur de croissance endothélial vasculaire peut partiellement ralentir les lésions cérébrales et possède des effets neuroprotecteurs sur les rats néonataux atteints (Tan et al. 2014).
Traumatisme crânien	Lésions cérébrales focales ou diffuses qui provoquent des déficits cognitifs, moteurs et de mémorisation.	- Grefe de CSN cérébraux chez des souris ayant subi une lésion cérébrale a permis (Koutsoudaki et al. 2016) : → D'empêcher l'activation astrogliale et l'accumulation des microglies → D'augmenter les oligodendrocytes → De réparer et maintenir l'activité des neurones - La bioingénierie permet la construction d'un support de collagène à base d'hyaluronate de sodium chargé de bFGF qui favorise la survie et la différenciation des CSN de rats greffés et encourage la formation de synapses fonctionnelles pour réparer les lésions cérébrales traumatiques chez les rats (Duan et al. 2016)
Lésions de la moelle épinière	- Pertes complète ou partielle de motricité - Aucun traitement ne s'est révélé efficace à l'heure actuelle	- Grefe de CSN sur des modèles murins → CSN survivent, se différencient et modifient le microenvironnement des sites de lésions chroniques précoces (Salazar et al. 2010; Eliane Gluckman et al. 2011). - Grefe de CSN sur des modèle primate de lésion médullaire → CSN se différencient et expriment des marqueurs neuronaux → les performances des membres postérieurs améliorées (Nemati et al. 2014). - Les traitements de lésion médullaire par les CSN sont régulés par des cytokines et des protéines. Des expérimentations ont été mises en place afin de moduler ces facteurs par l'intermédiaire de médicaments : → Etanercept : inhibiteur du TNF anti-apoptotique & anti-inflammatoire (L. Wang et al. 2014) → Érythropoïétine : cytokine jouant le rôle de facteur de croissance (Y. Zhao et al. 2015) → Edaravone : antioxydant agissant sur la capture de radicaux libres (Y. Y. Song, Peng, et Ye 2015) - Durant une étude préclinique sur les lésions médullaires cervicales, les CSN issu du système nerveux central n'ont pas apporté de résultat significatif : les CSN greffées ne se sont pas différenciées. - Un essai clinique de phase I/IIa met en évidence l'efficacité et la sécurité de la greffe de CSN cérébrales fœtales pour des traumatismes cervicaux liés à des lésions cérébrales (J. C. Shin et al. 2015): → 89% des patients traités ont retrouvé une fonction sensorimotrice après 1 an → 11% des patients ont montré une récupération motrice complète mais sensorielle incomplète. → Aucune lésion du cordon, formation de seringue ou de tumeur, détérioration neurologique, exacerbation de la douleur neuropathique ou de la spasticité, n'ont été mis en évidence.
Encéphalopathie néonatale hypoxique et ischémique	Lésions cérébrales due au manque d'oxygène et de flux sanguin à l'approche de la naissance.	La greffe de CSN est un traitement des atteintes ischémiques cérébrales. Pourtant l'apoptose se produit. En combinant une hypothermie légère (aux effets neuroprotecteurs) et la greffe des CSN on observe : - Une diminution des facteurs nucléaire inflammatoire -kappa B et du facteur apoptotique caspase-3 - Une réduction du volume des infarctus cérébraux - Une augmentation du taux de survie des cellules greffées et une amélioration marquée de la fonction neurologique (L. Wang et al. 2014). - Le ginsénoside Rg1 : composant pharmacologique majoritaire du ginseng à concentration efficace à un effet d'induction de la différenciation. - Injection intracérébroventriculaire de CSN induites par Rg1, elles entraînent de meilleures capacités comportementales chez le rat modèle. Les CSN induites par le ginsénoside Rg1 peuvent favoriser la récupération partielle de fonctions cérébrales compliquées dans des modèles d'encéphalopathie hypoxique et ischémique (Y.-B. Li et al. 2015).
Accident vasculaire cérébral	Peut-être de type ischémique ou hémorragique.	- Beaucoup d'études se sont penchées sur les CSM médicament par l'intermédiaire des sécrétions de facteurs de réparation et anti-apoptotique. Avec les CSN on essaie de trouver une solution plus radicale. - Grefe conjointe de cellules progénitrices neurales et vasculaires favorise la survie des cellules greffées et la récupération neurovasculaire (J. Li et al. 2014). - Pour ses lésions médullaires, grâce à l'ingénierie tissulaire on couple les CSN humains à des fibres tridimensionnelles électrofilées, le taux de survie des cellules augmentent en bloquant l'infiltration microgliale (S. Lee et al. 2016). Dans certaines études la greffe de CSN a entraîné une diminution de la neurogenèse endogène due à l'activation microgliale.

Comme nous avons pu le voir dans le cadre de l'AVC, les études précédentes ont démontré les effets positifs de la greffe de cellules neuronales fœtales, l'efficacité thérapeutique et la faisabilité chirurgicale de l'implantation. Un essai clinique de phase I/II a été réalisé utilisant une lignée humaine immortalisée de CSN : CTX0E03, pour traiter des AVC ischémiques (Sinden et al. 2017).

Les CSN fœtales n'étant pas disponibles en grand nombre, il a fallu trouver une alternative d'approvisionnement alliant offre et qualité. Les CTX sont des lignées isolées à partir de CSN fœtales humaines, développées dans un milieu contenant des facteurs de croissance (EGF, FGF-2) et cultivées sous formes de monocouches ou neurosphères.

ReNeuron a généré CTX, une lignée clonale de CSNh génétiquement stable et conditionnellement immortalisée, en utilisant sa technologie brevetée d'expansion des cellules souches c-mycERTAM. Aucun traitement de préparation n'est nécessaire, les CTX sont décongelées avant l'injection intracérébrale dans le putamen adjacent à la zone de l'ischémie :

→ Effets paracrines : favorise le recrutement, la prolifération et le maintien de cellules hôtes (cellules immunitaires, stromales, cellules progénitrices neurales et endothéliales)

→ Effets immunomodulateurs : passage d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti inflammatoire. Ce phénotype est associé au remodelage et à la réparation des tissus.

→ Effets angiogéniques : rétablissement du facteur de Willebrand dans l'hémisphère lésé

→ Stimulation de la neurogenèse

Cet essai clinique est un bon exemple de translation clinique et d'industrialisation du traitement.

En médecine régénérative, on utilisera principalement des cellules souches neurales induites à partir des CSM car elles ont des effets neuroprotecteurs importants (Wei Zhang et al. 2017).

Des essais cliniques pour le traitement de la maladie de parkinson, de la SLA, et des lésions médullaires ont utilisé uniquement les CSM. On peut également greffer deux types de cellules en même temps : CSM de moelle osseuse et de CNS adultes afin d'améliorer la survie des CNS greffées (Rossignol et al. 2014).

B. Cellules souches unipotentes (CSU)

Ces cellules se caractérisent par des capacités d'autorenouveau et de différenciation étroites vers un seul type de cellule spécialisée. Une fois différenciée, la CSU donne une cellule souche spécifique qui constitue les composants fonctionnels et structurels.

Le niveau de connaissance pour les cellules souches unipotentes est moins important que pour les autres types de cellules. Dans la mesure où les CSU sont très difficiles à différencier et à isoler *in vitro*, les chercheurs se sont orientés vers d'autres types de cellules souches.

Les CSU ont un vaste potentiel thérapeutique malgré leur potentiel de différenciation limité.

- Par exemple, les CSU peuvent générer énormément de cellules saines et viables qui pourront être utilisées pour des greffes.
- Ce sont des bonnes candidates pour une utilisation thérapeutique en médecine régénérative. On les retrouve dans les tissus adultes : foie, peau, cornée, follicules pileux, et muqueuse intestinale.

1. Cellules souches épithéliales

On les retrouve dans de multiples tissus : peau, cornée, glandes sébacées, follicules pileux, et muqueuse intestinale. Elles assurent l'homéostasie des tissus épithéliaux grâce à leur capacité de renouvellement constant et de spécialisation en fonction de leur tissu d'origine.

- En fonction du tissu, elles renouvellent le tissu plus ou moins vite (4 semaines pour l'épithélium du follicules pileux, 5 jours pour la muqueuse intestinale).
- Elles ont été utilisées comme l'un des premiers traitements de thérapie cellulaire chez les grands brûlés pour limiter les douleurs et la défiguration : en prélevant une partie des cellules souches de l'épithélium non endommagé, on peut développer des feuilles de peau. Mais cette technique est très longue pour obtenir des feuillettes. La fonction protectrice de la peau étant capitale, il est nécessaire de pouvoir raccourcir ces délais.
- La peau synthétisée *in vitro* permet d'établir des modèles pour les laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques, et d'étudier les mécanismes de vieillissement de la peau (Zouboulis et al. 2008).

2. Hépatocytes assimilés comme cellules souches

Ce sont des cellules hautement spécialisées capables de se diviser et de s'auto-renouveler. En effet, elles assurent le renouvellement constant du parenchyme hépatique (ou lors de lésions).

3. Les cellules de la lignée germinale

Elles possèdent une capacité de prolifération très élevée et assurent l'homéostasie de leur tissu de résidence. Elles sont responsables de la gamétogenèse et peuvent ainsi se différencier en spermatozoïdes ou ovocytes (Hebao Yuan et Yamashita 2010).

Un autre modèle de thérapie cellulaire est celui de la prostate. La cellule souche prostatique fonctionnelle peut être purifiée puis générer un tissu prostatique complet.

Les cellules souches unipotentes se caractérisent par :

- Des capacités de différenciation étroites : ces cellules ne sont capables de former qu'un seul type de cellules, par exemple les dermatocytes.
- Une propriété particulière de se diviser à plusieurs reprises. Cette dernière caractéristique en fait une candidate prometteuse pour une utilisation thérapeutique en médecine régénérative.

d. Cellules souches pluripotentes induites (iPS : induced Pluripotent Stem cells)

1. Définition et propriétés :

La pluripotence est caractérisée par de nombreux critères :

- Expression de marqueurs moléculaires comme les facteurs de transcription
- Absence de marqueurs morphologiques et moléculaires. Les gènes exprimés sont associés à la différenciation
- Capacité de former 3 couches germinales embryonnaires suite à l'induction de la différenciation *in vivo* qui peut être imitée *in vitro*.

Mis à part le test du tératome, on peut implanter des cellules souches embryonnaires dans les kystes du blastocyste, ce qui génèrera tous les types de tissus dans l'animal chimérique adulte pour démontrer la pluripotence de ces cellules. Ce n'est pas une technique que l'on peut utiliser chez l'homme pour des raisons éthiques.

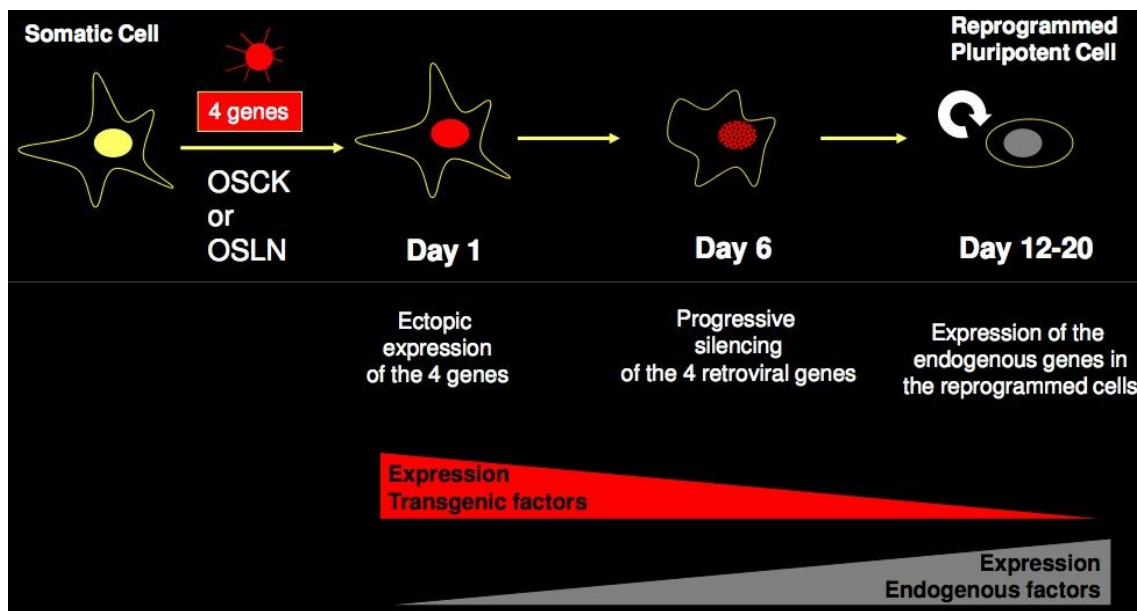
Les iPS possèdent les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires. Les procédés de production et de maintien reprennent les mécanismes observés chez les cellules souches embryonnaires.

Les iPS sont un type de cellule souche pluripotente dérivé de cellules somatiques adultes. Des protocoles de reprogrammation nucléaire agissent sur l'expression exogène d'un groupe de facteurs de transcription responsables de la pluripotence. C'est un outil inégalé pour étudier le développement humain.

- Cette technique a été mise au point chez la souris : les fibroblastes sont reprogrammés par transduction rétrovirale, ce qui entraîne la surexpression de facteurs de transcription engagés dans la régulation de la pluripotence : oct4, sox2, klf4 et c-myc. (K. Takahashi et Yamanaka 2006)
- En 2007, la génération des iPS est décrite : c'est une population de cellules qui présente des similitudes avec les CSE d'ordre morphologique (expression de marqueurs de surface et facteurs de transcription), en termes de capacités d'autorenouvellement et de différenciation (K. Takahashi et al. 2007). Cette reprogrammation à l'état de développement primitif peut se faire avec :
 - Oct4, sox2, nanog et Lin28 (Yu et al. 2007)
 - Mir302/367 : groupe de micro-ARNs (Anokye-Danso et al. 2011)
- Ce procédé de reprogrammation de cellules somatiques adultes à un stade pluripotent, permet l'obtention de cellules pluripotentes autologues. On peut utiliser ces cellules comme un modèle pour les maladies, ou comme source de cellules pour les thérapies cellulaires et géniques.

Les iPS sont maintenues en état de pluripotence de la même façon que les CSE pluripotentes : elles forment des lignées spécifiques en réponse aux facteurs de croissances et aux cytokines.

Figure 16 Principe de la reprogrammation de cellules somatiques adultes (Stadtfield et al. 2008)



Une grande variabilité existe même sur des cellules sectionnées par clonage et ayant subi le même processus de reprogrammation. Certaines cellules ont besoin de quelques jours alors que d'autres nécessitent plusieurs semaines, ce qui crée des populations de cellules très hétérogènes (Hanna et al. 2009).

On explique ces différences par des conditions dans lesquelles doivent être les cellules afin d'être sensibles à ces facteurs.

- Avant que les facteurs exogènes ne puissent s'exprimer, SOX2 endogène doit être exprimé afin que les autres gènes endogènes associées à la pluripotence soient prêts (Buganim et al. 2012).
- De même, afin de pouvoir reprogrammer la cellule, un remodelage génétique est nécessaire. Par exemple, la méthylation des carbones des cytosines provoque l'inhibition de la transcription.

Il faut donc remodeler les histones (J. Chen et al. 2013) et l'état de méthylation (Nazor et al. 2012) afin de libérer l'accès aux gènes de la pluripotence.

Des inquiétudes ont été soulevées quant à la mémoire épigénétique lors de la reprogrammation, les cellules iPS ayant une mémoire des tissus somatiques dont elles sont issues (Polo et al. 2010). En réalité, il y a une toute petite variabilité à court terme des iPS par rapport aux CSE. Ces variabilités se perdent rapidement et sont dues aux lignées cellulaires individuelles plutôt qu'aux différences entre les classes de cellules souches pluripotentes (Müller et al. 2011).

L'utilisation des iPS à des fins de thérapeutiques a inquiété. Le procédé initial était une transduction rétrovirale : on imbriquait des vecteurs rétroviraux au sein du génome. Les peurs étaient liées à une intégration non contrôlée (insertion de mutagène) qui provoquerait la suppression de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes. Dans le premier protocole, Yamanaka utilise myc, lui-même un oncogène, qui par la réactivation des transgènes pourrait entraîner des tumeurs.

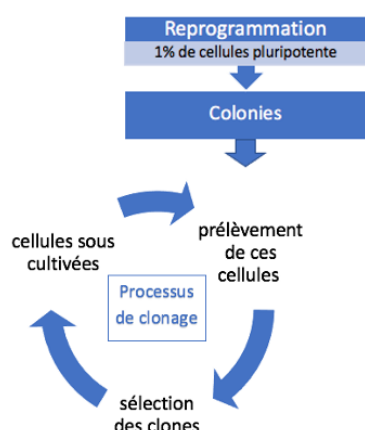
La transduction rétrovirale a été mise de côté pour des usages cliniques : on se sert de multiples techniques non intégratives. On s'est rendu compte que les facteurs de transcription étaient nécessaires pour créer un éveil de machinerie pluripotente endogène.

On peut donc prendre comme exemple le virus de Sendai, qui est une technique non intégrative, ainsi le virus ne se transloque pas dans le noyau. On peut ainsi utiliser d'autres méthodologies : (Hussein et Nagy 2012)

Tableau IX Différentes méthodes de reprogrammation et de leurs caractéristiques (Boucher 2015)

Méthode utilisant des vecteurs viraux	Méthodes sans vecteurs viraux
<p>Rétrovirus Intégratif Infection limitée aux cellules en division Vecteur polycistronique possible Multiples réactivation des transgènes Efficacité : moyenne à bonne (0,01% à 0,5%)</p>	<p>Plasmide Non intégratif Expression transitoire Très faible efficacité (0,001%)</p>
<p>Lentivirus Intégratif Infection des cellules en division ou non Faible réactivation des transgènes Haute efficacité (0,1% à 1%)</p>	<p>Transposon Intégratif Système d'excision Induction à la doxycycline et/ou vecteur polycistronique Haute efficacité (0,1%)</p>
<p>Lentivirus floxé Non intégratif Infection des cellules en division ou non Système d'excision Cre/LoxP Induction à la doxycycline et/ou vecteur polycistronique Obtention de lignée laborieuse Haute efficacité (0,1% à 1%)</p>	<p>Vecteur épisomal Non intégratif Uniquement sur les cellules humaines actuellement Transfections répétées Élimination naturelle Très faible efficacité (0,0001%)</p>
<p>Adénovirus Non intégratif Infection des cellules en division ou non Expression transitoire, transfections répétées Faible efficacité (0,001%)</p>	<p>Protéines recombinants Non intégratif Utilisation d'un peptide pénétrant la cellule Transfections multiples Faible efficacité (0,001%)</p>
<p>Virus de Sendai Non intégratif Élimination possible du virus (température ou siARN) Haute efficacité (sauf sur les cellules matures) (0,02% à 1%)</p>	<p>Vecteur ADN « minicircle » Non intégratif Expression transitoire, transfections répétées Uniquement sur les cellules humaines actuellement Très faible efficacité (0,0001%)</p>
	<p>ARNm synthétique Non intégratif Transfections multiples / méthode longue Uniquement sur les cellules humaines Haute efficacité (1%)</p>

Durant le processus de reprogrammation on obtient 1% de cellules avec la confirmation d'un état de pluripotence (contre 0,01% avec les premières techniques).



C'est ce que l'on appelle le système de dérivation clonale qui permet la préservation de l'homogénéité génétiques de la lignée iPSC, c'est important lorsqu'on veut observer et étudier des troubles génétiques.

Afin d'obtenir des iPSC à haut débit, on saute la sélection des clones et on combine plusieurs clones entre eux (Paull et al. 2015). C'est une méthode appropriée lorsqu'on a des lignées cellulaires « normales » (sans maladies génétiques connues). Mais cette technique entraîne des fluctuations dans les cultures suivantes :

- Les cellules se divisent plus ou moins rapidement
- La résistance au stress est plus ou moins importantes selon les cellules

Cette méthode n'est pas recommandée pour les populations de cellules présentant une maladie génétique qui peut s'exprimer en mosaïque en fonction des types cellulaires au sein de l'organisme. Les clones combinés et sous clonés vont faire en sorte que l'on retrouvera une population de cellules hétérogène iPSC mutées et normales.

L'avantage de la reprogrammation est qu'elle n'est pas susceptible d'introduire des mutations ayant des effets secondaires indésirables (Bhutani et al. 2016). La plupart des variations génomiques proviennent de la population

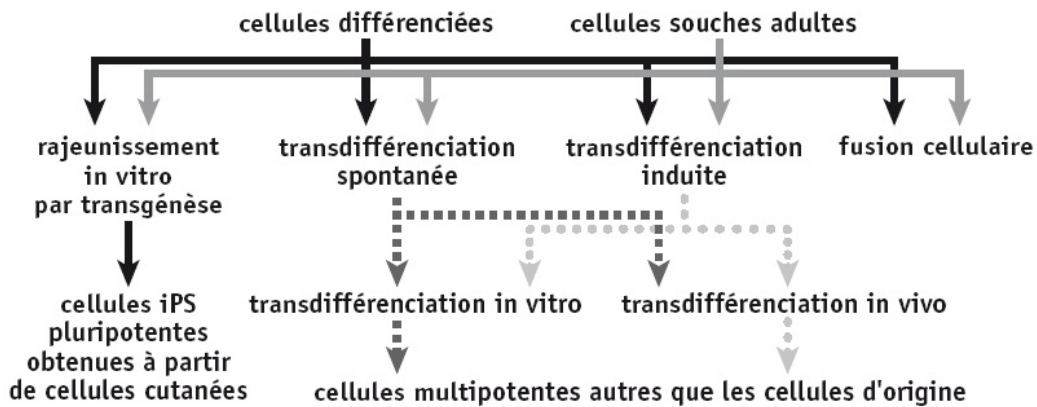
cellulaire utilisée. On peut les mettre en évidence pendant la phase de culture post reprogrammation car les populations contenant des aberrations ont tendance à proliférer plus rapidement et à être plus résistantes aux processus de mort cellulaire. Les anomalies retrouvées sont de types :

- Caryotypiques : trisomies et duplications sous chromosomiques (chromosome : 17, 12 et X) (Taapken et al. 2011)
- Mutations ponctuelles
- Variations du nombre de copie qui peut entraîner le syndrome du X fragile (Sheridan et al. 2011) et l'ataxie de Friedrich (Ku et al. 2010)

Comme les iPS ne meurent pas et continuent de proliférer, des anomalies génétiques apparaissent sur les cultures de longue durée (Garitaonandia et al. 2015), comme pour celle des cellules souches embryonnaires (Amir et al. 2017).

Figure 17 Protocoles de reprogrammation (Azzouna et Chouchane 2011)

Depuis la première technique de reprogrammation par transgénèse des kératinocytes en iPS pluripotentes, de nouvelles méthodes ont fait leur apparition. En effet les transdifférenciations spontanée et induite permettent d'obtenir des cellules multipotentes autres que les cellules d'origine.



Transdifférenciation induite ou reprogrammation directe : on contourne l'état de pluripotence

C'est une méthode de différenciation utile pour obtenir des cellules dont le schéma de différenciation est inconnu. (Caiazzo et al. 2011)

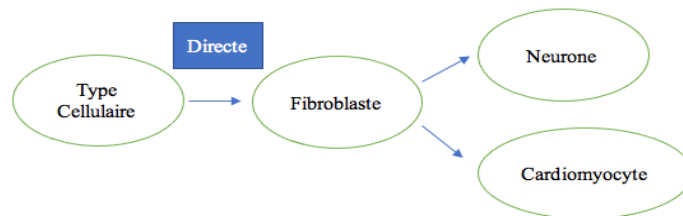


Figure 18 Génération de neurones dopaminergiques fonctionnels à partir de la reprogrammation de fibroblastes par des nanoparticules de silice mésoporeuse non virales (Chang et al. 2018)

Les fibroblastes de souris sont transdifférenciés en neurone dopaminergique sous l'induction de nanoparticules de silice mésoporeuse non virales

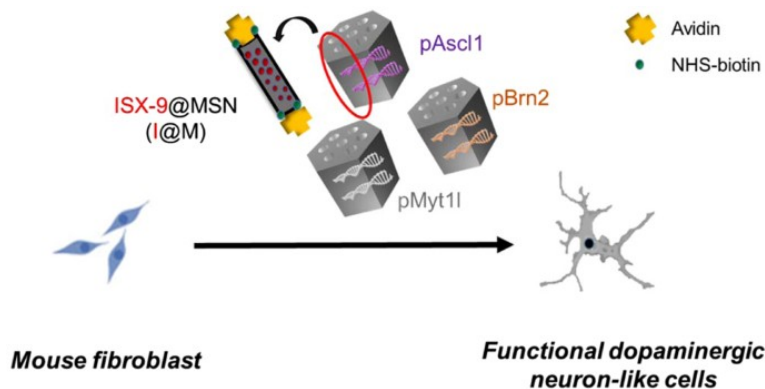
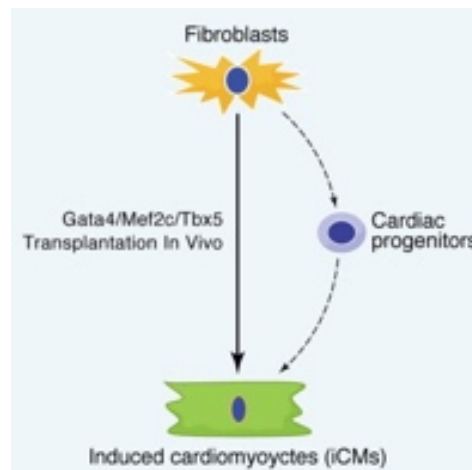


Figure 19 Reprogrammation directe des fibroblastes en cardiomyocytes fonctionnels (Ieda et al. 2010)



Grâce à la bio-informatique, on peut faire une analyse prédictive des facteurs de transcription nécessaires pour convertir un type de cellule en un autre. Plusieurs facteurs de transdifférenciation peuvent transformer des cellules en différents types cellulaires, on peut ainsi se retrouver avec des populations hybrides contenant deux types cellulaires. Si les produits de la transdifférenciation sont post-mitotiques, cela contient des cellules résiduelles indifférenciées, il y aura ainsi moins de risque de tératomes. Jusqu'à présent des essais cliniques ont été effectués et il n'y a aucun retour négatif. Pourtant des inconvénients existent :

- On obtient rapidement une grande population de cellules
- Les manipulations génétiques et la caractérisation sont impossibles car ce sont des cellules matures non dérivées de clonage
- La division cellulaire des cellules matures est limitée : on peut contourner ce souci en une population de progéniteurs intermédiaires. Ces progéniteurs, eux, conservent leur capacité de prolifération, de purification et d'élimination des cellules anormalement programmées (J. Kim et al. 2011).

2. Applications thérapeutiques des iPSC

En pratique, les iPSC apparaissent moins intéressantes que les CSE. Pourtant les études montrent qu'elles sont équivalentes sur les plans moléculaire, fonctionnel et génétique (Choi et al. 2015). On peut ainsi utiliser les iPSC pour :

- Modéliser le développement et les troubles humains,
- La thérapie cellulaire
- Un screening haut débit de molécules pour un malade par exemple.

2.1. Modélisation cellulaires, tissulaires :

On peut utiliser des cellules très spécifiques, très difficiles à obtenir en temps normal, comme les neurones, cardiomyocytes, maladies génétiques et les maladies héréditaires sans preuve de mutations spécifiques.

Cela nous permet de nous extraire du modèle animal qui n'est pas toujours représentatif puisque ces espèces ont divergées il y a des millions d'années. C'est le cas des traitements des maladies neurologiques et psychiatriques qui souffrent d'un retard dû à l'absence de bons modèles. En effet, ces pathologies sont souvent liées à plusieurs gènes et ces anomalies génétiques peuvent se trouver sur des portions non codantes de l'ADN (chez les rongeurs ces zones non codantes ne sont pas conservées).

Prenons l'exemple du **syndrome de Timothy**, forme monogénique d'autisme, dû à une suractivation du canal calcique Ca_v1,2 de type lent provoquant ainsi une augmentation de la tyrosine hydroxylase.

- Ce syndrome entraîne un développement cortical anormal, une augmentation de la production de NAD et de dopamine, ce qui se caractérise par une hausse de l'agressivité chez les individus atteints.

- Chez la souris atteinte du syndrome, la transcription de la tyrosine hydroxylase et le phénotype des catécholamines ne sont pas observables.
- Par contre en utilisant les iPSC, on a mis en évidence que la roscovitine bloque les canaux calciques de type L, ce qui réduit l'activité de la tyrosine hydroxylase. Grâce à la roscovitine, la production de catécholamines dans les neurones dérivés des iPSC est diminuée. Les iPSC nous ont permis d'apporter une preuve préclinique, qui n'est pas accessible avec les modèles animaux (Paşca et al. 2011).

La **schizophrénie** est une maladie héréditaire sans mutation spécifique. Grâce aux iPSC, on peut observer les phénotypes cellulaires et les mécanismes moléculaires sans connaître la cause génétique.

Pour les **maladies complexes multi symptomatiques**, on peut utiliser les iPSC et plusieurs patients. En se focalisant sur un symptôme commun à un ensemble de patients et des témoins appropriés (membres de la famille non affectés pour déterminer les différences de comportement qui ne sont pas liés à la maladie afin de réduire la variabilité dû à la variabilité génomique).

Certaines pathologies présentent des mutations dans des régions codantes que l'on ne retrouve pas chez les animaux, c'est le cas de la maladie de parkinson (Chartier-Harlin et al. 2004). Les IPS permettent donc de tester des traitements de thérapie génique par exemple.

Les iPSC peuvent s'agréger durant la phase de différenciation *in vitro* et former des **organoïdes**. Ces organoïdes sont un moyen de fournir des cellules plus matures *in vitro*. Ils forment un microenvironnement, une structure 3D. Des organoïdes intestinaux, rénaux, hépatiques, gastriques et multi systémiques ont été fabriqués. Ils permettent notamment de tester des médicaments.

Même si les iPSC sont des outils de qualité pour la modélisation, la maturation des cellules *in vitro* reste encore un procédé complexe et non réalisé à ce jour. On ne peut pas l'utiliser pour les pathologies qui se déclarent tardivement. En utilisant la transdifférenciation directe on peut conserver les caractéristiques liées à l'âge du donneur (Mertens et al. 2015). C'est ainsi que la Ezogabine a été identifiée comme traitement de la SLA dont le phénotype des motoneurones était électrophysiologiquement anormal (Wainger et al. 2014).

Les iPSC peuvent constituer des modèles pharmacologiques de criblage de thérapeutiques ou d'évaluation de toxicité. Pour exemple, des cellules iPSC ont été utilisées pour établir des systèmes pour des tests de cytotoxicité, cardiotoxicité, hépatotoxicité et embryotoxicité (Seiler et al. 2004).

2.2. La médecine personnalisée

Jusqu'à présent, les démarches de recherche et de développement des médicaments étaient réductionnistes : elles consistaient en un criblage de molécules biologiquement actives sur une cible (protéine dans une lignée cellulaire spécifique). Aucune étude ne prenait en compte la génétique de l'individu, fonction de son hérédité, ethnie... Aujourd'hui les iPSC, grâce à des modèles prédictifs, permettent d'anticiper des effets génétiquement dépendants (Fakunle et Loring 2012).

L'origine ethnique n'est pas le seul facteur influençant le phénotype de la cellule.

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive due à des mutations dans le gène de la conduction transmembranaire : CFTR. En fonction du type de mutation (1900 mutations différentes), la sensibilité des patients aux traitements change.

Les iPSC vont permettre d'améliorer la thérapeutique en prédisant l'issue clinique d'un patient présentant une mutation spécifique.

2.3. Thérapie cellulaire

Les iPSC ont l'avantage d'être des cellules souches pluripotentes. On peut ainsi choisir la lignée cellulaire du patient, ou d'un donneur ayant une correspondance immunologique étroite, sans avoir besoin de recourir à des traitements immunosuppresseurs.

Pour pouvoir répondre à ce besoin de cellules à correspondance immunologique étroite, basée principalement sur le système HLA (marqueurs de l'antigène anti leucocytaire humain), des banques d'IPS sont en création. Ces

banques sont appelées haploines : l'objectif est de disposer de cellules thérapeutiques rapidement pour un large public tout en réduisant le coût de production des traitements.

Le Japon est le pays pionnier en termes de création d'haploines : pour couvrir 90% des besoins de la population il faut 50¹⁰⁰ lignées cellulaires (Taylor et al. 2012). La diversité et le mixage des populations d'Europe et des États-Unis rend la réalisation de telles banques difficiles.

Les haploines n'ont toujours pas été utilisées chez l'homme, malgré la correspondance du système d'immunité majeur HLA. Des craintes existent quant au rejet provoqué par des antigènes mineurs mais les études ont des résultats contradictoires :

- Immunogène pour certains : chez les souris la greffe d'IPS syngéniques a conduit à la formation de tératomes (Zhao et al. 2011; 2015).
- Réponse immunitaire négligeable (Araki et al. 2013; de Almeida et al. 2014)

Un essai de greffe de feuillet épithélial pigmentaire rétinien (EPR) issu de la différenciation d'iPS chez un patient atteint de dégénérescence maculaire humide liée à l'âge (la plus répandue) a été réalisé. Une membrane néovasculaire choroïdienne dans l'espace sous-rétinien au niveau de la macula se développe.

En conclusion, chez le patient (sans traitement immunosuppresseur), aucun de signe de rejet et aucun évènement grave n'a été détecté mais il n'y a pas eu d'amélioration notable de l'état du patient par rapport aux injections d'antiVEGF. Pour le deuxième patient, des feuillets de bonnes qualités n'ont pas réussi à être produits (Mandai et al. 2017).

Les cellules dérivées des iPS ont donc de multiples applications chez l'homme, elles ont permis de lier les mutations génétiques et le phénotype cellulaire. Les futures étapes sont la réussite d'utilisation des iPSC en médecine régénérative, et la reprogrammation *in vivo*.

e. Utilisation des cellules souches : Réglementations

Les recherches sur les cellules souches offrent de grands espoirs en termes de traitements pour des pathologies dont les solutions sont partielles ou inexistantes. Pour que les recherches se déroulent sans dérive éthique, il est nécessaire d'encadrer la recherche fondamentale autour des cellules souches.

En France, dans le cadre de la recherche l'embryon est considéré comme une « personne humaine potentielle ». La nouvelle loi de bioéthique 2020 distingue les CSEh des embryons, ces deux types de recherches ne conduisant pas aux mêmes questionnements éthiques. Pour les CSEh, il n'est plus nécessaire de demander une autorisation mais une simple déclaration de recherche à l'Agence de la biomédecine. Les cellules souches embryonnaires peuvent être produites à partir d'embryons issus d'assistance médicale à la procréation (après consentement libre et éclairé du couple à l'origine des embryons) :

- Embryons sains congelés : ne faisant plus l'objet d'un projet parental
- Embryons dont la qualité ne permettent pas leurs utilisations à des fins de procréation
- Embryons porteurs de maladies génétiques : mis en évidence par les diagnostics préimplantatoires

La loi de bioéthique 2020 encadre également l'utilisation des IPS dans des situations éthiquement sensibles. Les protocoles de recherches utilisant les IPS cellules et visant leur différenciation en gamète, leur agrégation à des cellules extra-embryonnaires sont également soumis à déclaration à l'Agence de la biomédecine préalablement à leur mise en œuvre. Cette même loi précise les contours de l'interdiction actuelle visant la création d'embryons transgéniques et chimériques. Pour les CSA et placentaires on applique le cadre légal générale pour les cellules issues du corps humain.

Au sein des nations de l'Union Européenne, les législations divergent.

On peut faire un état des lieux des nations étrangères qui ont un comportement assez différent les uns des autres :

- Législation permissive : la majorité des techniques sont permises pour la recherche sur l'embryon, à l'exception du clonage reproductif (USA, Singapour, Belgique et Royaume-Uni)
- Législation permissive avec restrictions : les recherches sur l'embryon et les lignées de CSE humaines sont permises ainsi que la dérivation de nouvelles lignées à partir d'embryons surnuméraires. Par contre,

la technique de clonage thérapeutique et la création d'embryons pour la recherche sont interdites (Canada, Pays-Bas et Brésil)

- **Législation restrictive** : les recherches sur l'embryon (donc dérivation de lignées de CSE) sont interdites, mais les recherches utilisant des lignées importées de l'étranger sont autorisées (Allemagne, Italie)
- **Législation d'interdiction** : l'ensemble des recherches est interdit (Irlande, Lituanie, Norvège, Pologne, Slovaquie et Russie)

Les législations internationales sont influencées par les débats éthiques, moraux ainsi que les contextes religieux et sociaux qui déterminent la « **valeur de l'embryon** ». Les cultures ne s'accordent que sur un seul principe : l'embryon ne peut pas être instrumentalisé à des fins de recherche donc conçu uniquement dans cette seule finalité.

Les travaux évoluent tellement que les lois évoluent rapidement, l'International Society For Stem Cell Research et une coalition de 90 organisations ont envoyé une requête au NIH afin de soutenir les recherches sur les tissus fœtaux.

On constate donc que de vraies disparités existent entre les nations et conduisent à légiférer de plus en plus.

En France la recherche sur les CSEh est permise mais ne se fait que sur des embryons surnuméraires issus de FIV ou sur des lignées importées.

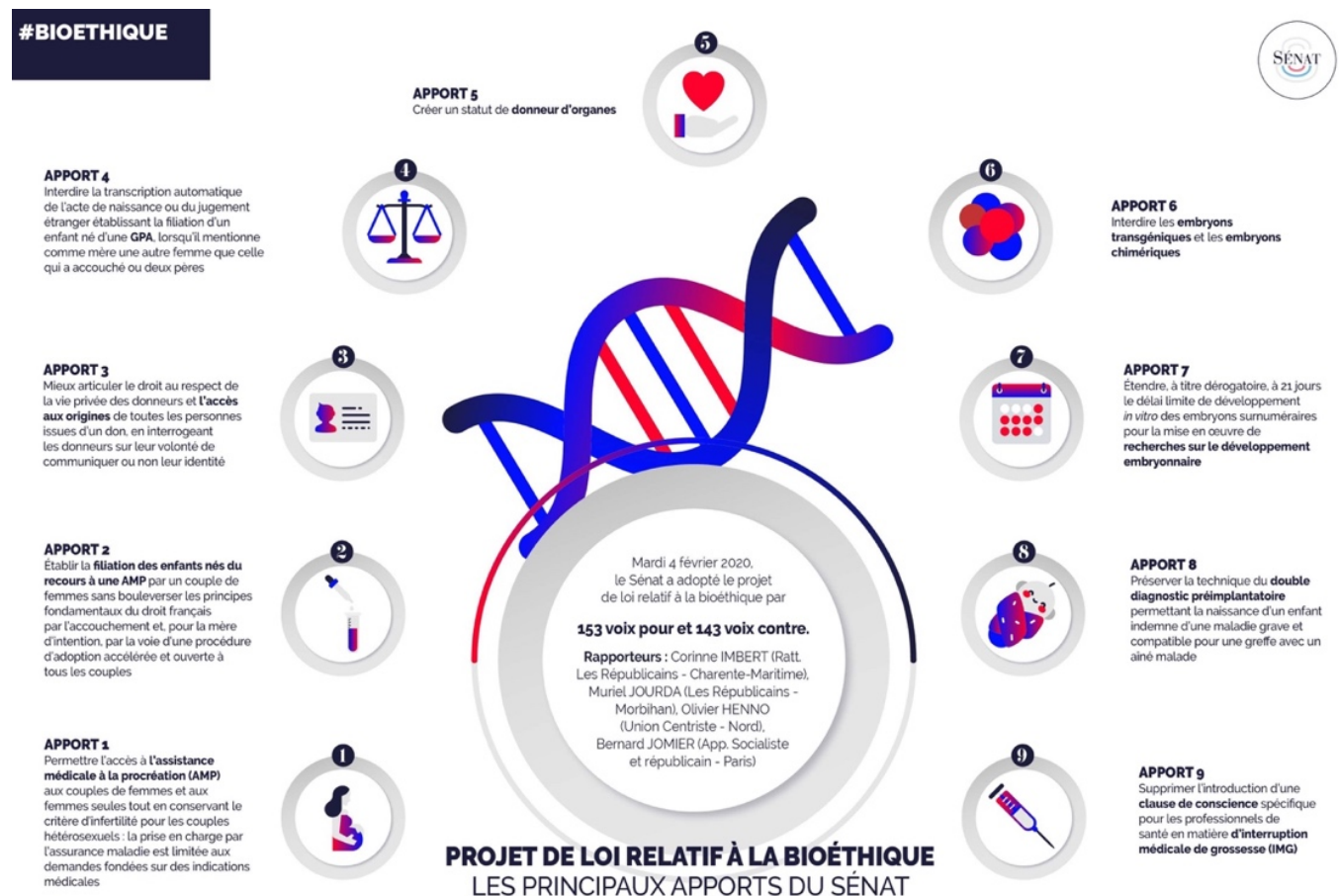
Les législations évoluent rapidement : en France on peut d'attendre à des modifications des textes de lois avec l'arrivée fin 2020 de la nouvelle loi de Bioéthique. On a donc répondu aux besoins de la recherche tout en limitant les pratiques excessives qui peuvent dévier vers un eugénisme positif puis négatif.

On peut s'inquiéter de l'ouverture et de l'absence d'encadrement par la loi de certains pays et États des pratiques de clonage que ce soit pour la recherche, la thérapeutique et encore plus pour la reproduction.

Nous verrons plus tard comment les nations gèrent l'utilisation clinique des cellules souches notamment avec les produits de thérapie cellulaires, et les MTI.

Figure 20 Projet de loi de bioéthique 2020 approuvé par le sénat

La nouvelle loi de bioéthique ouvre le cadre réglementaire des recherches sur les embryons mais encadre l'utilisation des iPS et interdit la génération de chimère et d'organismes transgéniques.



f. Conclusion

Au travers des caractéristiques et des utilisations de ces cellules souches, on peut se rendre compte du pouvoir et du potentiel exceptionnel de ces cellules qui représentent un monde de possibilités en termes de thérapeutiques. Leurs caractéristiques individuelles permettent de les envisager dans des traitements de plus ou moins long terme. La meilleure compréhension du comportement de ces cellules et de leur innocuité permettra de générer un ensemble de moyens et de solutions nécessaires au développement de produits cellulaires. On peut moduler leur utilisation en fonction de la quantité, de la plasticité, des potentiels et des risques.

Tableau X Résumé des caractéristiques des cellules souches utilisables pour la recherche (Herberts, Kwa, et Hermsen 2011)

	Cellules souches pluripotentes		Cellules souches multipotentes			Cellules souches unipotentes
	CSE	IPS	CSH	CSM	CSN	
Potentiel de Différenciation	Illimité Tous les types cellulaires	Illimitée mais difficile Potentiellement tous les types cellulaires	Limité aux lignées myéloïdes et lymphoïdes	Limité mais potentialisé <i>in vitro</i> par la transdifférenciation	Limité à la lignée neurale	Limité à un seul type de cellule
Accessibilité technique	Facile	Très Facile	Facile	Facile	Difficile pour endogènes Facile pour exogènes	Plus difficile
Culture : capacité de prolifération et d'amplification <i>in vitro</i>	Grande & illimitée	Grande & illimitée	Limitée par la senescence cellulaire	Limitée par la senescence cellulaire	Limitée par la senescence cellulaire	Limitée par la senescence cellulaire
Quantité	Illimitée	Illimitée	Très importante	Très importante	Endogènes : limitée Exogènes : importante	Importante
Plasticité	Très forte	Très forte	Faible	Forte	Forte	Nulle
Risques tumorigène	Très fort mais dépend de son utilisation (injection non différenciées)	Très fort mais dépend de son utilisation (injection non différenciées) & mutagénèse insertionnelle	Aucun	Faible et contrôlable	Faible et contrôlable	?
Risques immunitaires	Présent mais faible, nécessite une compatibilité HLA	Sans	Présent, nécessite une compatibilité HLA plus ou moins précises en fonction de la source	Faible	Faible	Présent, en cas d'allogreffe nécessite compatibilité HLA
Facilités légales	Faible, dépend du pays	Très forte	Forte, encadrement légal	Forte, encadrement légal	Forte, encadrement légal	Forte, encadrement légal
Facilités éthiques	Faible	Très forte	Très forte	Très forte	Très forte	Très forte
Applications thérapeutiques	Envisageables	Envisageables	En routine, chimiothérapies par exemple	Existe	A venir	En routine, pour les greffes de peau

3. Les défis de la thérapie cellulaire

Quand on veut mettre au point un traitement de thérapie cellulaire, plusieurs étapes de réflexion et de recherche sont nécessaires.

a. Identification de la pathologie

- Quel(s) type(s) cellulaire(s) utiliser pour corriger le mécanisme défectueux ?
- Suffirait-il au développement de l'environnement nécessaire à son bon fonctionnement ?
- Permettrait-il d'interagir avec les autres cellules ? (Processus de signalisation, de bonne vascularisation...)
- Est-il nécessaire de modifier la cellule, par thérapie génique par exemple, avant de l'injecter ?

b. Assurance d'un traitement sur le long terme :

Est-il préférable d'utiliser des cellules différenciées ou des cellules souches ?

La thérapie cellulaire a pour but d'être un traitement en administration unique visant à réparer les tissus sur le long terme.

- Cellules différenciées : elles doivent avoir une longue durée de vie *in vivo*
- Cellules souches : elles doivent être en capacité de proliférer *in vivo* et de générer des cellules matures

c. Innocuités des produits cellulaires administrés :

On recherche des cellules capables de survivre et de proliférer longtemps au sein de l'organisme. Il y a donc un risque de cancérisation des cellules. Il est difficile de délivrer des thérapies rapidement sachant qu'il est impératif d'exercer des contrôles (souvent assez long) afin :

- De détecter les anomalies génétiques de façon très fine
- De s'assurer que les cellules remplissent leur rôle attendu

Dans le cas de thérapies dont la source est allogénique, on surveillera et on prédira les phénomènes d'immunogénicité.

d. Assurer une bonne vascularisation des tissus :

Les cellules sont-elles alimentées par la circulation pour assurer leur bon fonctionnement ?

Les cellules survivent dans l'organisme lorsqu'elles sont à une distance de moins de 200 microns d'un vaisseau. Les capillaires assurent l'échange d'oxygène, de gaz carbonique et de nutriments permettant la survie et la prolifération des cellules. L'utilisation de progéniteurs endothéliaux permettent d'induire l'angiogenèse ainsi de créer de nouveaux capillaires.

e. Localisation de la zone à greffer :

Il faut prendre en compte :

- L'accessibilité de la zone à traiter
- Les phénomènes de migration et de rétention de cellules
- Les caractéristiques de la cellule et ses capacités d'interaction avec le milieu.

f. Les cellules vont-elles survivre et proliférer ?

Les interactions entre cellules sont nombreuses au sein d'un tissu.

- Il faut connaître les types cellulaires avec lesquels le PTC ou MTI interagit.
- Il est nécessaire de connaître la fonctionnalité du tissu de soutien et le restaurer si lui aussi est lésé. Cela permettra d'apporter les facteurs de survie, de prolifération et de différenciation aux cellules.

4. Risques et dangers de l'utilisation des produits cellulaire

Malgré le potentiel exceptionnel des cellules souches dans leur ensemble, la thérapie cellulaire peut engendrer des risques, des effets secondaires, des effets indésirables et des complications pour les patients. On se concentrera sur les risques spécifiques dus aux thérapies cellulaires. On laissera de côté volontairement les risques communs avec les autres traitements.

Il est difficile de mettre au point des cellules souches avec un seul type cellulaire de façon homogène et de garantir leur stabilité après leurs implantations.

- La culture des cellules en laboratoire peut provoquer modifications physiologiques et des mutations liées aux procédés de culture, d'amplification, leur proximité avec des xénogènes. Ces manipulations introduisent aussi le risques de contaminations microbiologiques.
- Cela entraîne un risque de tumorigénicité. Dans le cas de traitement réalisé à partir de cellules différenciées issues de CSEh il suffit qu'une seule cellule ne soit pas différenciée pour générer un tératome en proliférant de façon illimitée.
- On contrôle et limite ces risques en utilisant des cellules souches de grade clinique qui répondent à un ensemble de critères définis. En développant des protocoles de production industriels par système robotisé, on produit des éléments de qualité identiques, reproductibles et robustes.

Un risque d'incompatibilité immunitaire donneur-receveur existe dans le cas d'usage de cellules allogéniques.

- Les recherches explorent la possibilité des lignées de donneurs universelles qui auraient des marqueurs invisibles pour la majorité des systèmes immunitaires de patient.
- En utilisant le même principe de donneur O+, qui peut donner son sang à l'intégralité de la population. Les japonais ont produit déjà produit ce type de lignées et les utilisant dans le cadre de deux essais cliniques pour la maladie de Parkinson et la DMLA.

5. Perspectives d'évolution de la thérapie cellulaire

En 2010, les Big-pharma étaient frileuses de se lancer en interne dans ce domaine. Elles préféraient se concentrer sur des partenariats avec des biotechnologies et des instituts de recherche. De même, leur intérêt concernait la modélisation cellulaire pour le screening à haut débit de leurs molécules et non pas l'usage thérapeutique. En effet ces laboratoires, à l'affût d'un premier succès clinique pour des produits cellulaires allogéniques, étaient intéressés par une distribution large et simplifiée.

L'ensemble du marché de la thérapie cellulaire est évalué à 2,8 milliards d'USD en 2020 et devrait atteindre 5,6 milliards d'USD en 2025, avec un taux de croissance annuel de 14,4% de 2020 à 2025 (NASDAQ MARKET NEWS 2020). Cette croissance repose sur la diversification des activités de la thérapie cellulaire :

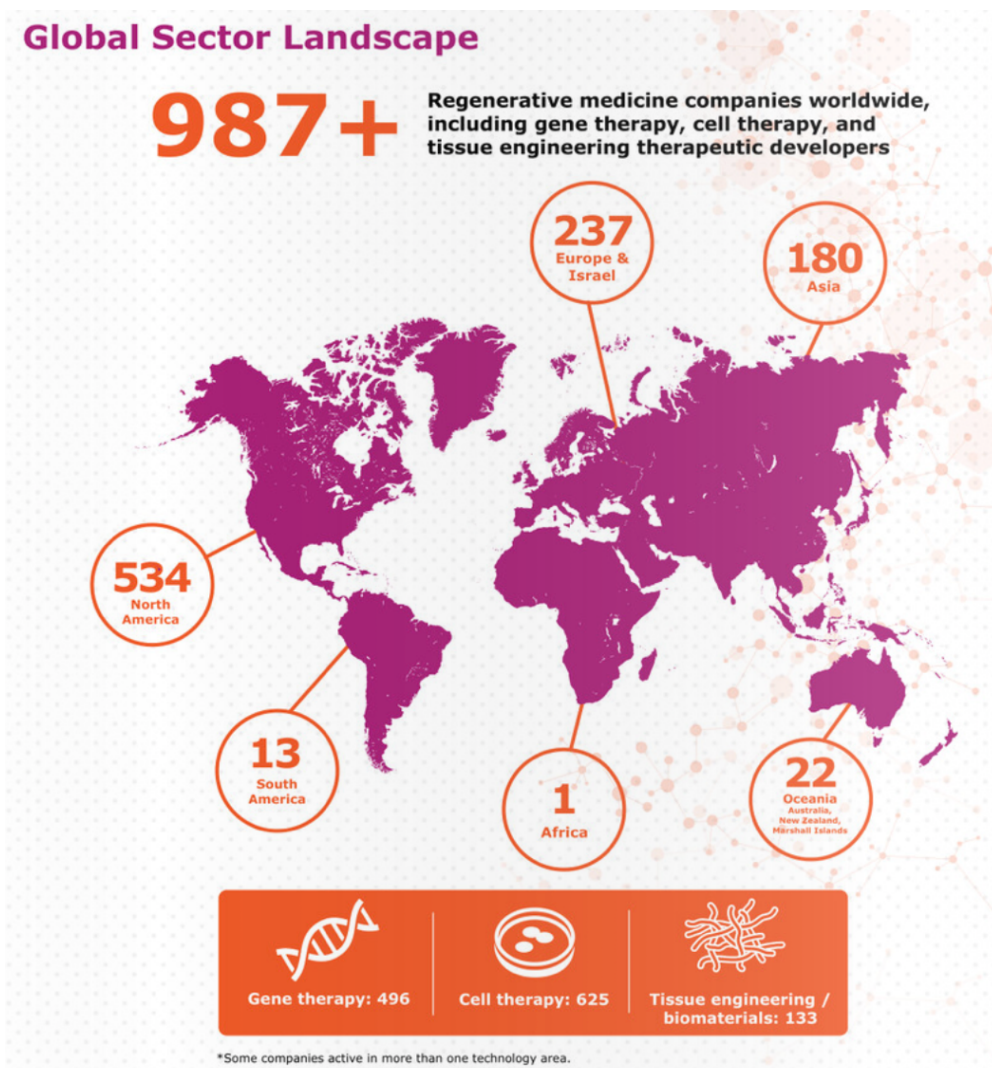
- Développement de la médecine régénérative et de la médecine de précision
- Développement des médicaments de thérapie avancées

Aujourd'hui, les progrès technologiques visant à accélérer et uniformiser la production et le stockage soutiennent le marché activement.

On est passé d'un marché qui n'intéressait que les chercheurs et les biotechnologies à environnement compétitif :

- Développement de solution par les laboratoires de bioproduction
- Investissements des grosses sociétés, des institutions et des fonds de ventures capital
- Apparition de nombreux nouveaux acteurs.

Figure 21 Paysage international du marché de la thérapie cellulaire (Santé 2030, Leem)



6. Réglementations concernant l'utilisation et le développement des produits de thérapie cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment (page 4), les traitements sont séparés en différentes catégories. Pour chaque dénomination : leurs développements, les essais cliniques, leurs AMM, leurs fabrications et leurs utilisations ne suivent pas les mêmes réglementations (**Tableau XI**).

Tableau XI Réglementations en vigueur pour les PTC, MTI et MTI-PP

	PTC	MTI	MTI-PP
Statut	Cellules ou tissus	Médicament biologique	Médicament biologique
Contexte réglementaire des recherches	Recherche impliquant la personne humaine (RIPH)		
Contexte réglementaire de développement	-Exigences décrites dans les directives européennes 2004/23/CE, 2006/17/CE et 2006/86/CE -Spécificités françaises décrites dans le code de la santé publique , du fait de l'autorisation nationale.	Européen →Règlement 1394/2007/CE →Directive 2001/83/CE	- Européen :Règlement 1394/2007/CE - Français : Loi n°2011-302
Réglementation essais cliniques	Réglementation essais cliniques	Approche plus détaillée, basée sur le risque (Risk Based Approach : RBA). Tout le long du développement jusqu'à la soumission de l'AMM : → Identification des risques liés à l'utilisation cliniques du MTI → Identification des facteurs de risques contribuant aux risques caractérisés précédemment → Cartographier les données pertinentes autour des risques identifiés	Approche plus détaillée, basée sur le risque Tout le long du développement jusqu'à la soumission de l'AMM : → Identification des risques liés à l'utilisation cliniques du MTI → Identification des facteurs de risques contribuant aux risques caractérisés précédemment → Cartographier les données pertinentes autour des risques identifiés
AMM	Procédure d'autorisation Nationale ANSM délivre l'AMM après avis de l'ABM -Autorisation de "procédés de préparation et de conservation" - Indications thérapeutiques revendiquées doivent être validées Art. L.1243-2 du CSP	Procédure d'autorisation Européenne centralisée Évaluation et AMM par l'EMA -évaluation est réalisée par le CHMP en collaboration avec le CAT	Procédure d'autorisation Nationale ANSM délivre l'AMM après avis de l'ABM -Autorisation de "procédés de préparation et de conservation" Art. L.5121-1 17è du CSP
Lieu de fabrication	Production unités thérapie cellulaire	Établissement pharmaceutique ou de santé autorise par l'ANSM	Établissement pharmaceutique
Réglementations de fabrication	Bonnes pratiques « tissus – cellules »	BPFm spécifiques MTI	BPFm spécifiques MTI
Dispensation	Unité de thérapie cellulaire	Pharmacie à usage interne	Lieu de fabrication directement à l'unité de soins
Vigilance	Biovigilance	Pharmacovigilance EMA	Pharmacovigilance
Exportation	Possible	Possible	Impossible

Les pathologies que l'on cherche à traiter sont souvent grave, rares et ne concernent qu'un petit nombre de personnes, il n'est donc pas facile de procéder aux essais cliniques. Afin d'accélérer la procédure pour les médicaments permettant de traiter des affections dépourvues d'options thérapeutiques disponibles, plusieurs possibilités s'offrent aux MTI :

- Les **autorisations conditionnelles**, mise en place par le règlement européen n°507/2006 et permettant à des médicaments n'ayant pas encore les données suffisantes pour une demande classique d'AMM mais présentant un intérêt particulier dans des maladies **mettant en jeu le pronostic vital**, répondant à une **urgence sanitaire** définie par l'OMS ou portant le statut de médicament orphelin (Commission européenne 2012).

- Les **procédures accélérées pour les médicaments « prioritaires »** [PRIority MEdicine (PRIME)] mises en place en 2016 et ciblant les thérapies innovantes dont les premières données ont montré un effet thérapeutique majeur dans des pathologies graves dont la prise en charge n'est pas satisfaisante voire inexistante (Elsanhoury et al. 2017).

-L'**utilisation compassionnelle** les états membres peuvent autoriser l'utilisation de médicaments non autorisés pour traiter des patients présentant un pronostic vital grave, durable ou gravement handicapant de maladies pour lesquelles aucun médicament actuellement autorisé n'est disponible. Ce n'est pas une approbation centralisée, mais l'EMA peut fournir des recommandations aux autorités nationales concernant l'utilisation compassionnelle de certaines thérapies lorsqu'elles sont demandées.

-**Exemption hospitalière** : Une autorisation qui peut être accordée par les États membres de l'UE pour des MTI non autorisés à utiliser sur une base de patient nommé dans un hôpital l'établissement dans le même État membre seulement et sous la responsabilité exclusive du médecin traitant.

-**Circonstances exceptionnelles** : AMM du médicament en l'absence de données complètes sur l'innocuité et l'efficacité fondées sur des circonstances impossibles à gérer, par exemple, la rareté des patients. Cette autorisation est revue annuellement par un rapport bénéfice / risque.

-**Autorisation temporaire d'utilisation** (ATU, exception purement française) d'un médicament qui ne dispose pas d'une AMM française ou européenne, afin de traiter des maladies graves ou rares qui ne disposent pas de traitement adéquat. L'ATU peut être accordée pour un patient particulier (AMM nominative), ou pour un groupe de patients (AMM de cohorte). La firme pharmaceutique doit justifier l'efficacité présumée du médicament dont l'évaluation est insuffisante, et s'engager à déposer une AMM dans un délai fixé.

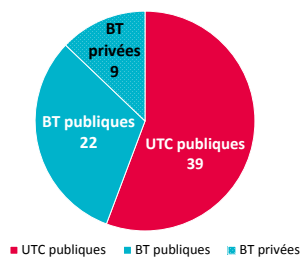
Ces thérapeutiques sont une vraie source d'espoir pour certains malades, qui après des années d'errance thérapeutique, cherchent la solution miracle. Le marché de la thérapie cellulaire et des cellules souches attire de nombreux protagonistes cherchant à vendre des traitements extrêmement chers dont l'efficacité et l'innocuité ne sont pas démontrées. C'est pour cela qu'au niveau européen c'est le CAT (Comitee for Advanced Therapy) qui évalue les dossiers d'AMM, classe les MTI, produit des avis scientifiques, élabore des recommandations et délivre des certifications. Il est important de préciser que depuis avril 2020, le CAT prévient les patients des thérapies cellulaires non prouvées existantes et des risques d'effets indésirables, suite à la recrudescence au niveau de l'Europe de publicité pour des traitements de maladies graves.

Etat des lieux des établissements français autorisés à la préparation, conservation, distribution, cession des produits de thérapie cellulaire ou tissulaire

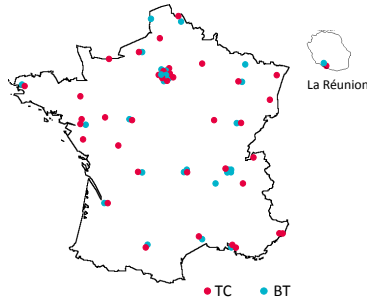
Panorama des unités de thérapie cellulaire et des banques de tissus en France

- **70 établissements** sont autorisés¹ : **39 unités de thérapie cellulaire (TC)** publiques et **31 banques de tissus (BT)** (22 établissements publics et 9 établissements privés).
- Ces établissements sont répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain et sur l'île de la Réunion.
- Concernant la répartition en effectifs, 10 équivalent temps plein (ETP) en moyenne sont dédiés au sein des banques de tissus pour 8 ETP en moyenne en ce qui concerne les unités de thérapie cellulaire.

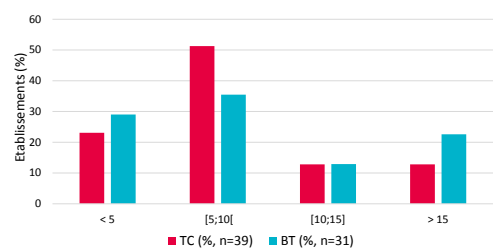
Répartition public/privé des établissements autorisés



Etablissements TC et BT en France



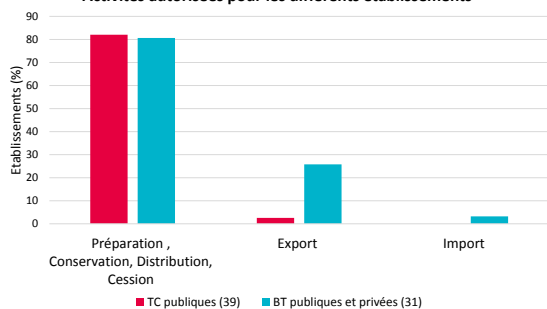
Répartition des effectifs en personnels des établissements (en équivalent temps plein)



Activités des établissements

- Les établissements réalisent pour la majorité l'ensemble des activités de préparation, conservation, distribution et cession.
- 9 établissements seulement sont autorisés pour des activités d'export (8 BT et 1 TC). Une seule BT est autorisée à l'importation.

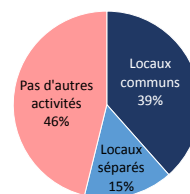
Activités autorisées pour les différents établissements



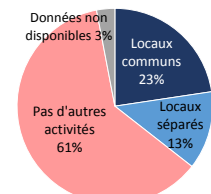
Autres Activités réalisées

Les établissements peuvent réaliser d'autres activités telles que des activités de recherche, de production de médicaments de thérapie innovante (MTI) ou des activités pour le compte d'un donneur d'ordre. Ces activités peuvent être dans les locaux communs aux activités de préparation de tissus ou de cellules ou dans des locaux différents.

Autres activités réalisées par les établissements TC (%)

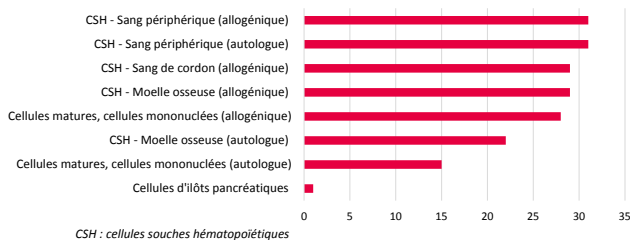


Autres activités réalisées par les établissements BT (%)



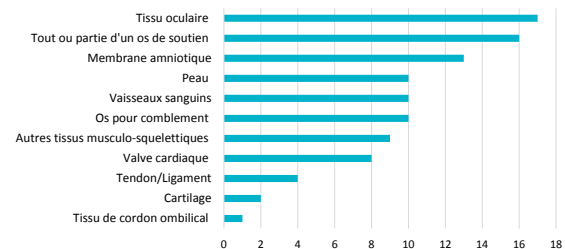
Unités de thérapie cellulaire

Nombre d'établissements autorisés à la préparation pour les différentes catégories de cellules

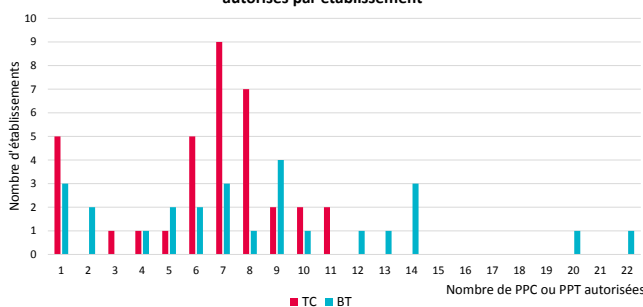


Banques de tissus

Nombre d'établissements autorisés à la préparation pour les différentes catégories de tissus



Comparaison du nombre de procédés tissus ou procédés cellules autorisés par établissement



- Il existe une plus grande diversité de produits de thérapie tissulaire que de produits de thérapie cellulaire.
- Les TC sont autorisées pour la préparation de 7 catégories de cellules au maximum, alors que les banques de tissus sont autorisées pour la préparation de nombreuses catégories de tissus différentes (jusqu'à 13 catégories différentes).
- Les TC sont autorisées pour 6 procédés de préparation cellulaire en moyenne (écart-type = 3) alors que les BT sont autorisées pour 7 procédés de préparation tissulaire en moyenne (écart-type = 6).

¹ Article L.1243-2 du code de la santé publique

II. Ingénierie tissulaire

Les stratégies d'ingénierie tissulaire offrent la possibilité de régénérer des tissus et des organes blessés grâce à la combinaison de cellules dans une architecture 3D pour le remplacement des tissus. L'objectif est de stimuler la régénération de tissus déficients ou de créer des substituts fonctionnels. Les avancées en ingénierie tissulaire ont été gigantesques. Les progrès permettent de réguler les cellules et leur microenvironnement tout en concevant des tissus complexes pour des utilisations cliniques. Les nouvelles sources cellulaires, les biomatériaux intelligents, la bioimpression 3D, l'ingénierie vasculaire, les organoïdes, et les bioréacteurs ont une influence sur le développement rapide de la bioingénierie.

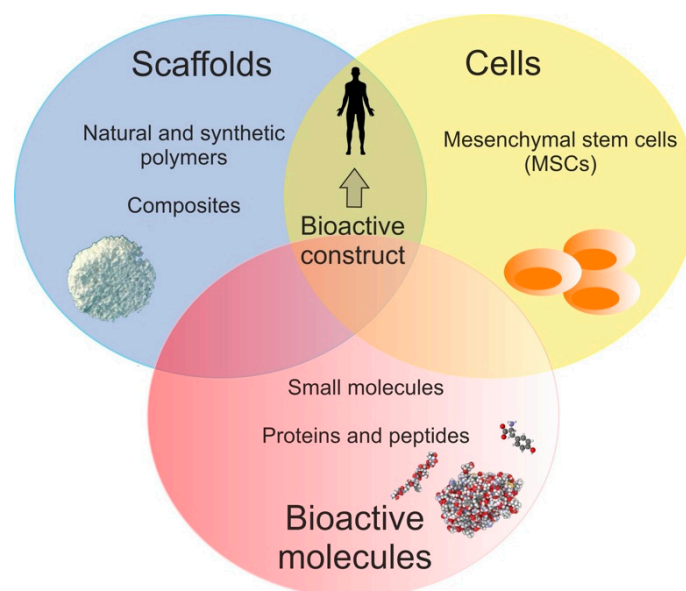
1. Définition

L'ingénierie tissulaire est un domaine multidisciplinaire qui utilise des cellules ou tissus ayant fait l'objet d'une manipulation pour en modifier les caractéristiques biologiques. Le but étant de réparer, régénérer et améliorer la fonction du tissu ou de l'organe. Le génie tissulaire commence par l'obtention des bons types de cellules permettant une régénération tissulaire fonctionnelle et une action sur le long terme. L'utilisation de cellules matures dans ce type d'approche est parfois difficile du fait du faible pouvoir prolifératif de certaines cellules matures. L'utilisation de cellules souches permettant une différenciation en cellules matures ou permettant un effet de tropisme semble être une voie plus facile pour ces approches.

Grâce à l'ingénierie tissulaire on peut apporter des solutions thérapeutiques telle que la greffe afin de remplacer la peau, les os, les vaisseaux sanguins, les nerfs ou encore les valves. La peau et le cartilage artificiels sont des exemples de tissus artificiels qui ont été approuvés par la FDA ; cependant, ils ont actuellement une utilisation limitée chez les patients humains.

Une des applications les plus développées en ingénierie tissulaire est le remplacement de valve aortique. Les recherches et les avancées reposent sur la conception et le traitement des biomatériaux, la caractérisation des surfaces, et la fonctionnalisation des matériaux avec l'apport plus ou moins important de cellules pour améliorer les interactions entre cellules et les biomatériaux.

Figure 22 Paradigme de l'ingénierie tissulaire, trois domaines efficients à eux seuls se combinent pour créer une synergie (Klimek et Ginalska 2020)



L'ingénierie tissulaire repose sur la combinaison de trois piliers : les cellules, les molécules bioactives et les supports afin d'élaborer des constructions bioactives et fonctionnelles qui restaurent les fonctionnalités des tissus remplacés (**Figure 22**).

On peut utiliser les produits issus de l'ingénierie tissulaire pour :

- une implantation directe
- la livraison de molécules bioactives et de facteurs de croissance au sein de tissus cibles
- créer des supports sans cellule permettant la migration et l'implantation de cellules déjà présentes chez le patient
- créer des structures complexes : composées de cellules soutenues par un support lui-même constitué de biomatériaux

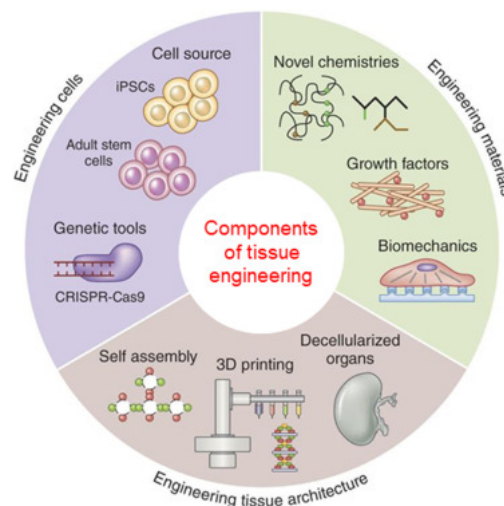
L'ingénierie tissulaire permet :

- la régénération des tissus
- la modélisation biologique pour le criblage de nouvelles thérapeutiques : modèles 3D, interactions cellulaires, interactions cellules-microenvironnements....

La caractéristique principale pour le choix du matériel est la **biocompatibilité**, il faut que les matériaux interagissent correctement avec les cellules pour ne pas induire de toxicité pour les cellules implantées sur le support ou pour les cellules allant colonisées le support. En effet, les matériaux doivent pouvoir être dégradés, résorbés ou métabolisés *in vivo* ou rester intact sans interaction sur le long terme afin de garantir la sécurité du produit et pouvoir envisager son utilisation clinique.

En France de nombreux acteurs se positionnent sur l'ingénierie tissulaire et proposent des solutions novatrices, c'est un domaine dynamique bien implanté. Notamment avec l'Établissement Français du Sang (EFS) qui est le premier fournisseur en France de cellules et de tissus destinés à la greffe, l'EFS est aussi le premier producteur de médicaments innovants pour les essais cliniques de phase 1 et 2 sur le plan national. Il a créé en son sein un établissement pharmaceutique, composé d'un siège et de 5 plateformes de production et de contrôle des MTI (les plateformes ne font pas que de l'ingénierie tissulaire).

Figure 23 Composants nécessaire au développement de l'ingénierie tissulaire (Chandra, Soker, et Atala 2020)



2. Cellules

L'ingénierie tissulaire utilise plusieurs sources de cellules en fonction du tissu cible et des caractéristiques immunologiques. Nous avons décrit précédemment les différents types de cellules souches existantes.

Nous nous intéresserons dans ce travail aux CSE, iPSC et les cellules souches adultes autologues ou allogéniques, leurs caractéristiques communes sont leurs capacités d'autorenouveau et de différenciation.

Les fibroblastes ont été les premières cellules utilisées pour générer des substituts de peau. Malgré les différences d'histocompatibilité, ce sont des produits qui ont eu un succès dans la mesure où la peau ne

contient pas de cellules présentatrices de l'antigène. Les cellules des substituts de peau pourraient être rejetées, mais les greffons ont suffisamment de temps pour que les propres cellules de la peau des patients se régénèrent. On s'est rendu compte que la transplantation d'organes ne pouvait pas se faire de la même façon dans la mesure où le rejet cellulaire existe.

Le risque de rejet immunitaire est bien présent, afin de garantir le succès des greffons allogéniques on peut :

- réaliser des modifications génétiques et supprimer l'expression des CMH de classe I, et de classe II.
- induire une tolérance immunologique chez les receveurs de greffes allogéniques dérivées de cellules souches. Par exemple, en traitant l'hôte par des anticorps monoclonaux contre les antigènes CD4 et CD8 des cellules T (Lui, Fairchild, et Waldmann 2010). Cette technique permettrait d'étendre les thérapies cellulaires et de les rendre sûres et économiquement viable.
- générer des haplobank de 50 à 200 lignées selon les conditions des BPF qui permettrait une compatibilité complète et efficace au niveau des principaux loci du CMH (HLA-A, -B et -DR). On peut réduire davantage le nombre de lignées nécessaire en utilisant des embryons parthénogéniques et répondre aux besoins de la majorité de la population (De Vos 2015).

Des thérapeutiques utilisant les cellules autologues du patient ont été développées, leur production nécessite cependant un certain temps et les cellules du patient ne sont parfois pas disponibles en quantité suffisante. Cependant des médicaments utilisant cette approche sont commercialisés :

- **Spherox** (CO.DON AG, Allemagne) a reçu une AMM (chondrocytes humains autologues associés à une matrice) dans le traitement chez l'adulte des lésions cartilagineuses articulaires symptomatiques du genou dont la surface n'est pas supérieure à 10 cm². Ce sont des chondrocytes humains autologues associés à une matrice sous forme de suspension pour implantation (European Medicines Agency 2017).
- **Holoclar** (Chiesi Farmaceutici, Italie) est une thérapie cellulaire autologue à base de cellules souches limbiques sur une membrane de fibrine. Depuis mars 2015, elle est commercialisée en Europe pour la déficience de cellules souches limbiques des yeux.
- **Epicel** (Genzyme, MA, États-Unis) est un produit de remplacement cutané permanent à base de kératinocytes autologues expansés pour les patients souffrant de brûlures potentiellement mortelles (Ehrenreich et Ruszczak 2006).
- **Carticel** (Genzyme, MA, États-Unis), un traitement à base de chondrocytes pour les grandes lésions du cartilage articulaire (Maeda et al. 2005).

a. Cellules souches embryonnaires

Comme nous l'avons vu, les défis pour l'utilisation des CSE pour la thérapeutique sont nombreux, notamment la **sécurité**. En effet, un **risque de tumorigénicité** persiste et est dû aux cellules indifférenciées résiduelles qui peuvent générer des tératomes *in vivo*, mais ce risque peut être potentialisé en utilisant un traitement immunosuppresseur. Il faut donc fournir davantage de garanties pour le succès de ces traitements, en termes de pureté des échantillons avant l'inoculation.

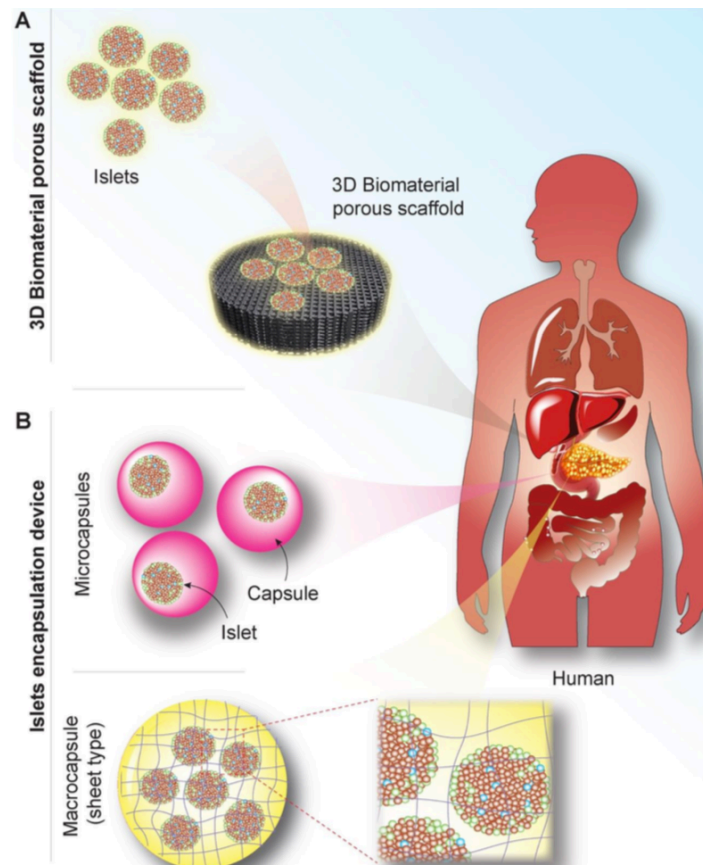
Pourtant un premier traitement à base d'oligodendrocytes (AST-OPC1) dérivés de CSEh, est entré en phase d'essai clinique I/IIa. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sécurité de doses croissantes séquentielles croisées d'AST-OPC1 administrées dans 5 cohortes à un moment unique entre 21 et 42 jours après la blessure, inclusivement, à des sujets souffrant de lésions subaiguës de la moelle épinière cervicale. Les oligodendrocytes stimulent la croissance du système nerveux de patients présentant des lésions de la moelle épinière (N. Li et Leung 2015).

De même les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dérivées de CSE ont pu être utilisées dans le cadre d'essais pour la DMLA et la dystrophie maculaire de Stargardt. En différenciant progressivement les CSE, les chercheurs ont produit des neurones dopaminergiques fonctionnels, durant un essai non clinique (J.-H. Kim et al. 2002). Les études précliniques chez les primates laissent penser qu'une greffe peut engendrer une correction physiologique de la fonction dopaminergique du cerveau (Lemmens et Steinberg 2013).

Une étape de maturation *in vivo* est nécessaire chez certaines cellules comme les progéniteurs pancréatiques endocriniens de cellules productrices d'insuline de type β (Nostro et Keller 2012). Afin de développer des thérapeutiques, les protocoles de production de CSE et de différenciation en progéniteurs pancréatiques ont été mis au point dans des conditions répondant aux BPF. Il est prévu que les cellules greffées seront

sensibles à une attaque immunitaire aiguë, à la fois par les cellules T allo-réactives et par les cellules T auto-immunes qui ont initialement causé le diabète de type 1 des patients. Une stratégie pour éviter cela consisterait à livrer un produit issu du génie tissulaire dans lequel les cellules thérapeutiques seraient encapsulées dans un dispositif semi-perméable conçu pour les protéger du système immunitaire, tout en permettant l'échange de nutriments et la libération d'insuline dans la circulation (Primavera et al. 2020) (Figure 24).

Figure 24 Illustration d'approches de dissimulation des îlots vis à vis du système immunitaire (Primavera et al. 2020)



b. Cellules souches pluripotentes induites

Les iPSC ressemblent beaucoup aux CSE en ce qui concerne leurs propriétés d'auto-renouveaulement, de différenciation et de génération de tératomes *in vivo*. La technologie de reprogrammation est devenue **plus sûre et efficace** en réduisant le risque de modification génétique permanente involontaire donc le potentiel de tumorigénicité future. On a pu voir le développement de la transdifférenciation dans le domaine de la reprogrammation cellulaire. Mais des incertitudes sont encore présentes pour l'utilisation de ces cellules concernant les signatures résiduelles possibles des cellules d'origine, le phénotypes adultes incertain, ou encore risque d'introduction de maladies génétiques.

Le développement de techniques alternatives de reprogrammation fait penser que les iPSC sont d'excellents candidats pour l'ingénierie tissulaire. Pour qu'elles soient effectivement utilisées, les constructions de qualités cliniques devront répondre aux conditions des BPF. Sur le plan réglementaire, il faudra garantir la performance et la sécurité à long terme, comme c'est le cas pour toutes les thérapies cellulaires et tissulaires.

c. Cellules souches adultes

Elles représentent une approche plus simple pour le développement clinique rapide, elles ont l'avantage d'être disponible chez le fœtus et l'adulte et leur différenciation se fait de façon plus restreinte. Les cellules souches adultes utilisées en routine sont les CSM, et n'ont pas de potentiel tumorigène intrinsèque. Les CSM peuvent donner de multiples tissus comme le cartilage, les os, les tissus adipeux et certains types de muscles. Elles sont faciles d'accès (liposuction, prélèvement de MO ou isolement à partir de cordon ombilical) et ne provoquent pas de rejet immunitaire significatif. On pourra utiliser leurs propriétés en médecine régénérative, notamment pour le développement de tissu hépatique. (Chandra, Soker, et Atala 2020). Elles sont utilisées dans l'ingénierie tissulaire du cœur (**Heartsheet**), des articulations et de l'épiderme.

On peut citer comme thérapeutiques :

- **Holoclar** dont on a déjà parlé précédemment est élaboré à partir de cellules souches limbiques.
- **Maci** (Genzyme, MA, États-Unis) est un MTI issu de l'ingénierie tissulaire constitué de chondrocytes du patient sur une membrane de collagène d'origine porcine. Indiquée dans les défauts cartilagineux du genou, il a reçu son AMM en juillet 2013 puis a été retiré du marché en septembre 2014. Le CHMP a conclu qu'en absence de site de fabrication autorisé pour la production du principe actif et du produit fini et la libération des lots, les exigences prévues ne sont plus respectées.

3. Biomatériaux

La matrice extracellulaire (MEC) native a de multiples fonctions :

- elle fournit une organisation spatiale, un ancrage et une résistance mécanique pour les différentes cellules d'un tissu
- elle contrôle et régule les fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la propagation, la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose en fournissant des stimuli mécaniques et biochimiques.

Ces fonctions sont remplies par les composants clés : glycoprotéines fibrillaires et non fibrillaires, macromolécules insolubles et les molécules solubles. Chaque élément joue un rôle crucial :

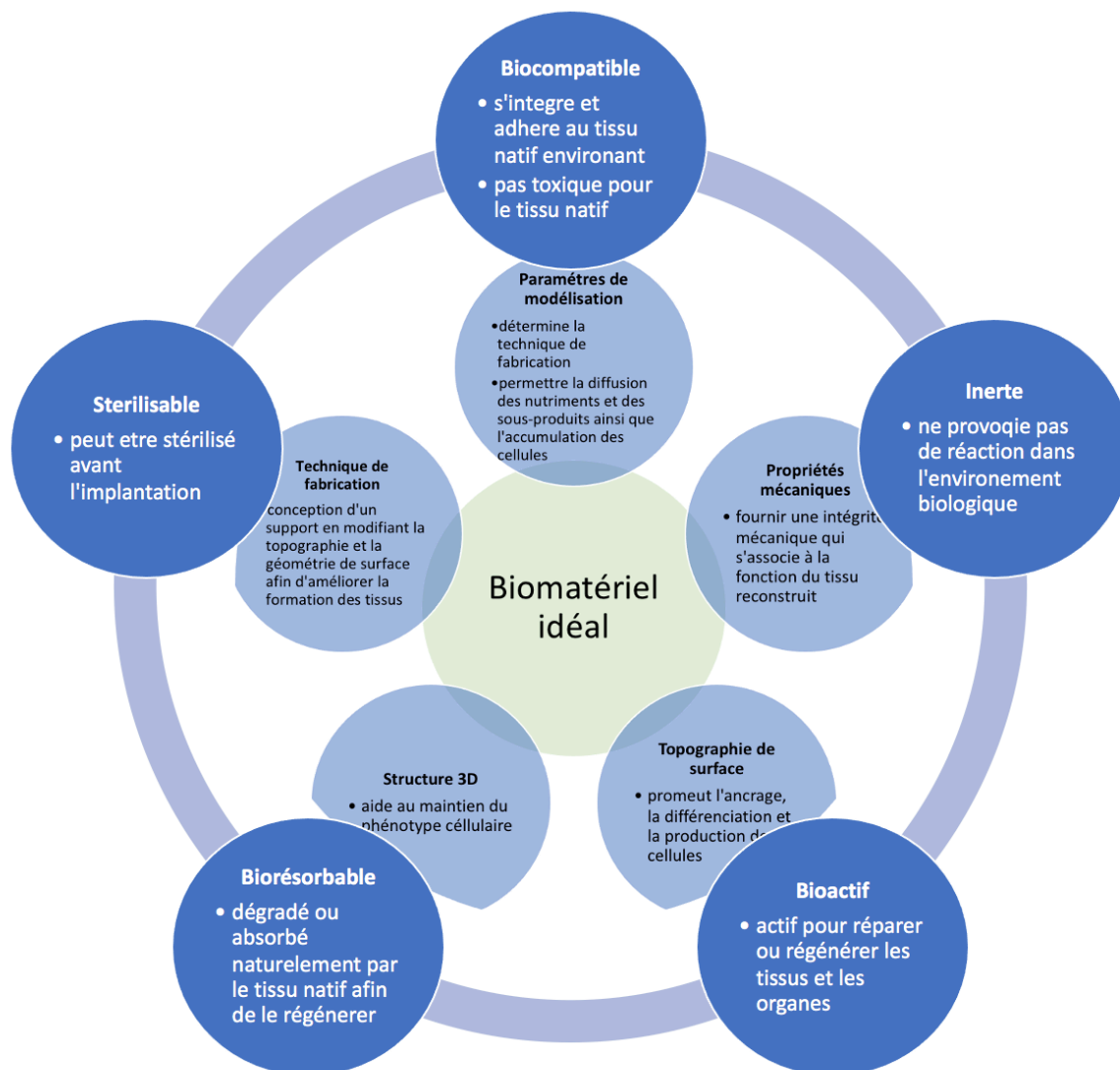
- protéines fibreuses : le collagène (résistance à la traction) et l'élastine (contraction du tissu). Elles contribuent à réticuler la matrice.
- protéines non fibreuses : la fibronectine, la vitronectine et la laminine. Elles permettent l'adhésion cellulaire en se fixant aux récepteurs tels que les intégrines (contacts focaux), et stimulent la signalisation entre les cellules et la MEC

Les cellules peuvent modeler la synthèse ou dégradation de la MEC en synthétisant des enzymes. Il y a une **réciprocité dynamique** entre les cellules et la MEC.

Les biomatériaux destinés aux applications d'ingénierie tissulaire doivent répondre à de nombreuses exigences (**Figure 25**). Ils doivent être principalement biocompatibles, biodégradables et mécaniquement robustes. De plus, ils doivent constituer des constructions poreuses interconnectées en 3D qui imitent la structure de la MEC naturelle. Néanmoins, les caractéristiques spécifiques des biomatériaux (par exemple, la taille des pores ou la résistance mécanique) sont étroitement associées à leurs futures applications. Les tendances actuelles ont déplacé l'accent vers la biologie afin de comprendre puis d'imiter les interactions et les signaux physiologiques. Pour certains biomatériaux utilisés, le but n'est pas d'imiter le tissu natif mais de diriger le remodelage du tissu lésé *in vivo* de telle sorte que le tissu régénéré soit histologiquement et fonctionnellement indiscernable du tissu environnant (Bhagat et Becker 2017).

Ces biomatériaux seront transformés support cellulaire en utilisant diverses méthodes, selon les exigences de la croissance de tissus spécifiques.

Figure 25 Paramètres d'optimisation et propriétés d'un bio matériel idéal



a. Polymères

Les polymères sont reconnus pour leurs grandes diversités de propriétés : mécaniques, porosité, tailles de pores, rapport surface/volume, qui permettent de recréer des tissus durs ou mous. Cependant, il faut être prudent pour ne pas générer de réactions immunitaires ou toxiques, notamment lors de certaines combinaisons de polymères.

i. Biopolymères

Les polymères naturels sont **biocompatibles**⁵ et **biodégradables**⁶, mais on les trouve en petites quantités et possèdent de **mauvaises caractéristiques mécaniques**. Ils sont extraits des animaux, algues, plantes et microorganismes. Les sources étant vivantes, les biopolymères sont similaires aux molécules biologiques et présentent une meilleure compatibilité avec l'organisme. On évite ainsi la toxicité inflammatoire et immunologique que l'on retrouve avec des polymères synthétiques.

Les bio polymères peuvent être utilisés comme :

- composés bioactifs
- véhicules d'administration de molécules telles que des médicaments (Montgomery et al. 2017)
- composants de tissus fonctionnels

⁵ Reconnaissance par le corps vivant

⁶ Dégradation spécifique due à la sensibilité de l'action enzymatique

Ils existent plusieurs types de polymères naturels, en fonction de la structure de base :

- Protéines : fibroïne de soie, collagène, gélatine, kératine, fibrinogène, élastine et actine
- Polysaccharides : chitosane, chitine, alginate, gomme gellane et dérivés
- Glycosaminoglycanes : acide hyaluronique

Pour les cultures 3D on a tendance à utiliser l'alginate, la gélatine, le chitosane, l'acide hyaluronique mais surtout le collagène qui forme un hydrogel à 37 degrés (préserve les cellules encapsulées).

ii. Polymères synthétiques

Ils sont utilisables pour de nombreuses applications médicales y compris les dispositifs nano, micro et macroscopiques, dont les matrices artificielles pour l'ingénierie tissulaire (F.-M. Chen et Liu 2016). On peut en produire de grande quantité avec une **bonne résistance mécanique** mais une **faible biocompatibilité**. Ils permettent d'augmenter la stabilité chimique, les propriétés micro et nano structurales ce qui permet d'améliorer la croissance, l'adhésion, l'étalement et l'infiltration des cellules. Ils permettent une application non invasive.

En routine on utilise les acides polylactique (PLLA), poly-glycolique, poly-ε-caprolactone, polylactique-co-glycolique (PLGA), titane, alliages, céramiques, le polyéthylène-glycol (PEG), polyesters d'acides α-hydroxy, polyesters de lactones, polyorthoesters, polyesters de polyols et d'acides carboxyliques, copolymères en bloc de polyesters ou de polyamides avec du poly(éthylène glycol), polycarbonates, polyuréthanes, polymères dérivés d'acides aminés, poly(acides aminés) et peptides, polyanhydrides, polyphosphazènes, réseaux de polymères réticulés biodégradables, et les polyesters réticulés.

On utilise préférentiellement le PEG, le PLLA, le poly(acide acrylique) et le PLGA pour les structures 3D. Ils permettent de choisir les caractéristiques mécaniques, de dégradation, de poids moléculaires en fonction de l'utilisation désirée. Afin d'optimiser la resorbabilité on préfère les polymères hydrolytiquement dégradables.

Les chercheurs ont essayés de produire des matériaux de troisième génération pour moduler l'adsorption des protéines, l'adhésion et la différenciation des cellules, l'intégration des implants et la réaction des corps étrangers, et pour développer des matériaux synthétiques biomimétiques (Peter X. Ma 2008).

iii. Hybrides :

Ce sont des combinaisons de **polymères naturels et synthétiques** dont on optimise l'hydrophilie, la fixation des cellules et la résorbabilité.

b. **Biomatériaux inorganiques**

Ils peuvent être **naturels** (coquillages, coraux) ou **synthétiques** (métal et céramique). On les utilise pour les soins de parodontie et orthopédiques, car on peut **optimiser la composition, la microstructure et la reproductibilité**. On classe les biomatériaux en fonction de leur capacité de liaison au tissu natif une fois implantés :

- **bioinertes** : n'ont aucune interaction avec le milieu natif une fois greffés c'est le cas de l'alumine, la zircone, le titane et ses alliages. Ils servent de soutiens structurels dans les cas d'implants osseux.
- **bioactifs** : se lient aux tissus natifs afin de combler des défauts osseux. On utilise en parodontie les vitrocéramiques et les verres bioactifs. Des méthodes de fonctionnalisation des biomatériaux inorganiques bioactif sont mises au point, notamment en réalisant une adjonction d'ions Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Si^{4+} qui seront libérés progressivement lors de la résorption (Sandra Pina et Ferreira 2010; S. Pina et al. 2017) et entraînent des modifications physico-chimiques (Mestres, Le Van, et Ginebra 2012). L'objectif étant d'améliorer la biocompatibilité et la résistance mécanique des implants.
- **biorésorbable** : sont absorbés *in vivo* puis remplacé par le tissu vivant par exemple l'os. Les carbonates, les CaP, les CPC et les silicates sont utilisés en routine.

Les biomatériaux inorganiques naturels sont composés de calcium et des sources multiples existent :

- coquillages
- algues

- coraux : permet d'obtenir un matériel riche CaP afin de réparer et régénérer les tissus osseux
- nacres
- éponges
- coquille d'œuf
- os poulets et de poissons

Les biomatériaux inorganiques synthétiques ont plusieurs origines :

- métalliques : résistance élevée, élasticité faible, densité faible
- céramiques (alumine, zircone, les CaP, les ciments de phosphate de calcium, verres bioactifs et les silicates) : bonne biocompatibilité, ostéoconductivité et leur capacité ostéogénique

On module la taille, la morphologie des biomatériaux inorganiques synthétiques grâce aux techniques de production :

- Précipitation aqueuse : permet le contrôle du pH, de la morphologie, de la température de particules ainsi que l'adjonction ou non d'additifs (Fomin et al. 2008).
- Hydrolyse
- Synthèse hydrothermique
- Synthèse sol-gel
- Synthèse mécano-chimique
- Traitement par micro-ondes
- Séchage par pulvérisation

c. Biomatériaux hybrides organique-inorganique

Ce sont des matériaux multifonctionnels avec des caractéristiques structurales, mécaniques et thermiques modulées par la combinaison de composés organiques et inorganiques (X. Wang, Chang, et Wu 2018). Au sein de ces structures hybrides, il est nécessaire de s'assurer de la bonne compatibilité entre les phases organiques/inorganiques pour conserver les caractéristiques de départ (Tonsomboon et Oyen 2013).

Par exemple, grâce à la lixivation particulière on crée un support hybride constitué d'un hydrogel à base d'acide hyaluronique et un matériau poreux en poly(ϵ -caprolactone). Cet hybride permet de retrouver la réponse viscoélastique des tissus cartilagineux tout en ayant une rigidité élevée en tension et en compression. En ensemençant des chondrocytes différenciées on obtient un support similaire au cartilage humain qui sert de modèle cellulaire pour l'étude des réponses aux signaux mécaniques et chimiques (Mintz et Cooper 2014).

d. Modification des supports de polymères

Les structures 3D servent de support à l'ancrage des cellules et s'adapte au tissu natif, on cherche à ce que leurs compositions se rapprochent au maximum de la MEC naturelle. En ajoutant des protéines (Mousavi et al. 2019; Wen, Mithieux, et Weiss 2020), des peptides (Hosoyama et al. 2019) et des facteurs de croissance aux supports, on augmente la biocompatibilité. La MEC est un soutien physique pour la croissance et la prolifération des cellules mais également le lieu de régulation de la survie, la migration et la différenciation cellulaire (Bason, Gallorini, et Berardi 2018).

i. Protéines fibreuses

→ **Collagène** : c'est la protéine majoritaire de la MEC, 30 types différents sont caractérisés. Au sein de la MEC on retrouve les fibres de types I, II, III, V et XI qui sont résistantes à la traction. Les fibres permettent de réguler l'adhésion, la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les fibres de collagène sont :

Type I : synthétisés et sécrétés par les cellules des tissus conjonctifs comme les fibroblastes pour la peau et les tendons, et les ostéoblastes pour l'os.

Type II : retrouvées dans le tissu cartilagineux grâce aux chondrocytes.

Type III : composants des vaisseaux sanguins

Type V

Type XI

On isole le collagène de la peau, des tendons des bovins et des rats, des poissons et algues mais aussi de la vessie de porc. Ce collagène à usage médical est bien toléré et dégradé rapidement par l'organisme, mais à de mauvaises caractéristiques mécaniques. On privilégie le collagène de type I pour les supports, mais les procédés de purification sont coûteux. On utilise le collagène pour modifier les supports, mécaniquement stables, de polymères synthétiques et naturels. On peut donner l'exemple de Maci, dont les chondrocytes sont dans une membrane de collagène d'origine porcine.

→ **Gélatine** : c'est un mélange de polypeptides. On l'extrait par traitement thermique ou hydrolyse partielle du collagène de type I. Deux types de gélatine existent : A et B et diffèrent par leur composition en acides aminés, leur charge et leur point isoélectrique. Elles ont un faible coût, et présentent des similarités avec le collagène : biocompatibilité, biodégradabilité et richesse en séquence (Arg-Gly-Asp) qui favorise l'adhésion cellulaire. La gélatine ne présente pas de caractéristique antigénique, en raison de l'absence d'acides aminés aromatiques qui empêchent la formation de radicaux aromatiques immunogènes.

Même si la gélatine est utilisée, sa faible résistance à la traction, sa viscosité élevée, sa solubilité réduite et sa dégradation enzymatique rapide l'empêchent d'être le seul composant d'un support.

→ **Élastine** : protéine fibreuse de la MEC composée de tropoélastine uniquement. Elle est responsable de l'élasticité (Grâce à la séquence d'acides aminés : Val-Pro-Gly) et de la résilience des tissus conjonctifs et vasculaires (peau, poumon, cœur, vessie). L'élastine favorise l'adhésion et la croissance cellulaire (grâce à ses séquences Arg-Gly-Asp). C'est une protéine structurelle clef mais elle n'est pas aussi utilisée sous forme naturelle, en raison des risques de contamination par des virus et des prions durant le processus difficile de purification.

Pour parer à cela, des élastines ont été synthétisées : tropoélastine synthétique, α -élastine, les polypeptides de type élastine et les recombinamères de type élastine. Ces protéines de synthèses permettent d'offrir une alternative à l'élastine en conservant des propriétés similaires de biocompatibilité, biodégradabilité et hydro solubilité.

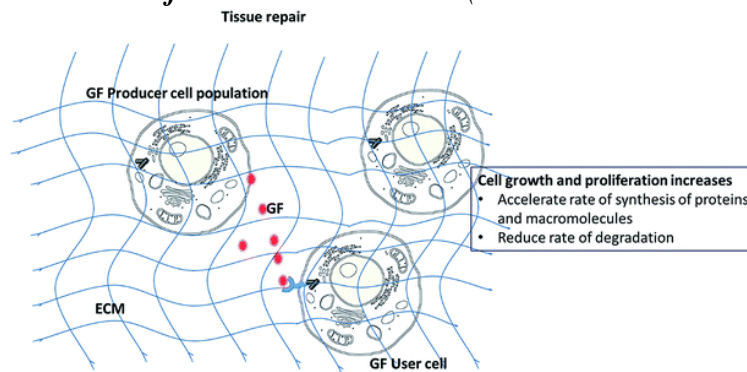
ii. **Glycoprotéines adhésives** : ce sont des molécules clefs pour le soutien, la migration et l'adhésion cellulaire.

→ **Fibronectine** : c'est la seconde protéine la plus représentée dans la MEC, on la retrouve dans le plasma. Elle permet d'améliorer l'adhésion (se lie à aux intégrines $\alpha 5 \beta 1$, protéoglycane et facteurs de croissance), la migration, la prolifération et l'autorenouveau des cellules. Elle influence la morphologie cellulaire et la cicatrisation des lésions.

→ **Laminine** : c'est une glycoprotéine permettant l'adhésion entre les différents tissus (fixation à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$). C'est le composé déterminant de la structure de la membrane. La laminine joue un rôle crucial dans la migration cellulaire, l'adhésion, la différenciation, la cicatrisation des plaies et l'organogenèse. On l'utilise pour augmenter la biocompatibilité des biomatériaux.

iii. **Facteurs de croissance** : ce sont des signaux impliqués dans le processus de réparation, régénération cellulaire et la régulation immunitaire. Ils sont séquestrés par la MEC pour la présentation de récepteurs de surface cellulaire. Ils agissent par des mécanismes autocrines, paracrines et endocrines. En combinant les facteurs de croissance aux biomatériaux, on allonge leur durée de vie courte et on empêche leurs inactivations par des enzymes dans les conditions physiologiques.

Figure 26 Mécanismes d'action des facteurs de croissance (Goonoo et Bhaw-Luximon 2019)



→ **BMP : Protéines morphogénétiques osseuses** : c'est un facteur de croissance se transformant sous forme de glycoprotéines régulatrices. La BMP permet la croissance des CSM et leur différenciation en chondrocytes, ostéoblastes et odontoblastes. Leur potentiel ostéogénique permet de combler les défauts osseux. Pour le traitement de la fusion vertébrale et des fractures tibiales, on utilise la BMP-2 humaine recombinante associée à une éponge de collagène (INFUSE Bone Graft) (Kuroda et al. 2019).

→ **FGF-2 : Facteur de croissance homéostatique des fibroblastes** : améliore la survie, la migration, la mitogenèse, la différenciation, l'activité métabolique de différentes cellules, l'adipogenèse, l'angiogenèse, la cicatrisation et la réparation tissulaire (De Witte et al. 2018; Zarei et Soleimaninejad 2018). La sécrétion est assurée par les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes et les mastocytes (Zarei et Soleimaninejad 2018). Au Japon, le bFGF recombinant humain est utilisé cliniquement pour les ulcères cutanés chroniques depuis 2001. Cependant, les FGF libres se dégradent facilement *in vivo*, entraînant une perte d'activité et de fonctions biologiques. Les FGF ont été encapsulés/incorporés dans des supports et ont été utilisés pour régénérer les tissus endommagés, notamment la peau, les vaisseaux sanguins, les muscles, les tissus adipeux, les tendons/ligaments, le cartilage, les os, les dents et les nerfs (Cai et al. 2005).

→ **VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire**

Le VEGF stimule l'angiogenèse et influence également la fermeture des plaies et la réparation de l'épiderme, la formation du tissu de granulation et la qualité de la réparation. Les fibroblastes, les mastocytes, les kératinocytes et les macrophages activés expriment le VEGF pendant la blessure. Cela déclenche de multiples voies de signalisation qui affectent la prolifération, la survie, la migration et la perméabilité des tissus des cellules. Les niveaux de protéine VEGF active ont tendance à être anormalement bas chez les personnes souffrant de blessures chroniques qui ne guérissent pas, comme celles que l'on observe couramment chez les patients diabétiques.

Le maintien d'une concentration locale de VEGF est crucial pour l'efficacité angiogénique. Il a été rapporté que des modèles de souris *in vitro* et *in vivo* ont montré une régression séquentielle des vaisseaux dans les deux semaines suivant la délivrance du VEGF. Ainsi, la MEC et le recrutement de cellules murales sont importants pour stabiliser les tubes endothéliaux naissants et obtenir ensuite une stabilité capillaire et une artériogenèse durable (Y.-D. Lin et al. 2012).

iv. Matrice extracellulaire décellularisée

La dMEC conserve la même composition, architecture, intégrité et activités biologiques et biochimiques que les tissus natifs (Xing et al. 2020). Elle contient donc un mélange de collagène, laminines, fibronectine, facteurs de croissance, protéoglycanes, et glycosaminoglycanes mais pas de cellules qui ont été éliminées par lyse chimique et enzymatique puis vascularisation pour éliminer les débris cellulaires (Bejleri et Davis 2019; Y. S. Kim et al. 2019). L'absence de cellule permet de diminuer les réactions inflammatoires suite à l'implantation de la dMEC. On a obtenu les dMEC à partir des tissus cardiaques, pulmonaires, trachéaux, cartilagineux et vésicaux. Il y a un risque inflammatoire et infectieux dans l'implantation allogénique.

Il est donc nécessaire d'utiliser des tissus allogéniques histocompatibles. Avec cette méthode on peut ainsi préparer des dMEC sans agent pathogène et d'origine autologue. Cette technique bien que présentant de grands avantages est très coûteuse et longue (Nikolova et Chavali 2019; Weixiang Zhang et al. 2016).

v. Peptides

Les biomatériaux modifiés par les peptides imitent mieux les caractéristiques biologiques et physiques de la MEC, que ceux modifiés par les protéines. La production de peptides est plus facile et moins chère que pour les grosses molécules avec un poids moléculaire important. Ils sont plus résistants aux variations de pH, de température et sont moins immunogènes. Combiner peptides et polymères permet d'enrichir les biomatériaux avec des séquences caractéristiques qui favorisent l'adhésion cellulaire ou induisent des voies de signalisation cellulaire (Krishna et Kiick 2010).

→ Peptides dérivés du collagène, de la fibronectine et des laminines

On utilise les motifs d'intérêt d'acides aminés pour optimiser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules. Plusieurs séquences pro-adhésives existent (Klimek et Ginalska 2020):

-Séquences similaires au collagène, point d'ancrage pour les récepteurs d'intégrines $\alpha 2\beta 1$

- *Arg-Gly-Asp* ou RGD
- *Asp-Gly-Glu-Ala* ou DGEA
- *Gly-Phe-HPro-Gly-Glu-Arg* ou GFOGER
- *Gly-Phe-Pro-Gly-Glu-Arg* ou GFPGER
- *Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg-Gly-Val* ou GTPGPQGIAGQRGVV ou PepGen P-15 (P-15): même séquence que celle utilisé dans le cadre de la liaison cellulaire du collagène de type I. P-15 stimule l'adhésion, la prolifération et l'expression génique de facteurs de transcription (Hennessy et al. 2009).

-Séquences dérivées de la fibronectine qui se lient aux récepteurs des intégrines des fibroblastes, CSM et cellules endothéliales

- *Pro-His-Ser-Arg-Asn* ou PHSRN
- *Arg-Glu-Asp-Val* ou REDV
- *Leu-Asp-Val* ou LDV

-Séquences dérivées des laminines pro-adhésives

- *Ile-Lys-Val-Ala-Val* ou IKVAV
- *Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg* ou YIGSR

-Séquences dérivées des laminines pro-angiogéniques :C16 ou KAFDITYVRLKF ou *Lys-Ala-Phe-Asp-Ile-Thr-Tyr-Val-Arg-Leu-Lys-Phe*

→ Peptides dérivés de la BMP

- PGB : rôle majeur dans l'ostéogénèse

- P17 et P24 sont dérivés de de la BMP-2. Tous deux stimulent l'expression de gènes ostéogéniques et accélèrent la formation d'os nouveaux *in vivo* (Z.-Y. Lin et al. 2010; X. Zhang et al. 2016)

- BFP-1 dérivé de la BMP-7, a un potentiel ostéogénique plus élevé que le BMP-7 (H. K. Kim et al. 2012)

→ Peptides dérivés de VEGF :

-QK : est un peptide pro-angiogéniques qui imite l'activité de VEGF et se fixe sur les VEGFR des cellules endothéliales. Il permet de stimuler la migration, la viabilité et la mitogenèse *in vitro*.

Un inconvénient des hydrogels constitués de domaines protéiques auto-interagissant, est leurs propriétés mécaniques faibles à modérées. Cependant, ces interactions peuvent être renforcées par l'introduction de liaisons covalentes dans le réseau (par exemple, des liaisons disulfures entre la cystéine dans les chaînes de

protéines). Cela améliorera non seulement les propriétés mécaniques de l'hydrogel, mais aussi sa stabilité (Shen et al. 2006).

vi. Groupements fonctionnels

En réalisant une **adjonction de composés organiques** (aldéhydes, méthyl, alcool, amine), les chercheurs ont agi sur la mouillabilité des surfaces, la capacité d'absorption des protéines qui sont des facteurs d'influences biologiques. Des études ont été menées pour comprendre l'impact des groupes sur les caractéristiques et les activités biologiques des polymères (M. H. Lee et al. 2005; Keselowsky, Collard, et García 2003; 2005):

Tableau XII Impact des groupements fonctionnels

Composés organiques	Angle de contact	Absorption de fibronectine	Adhésion pré ostéoblastes de souris MC3T3-E1	Impact sur la différenciation des pré ostéoblastes
Méthyl-CH ₃ Neutre & hydrophobes	107°	+++	∅	+
Amino-NH ₂ Positif & hydrophile	43°	++++	+++	++++
Aldéhyde-COOH Négatifs & hydrophiles	28°	++	+++	+
Alcool-OH Neutres & hydrophiles	25°	+	++++	++++

En vert : ce sont les composés qui favorisent l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules Grâce à leurs charges et leur hydrophilie.

En modifiant les supports avec des protéines et des peptides, on ajoute des groupements fonctionnels. Ainsi en incluant du collagène, de l'élastine à du poly-ε-caprolactone on augmente le nombre de groupe amino au sein de la matrice et ainsi la mouillabilité de surface (Aguirre-Chagala et al. 2017).

Le point commun de toutes les études est l'augmentation de la biocompatibilité des biomatériaux avec l'adjonction de protéines, peptides et composés organiques mais la variabilité des résultats ne permet pas d'établir des principes universels.

e. Biomatériaux intelligents

Ces biomatériaux veulent imiter au maximum la MEC, ils sont conçus pour moduler leurs propriétés physiques, chimiques et mécaniques en réponse à des changements de stimuli externes ou d'environnement physiologique local :

-matériaux **sensibles aux stimuli externes**

→ pH : ce sont des polyélectrolytes contenant un groupe acide ou basique et qui libèrent ou captent un proton en fonction de la variation de pH. Grâce à cette technique, You et son équipe ont pu améliorer l'angiogenèse et le remodelage des tissus (Mastrullo et al. 2020). Grâce à DMAEMA-HEMA qui peut se gonfler ou se contracter en fonction du pH et ainsi moduler l'infiltration cellulaire et l'oxygénation du support.

→ Température : les hydrogels thermo réactifs soutiennent l'expansion et la différenciation des cellules (Chatterjee, Hui, et Kan 2018).

→ Champs magnétiques : une matrice d'alginate, imprégnée de particules magnétiques et contenant des cellules endothéliales aortiques, a pu se réorganiser en structure vasculaire suite à une stimulation magnétique et cela sans facteurs de croissance (Sensenig et al. 2012).

→ Stress : modulation de l'engagement des cellules souches (Tsou et al. 2016)

→ Son

- Lumière
- Potentiel d'oxydo-réduction

-matériaux **bioréactifs** : ils sont sensibles aux enzymes pour la régénération des cellules nerveuses (Chandrawati 2016) ou encore le glucose pour la réparation de cellules adipeuses

-**polymères à mémoire de forme** (Bencherif et al. 2012): sont soit des hydrogels auto-réparateurs soit des hydrogels d'amincissement par cisaillement. Ils ont une faible viscosité en raison de l'amincissement par cisaillement au moment de l'injection puis ils s'auto réticulent une fois la cible atteinte (M. Liu et al. 2017).

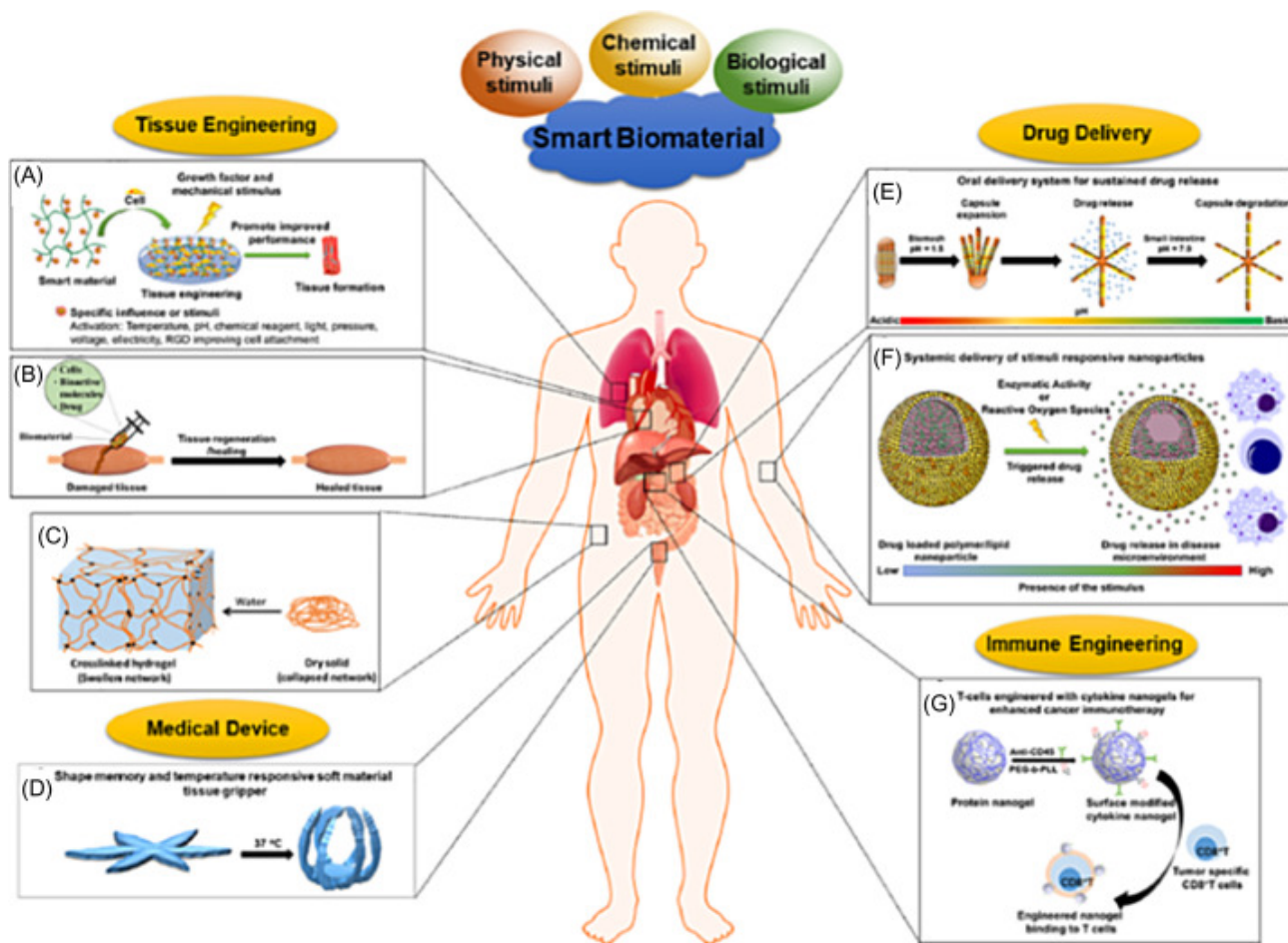
-**hydrogels à double réseau ou à réseau interpénétrant** : pour les hydrogels thermo réactifs, un changement température entraîne la réticulation réversible soit par auto-assemblage ou par enchevêtrement des chaînes de polymères induits (Parhi 2017).

-**matériaux auto-assemblés** tels que les hydrogels peptidiques

-matériaux **photodégradables** avec contrôle spatiotemporel de la dégradation du matériau

Figure 27 Biomatériaux intelligents et leurs applications médicales

- *Matériau sensible aux stimuli qui peut favoriser la différenciation des cellules et la croissance des tissus*
- *Biomatériau injectable chargé de cellules, de médicaments ou de molécules bioactives peut être délivré de manière moins invasive et peut favoriser la cicatrisation des tissus au niveau du site cible*
- *Polymère gonflant peut être délivré sous forme de petits supports mais peut se dilater in vivo pour obtenir une structure 3D du défaut cible après exposition à l'eau*
- *Un matériau souple à mémoire de forme et sensible à la température peut être utilisé comme adhésif tissulaire*
- *Un système d'administration en forme d'étoile pour la libération prolongée de médicaments dans le tractus gastro-intestinal*
- *Un système d'administration de médicaments à base de nanoparticules sensibles aux stimuli pour une application systémique*
- *Des matériaux pour une immunothérapie anticancéreuse améliorée utilisant l'administration ciblée de cellules T chimériques réceptrices d'antigènes. 3D, tridimensionnel.*



f. Propriétés physico-chimiques & biologiques modulables

En modifiant les polymères, cela a un impact sur les caractéristiques physico-chimiques, mécaniques et de dégradabilité des biomatériaux. Ces changements influencent l'activité biologique et biochimique des supports.

Dans la mesure où les cellules interagissent constamment avec leurs environnements, elles sont sensibles aux **propriétés physico-chimiques** (cristallinité, morphologie, rigidité et conformité des matériaux) et **mécaniques** (Rizwan et al. 2019).

→ **Cristallinité** : l'état cristallin se caractérise par un alignement répétitif et périodique des atomes. Le degré de cristallinité d'un polymère dépend du taux de refroidissement lors de la solidification. Afin de maximiser l'organisation des chaînes de polymères il faut rester un maximum de temps à la température de fusion. Plus la structure du polymère est simple, plus le degré de cristallinité sera élevé.

La cristallinité impacte les propriétés mécaniques : plus le substrat est cristallin

- Plus résistant à la pénétration de l'eau et des solvants, à la chaleur, à la fatigue
- Plus solide

Mais aussi les propriétés physico-chimiques (énergie libre, états chimiques, polarité, rugosité, et mouillabilité) qui influencent les réponses cellulaires et la biodégradabilité.

→ **Morphologie** : affecte sa capacité à absorber les protéines et altérer leurs conformations donc agit sur l'adhésion des cellules.

→ **Rigidité et conformité** : mesurée par le module d'élasticité, elle est importante pour les cellules dépendantes de l'ancrage. La rigidité est un paramètre agissant comme un signal physique pour la différenciation des cellules souches, en plus de leurs rôles dans l'adhésion, la propagation, la migration et la prolifération des cellules. Un support plus rigide optimise les activités cellulaires. L'inclusion de peptides fait diminuer la rigidité du polymère (Nguyen, Bashur, et Kishore 2016). Elle module les voies de signalisation intracellulaire et l'expression des gènes nécessaires aux déplacements cellulaires. Les cellules

peuvent se déplacer plus rapidement dans un substrat compliant, mais se répandent moins. L'adhérence des cellules augmente avec la rigidité du substrat.

→ **Mouillabilité de la surface** : permet la régulation du comportement du biomatériau au contact des fluides : la surface du support peut être hydrophile ou hydrophobe (Grundke et al. 2015). Les cellules natives interagissent avec la couche de protéines ou de peptides adsorbées par le support et non pas avec la surface des biomatériaux.

Protéine hydrophile à diminution de l'angle à augmente mouillabilité de la surface à surface hydrophile à meilleure biocompatibilité, adhésion, prolifération et différenciation des cellules

En ajoutant les peptides P15 et OPG à une base de poly(lactic-co-glycolic acid), on augmente la mouillabilité ainsi la surface devient plus hydrophile ce qui stimule la mitogenèse, l'adhésion et la différenciation ostéogéniques (Z. Wang et al. 2016). L'avantage des surfaces hydrophiles est qu'elles maintiennent dans la bonne conformation les peptides, et leur permet de remplir avec plus d'efficacité leur fonction pro-adhésive.

Les surfaces hydrophobes ont pourtant une meilleure absorption des protéines hydrophiles sauf dans le cas de la fibronectine, la laminine et la vitronectine qui ont des plus fortes affinités pour les surfaces hydrophiles.

→ **Charge de surface** : elle module l'absorption des protéines et leur déploiement à la surface du support.

Les **caractéristiques biologiques** ont un impact tout aussi important sur les réponses cellulaires. On peut moduler les paramètres biologiques en utilisant des ligands d'adhésion (protéines, peptides), les enzymes et facteurs de croissance. On peut également s'intéresser à la **topographie** embryologique qui peut modifier les cellules, leurs interactions et leurs réponses (Zagris 2001).

→ Immunocompatibilité des biomatériaux : la réponse immunitaire de l'hôte peut être contrôlée directement grâce à des matériaux conçus spécifiquement dans cet objectif. Le peptide RGD au sein des biomatériaux exerce des effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires innées et adaptatives tout en ayant un effet inhibiteur sur la phagocytose et la chimiotaxie des neutrophiles. Les hydrogels synthétiques MEC mimétiques contenant la séquence RGD provoquent une augmentation de l'adhésion cellulaire sur les supports polymères et ont également un effet anti-inflammatoire sur les macrophages (Kao et Lee 2001).

→ Motilité cellulaire : afin de démarrer une migration cellulaire, les liaisons entre les cellules et la MEC existantes doivent être cassées et de nouvelles au site de fixation doivent être créées. La motilité est dépendante des ligands, et devient maximale lors de l'utilisation de ligand de densité intermédiaire (Rizwan et al. 2019). En effet, les faibles densités ne génèrent pas la traction nécessaire au mouvement, et la forte densité entraîne une forte adhésivité. Le gradient de ligand permet de guider les cellules qui ont tendance à migrer vers les milieux plus concentrés. Grâce aux nouvelles nanotechnologies, on peut concevoir des surfaces avec une composition précise et contrôlée de ligands (Rodin et al. 2010).

→ Mitogenèse et différenciation : la fonction cellulaire est modulable également en agissant sur les interactions cellules/MEC/protéines et la tension intracellulaire. La différenciation des cellules souches dépend du type de ligand, de la densité et de l'agencement au sein du substrat (D. Mooney et al. 1992).

- La fibronectine est l'élément essentiel d'influence de la prolifération et de l'autorenouveau (Hunt, Singh, et Schwarzbauer 2012).
- La laminine semble favoriser l'attachement, la prolifération et la pluripotence des CSE et iPS (Domogatskaya et al. 2008).
- La vitronectine maintient la pluripotence des iPS *via* les intégrines $\alpha 5 \beta 5$ (Rodin et al. 2010).

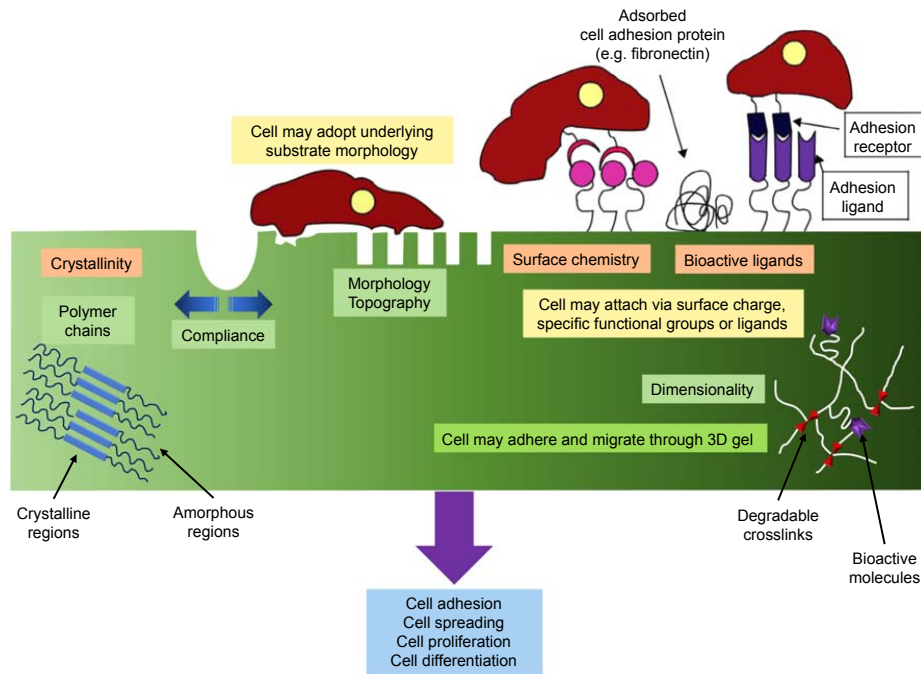
→ La **dégradabilité** est un paramètre aussi important que la biocompatibilité. La dégradation se fait par ruptures hydrolytiques ou enzymatiques des liaisons et dépend de plusieurs critères :

- structure chimique
- poids moléculaire
- stabilité des liaisons hydrolytiques

-hydrophilie/hydrophobie : dégradation plus facile des matériaux hydrophiles
 -toxicité des sous-produits de dégradation

Les protéines sont dégradées rapidement de façon non toxique alors que les polymères lors de leurs dégradations lentes peuvent entraîner l'inflammation ainsi que la mort cellulaire et tissulaire. On peut jouer sur le temps de dégradation et la toxicité des sous-produits en associant les protéines et peptides avec les polymères (Prado-Prone et al. 2020).

Figure 28 Illustration les différentes propriétés d'un substrat qui influencent le comportement cellulaire (Rizwan et al. 2019)



4. Technologie d'imagerie

Pour recréer des tissus et des organes toujours plus complexes et comprendre leurs fonctionnements, on a besoin de données numériques qui permettent d'élaborer des stratégies de conception (Chandra, Soker, et Atala 2020). On obtient les données nécessaires grâce aux :

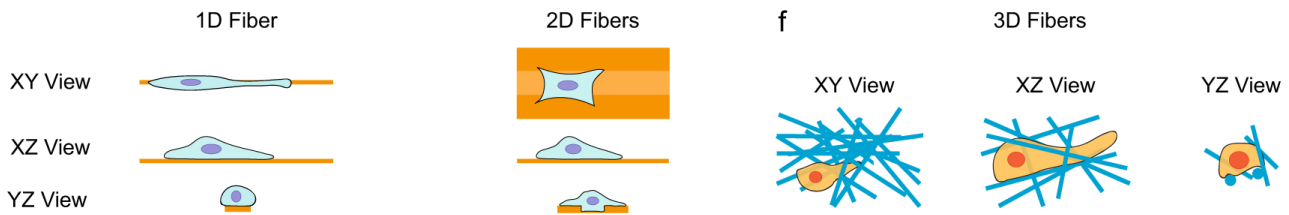
- imagerie par résonance magnétique (IRM)
- nano tomographie à contraste amélioré
- analyses histologiques
- images de tomographie médicale assistée par ordinateur qui permettent l'élaboration de modèles de conception assistés par ordinateur en 3D pour la bio fabrication.
- technologies CLARITY (Chung et al. 2013): un tissu transparent et poreux semblable à des hydrogels qui maintient les structures originales intactes. La composition et la structure moléculaire sont visualisées jusqu'à 70nm.

Ces informations peuvent être utilisées pour concevoir des structures multiphasiques qui présentent une hétérogénéité structurelle, biochimique et organisationnelle *in vivo*.

5. Techniques d'ingénierie tissulaire

La bio fabrication combine les principes de l'ingénierie, de la science des matériaux et de la biologie. C'est une formidable boîte à outils qui promet d'accélérer les résultats de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. On fabrique des supports pour étudier la topographie à l'échelle nanoscopique, il est nécessaire d'être à une telle échelle dans la mesure ou les matériaux utilisés le sont. Pour se rapprocher au maximum du vivant, on essaie de travailler avec des modèles en trois dimensions. Dans la figure suivante, on se rend compte de la perte d'information entre les modèles.

Figure 29 Différences de données en fonction du nombre de dimension



a. Effets et modulations de la topographie des tissus

La compréhension des phénomènes de développement des tissus et de leur imitation est complexe car ils existent de nombreux facteurs influençant. Dans leur environnement naturel, les cellules sont entourées de cellules, d'une MEC et de divers composants. Ainsi pour espérer comprendre et recréer ce microenvironnement, on doit mettre en place un certain nombre de techniques de fabrication et de maturation. L'objectif de l'ingénierie tissulaire est de se rapprocher au maximum du modèle *in vivo* :

- en reproduisant des champs électriques et les trois dimensions de l'organisme
- en utilisant des biomatériaux dont la composition se rapproche et réagit de la même de façon que les composés de l'organisme.

En modélant une matrice artificielle, on impacte la communication, les forces intracellulaires, l'adhésion entre les cellules et la matrice. Ce changement de forme induit une modification de comportement cellulaire : mitogenèse, croissance, l'agrégation, expression génique, différenciation et mort cellulaire. Le substrat utilisé influe sur les propriétés du support donc sur les caractéristiques morphologiques de la cellule qui à son tour va réagir à son environnement. En fonction de l'organe ou du tissu cible on peut jouer sur ces différents paramètres (taille des pores, rugosité, échelle du réseau, production de cytokine). La topographie du support influence directement la réponse cellulaire.

i. Substrat électriquement conducteur :

La signalisation électrique exogène peut moduler les réponses cellulaires et la cicatrisation tissulaire : peau, cœur, tissus vasculaires, poumons et neurones. Des équipes ont pu stimuler la croissance en utilisant des champs électriques (Schmidt et al. 1997). De même des cellules musculaires lisses vasculaires stimulées électriquement ont exprimées davantage de protéines contractiles et ont proliféré plus intensément (Rowlands et Cooper-White 2008). En jouant sur la stimulation électrique et la composition du microenvironnement, on modifie la topographie du support et ainsi moduler la différenciation cellulaire. La bioélectricité est le potentiel électrique générés par ou dans les cellules, tissus et organismes vivants (neurones, cellules contractiles de Purkinje). Afin de se rapprocher au maximum des conditions tissulaires et cellulaires réelles, les chercheurs ont combiné des composants éclectiques (nanofibre d'or et de carbone, nanotubes de carbone) au substrat. Les nanotubes de carbone par exemple peuvent, en étant mélangé à des hydrogels de gélatine, favoriser l'adhésion, la maturation et le couplage électrique (Shin et al. 2013). La conductivité électrique du support est un paramètre important, mais la limite des composants électriques est la biodégradabilité. On peut contourner cette problématique :

- polyaniline : peut être utilisé en tant que copolymères (Guo, Finne-Wistrand, et Albertsson 2011)
- polypyrrole : dégradation en présence d'un copolymère aqueux (Zelikin et al. 2002)

ii. Les nanotubes de carbone, graphène, et oxyde de graphène

Les nanotubes de carbone (NTC) (dont la biocompatibilité est controversée), graphène, et oxyde de graphène présentent des caractéristiques mécaniques, physico-chimiques et structurales qui impactent les fonctions cellulaires :

- les NTC alliés au collagène entraînent une amélioration de l'adhésion des fibroblastes (filopodes entourant les NTC) et de la prolifération (X. Li et al. 2011).

- les NTC à paroi stimulent l'adhérence, la propagation des cellules souches mésenchymateuses (Park et al. 2007).
 - les cellules souches neurales assemblées sur un nanotube de carbone à simple paroi, se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. En configurant une multicouche de NTC, on ouvre des portes à la modélisation d'interfaces neuronales (Jan et Kotov 2007).
 - Les CSM se différencient sur des surfaces graphène et oxyde de graphène (leurs rugosités et leurs teneurs en oxygène augmentent leurs capacités d'absorption des protéines sériques).
- Les NTC doivent être privilégiés car ils ont une meilleure affinité des protéines et potentialisent mieux la propagation cellulaire (Ryoo et al. 2010).

iii. La tridimensionnalité

La culture 2D entraîne une polarisation « anormale » des cellules, elles sont exposées à deux microenvironnements : un supérieur et un inférieur. En trois dimensions, les cellules retrouvent une polarité normale et la surface d'adhésion et de communication est meilleure :

- la concentration en cytokines et enzymes augmente, en raison de la proximité des cellules et de la MEC.
- on obtient des stimulations simultanées de voies de transduction

On contrôle mieux les comportements et fonctions cellulaires. La dimension de la structure affecte (Page, Flood, et Reynaud 2013) :

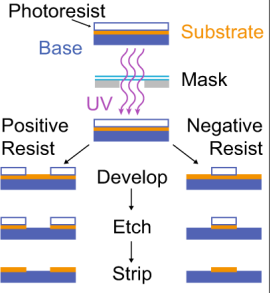
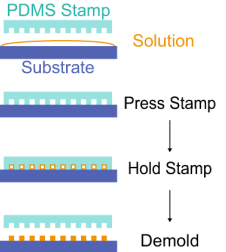
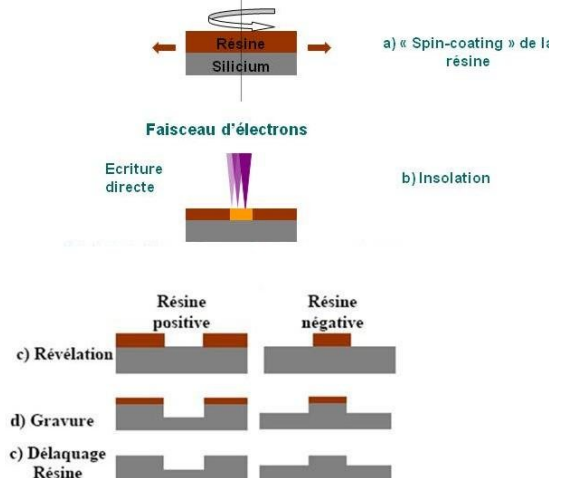
- les réponses cellulaires aux signaux biochimiques et physiques
- la réciprocité dynamique entre la MEC et les cellules

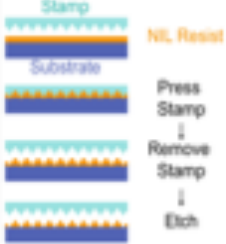
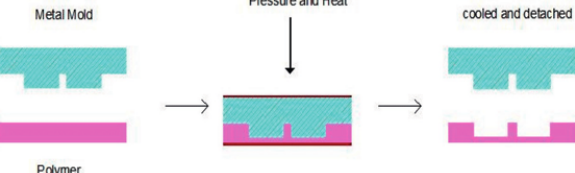
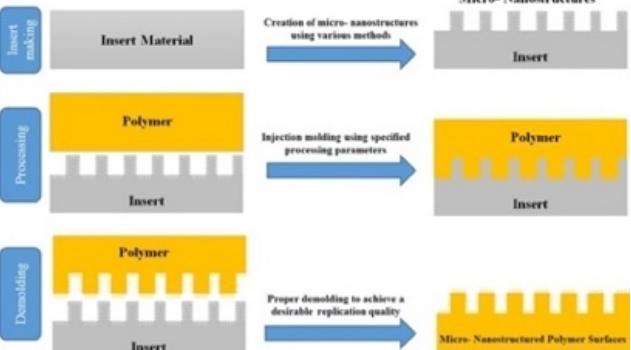
Afin d'obtenir le modèle le plus biomimétique possible, on utilise des substrats particuliers :

- Supports polymères 3D
- Hydrogels
- Perles poreuses de cellulose
- Supports électrofilées
- Supports imprimés 3D
- Tissus décellularisée

b. Cultures cellulaires en 2 dimensions

Tableau XIII Techniques de fabrication des cultures cellulaires à 2 dimensions (Maghsoudi et al. 2017; Jenkins et Little 2019; Pasirayi et al. 2011)
 Avant d'avoir accès aux modèles en trois dimensions, les cultures cellulaires se faisaient uniquement sur deux dimensions. Dans ce tableau, on retrouve l'ensemble des techniques de création de support.


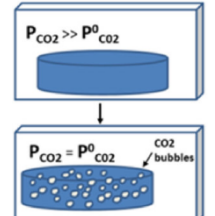
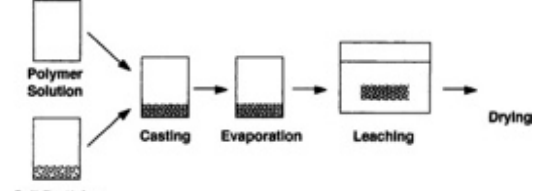
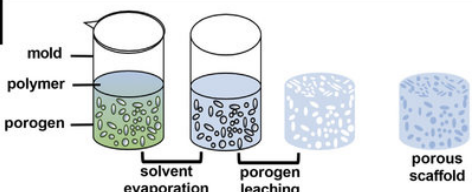
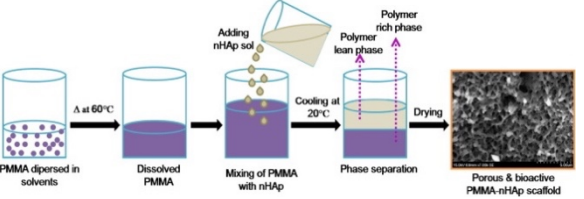
Techniques de fabrication	Méthodes	Avantages	Inconvénients
Photolithographie	 <p>1) Substrat est recouvert d'un matériau organique photosensible positif ou négatif 2) Exposition de la résine photosensible à un motif spécifique de rayonnement UV intense : - si photoréserve positive : surface exposée soluble à retirer avec le révélateur - si photoréserve négative : régions exposées insolubles à révélateur mais on garde le substrat 3) On retire le photoresit</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Utilisation de polymères sensibles aux UV -Topographies de taille submicronique -Précise -Reproductible sur de grande surface -Pas de moule 	<ul style="list-style-type: none"> - Convient aux polymères de faible résolution (taille micron) -Limitée à la formation de motifs sur hydrogel, sauf si combinée avec une étape de gravure
Lithographie douce	 <p>Un gabarit et un tampon pour modeler le substrat : 1) Moules pour former les tampons, en utilisant un polymère élastomère 2) Le tampon est ensuite pressé dans une solution pour créer le motif souhaité sur le substrat.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Protocole simple -Peu coûteuse -Applicable à beaucoup de matériaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un moule (pour modeler le tampon) -Difficile d'obtenir une résolution à l'échelle nanométrique
Lithographie par faisceau d'électrons	 <p>a) « Spin-coating » de la résine b) Insolation c) Révélation d) Gravure e) Délaquage Résine</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Excellente résolution <10 nm -Très bonne reproductibilité -Nécessite un moule 	<ul style="list-style-type: none"> -Très cher -Structuration lente -Nécessite une étape de gravure et de gaufrage pour transférer les motifs sur le substrat de culture cellulaire

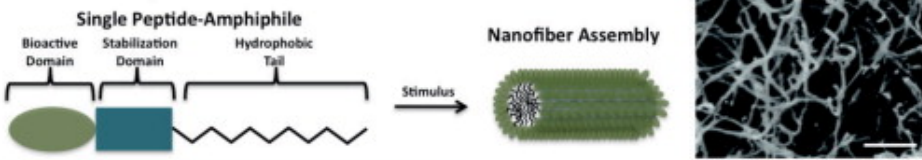
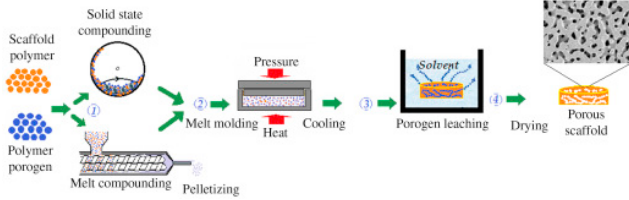
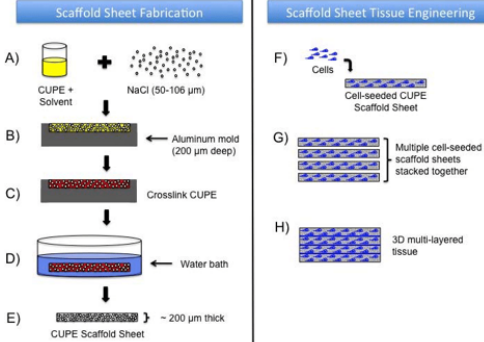
<p>Nano impression</p>	 <p>1) Un tampon de silicone (du motif inverse) est utilisé pour imprimer un motif dans le substrat souhaité à une température et une pression spécifique. 2) Le moule est ensuite retiré, laissant le système de fibres du modèle sur le substrat désiré</p>	<p>-Modélisation en une étape des thermoplastiques -Très haute résolution (<50 nm) -Haut débit -Rentable</p>	<p>-Nécessite une étape de gravure</p>
<p>Impression à chaud</p>		<p>-Une seule étape pour configurer les thermoplastiques -Rentabilité</p>	
<p>Moulage par injection</p>		<p>-Fonctionnement rapide et peu coûteux -Débit élevé</p>	<p>-Un coût du matériel plus élevé -Résolution limitée au micron Nécessite une matrice maîtresse électro formée</p>

c. Techniques de fabrication des supports en 3 dimensions

La fabrication des supports nécessite des outils de haute précision pour allouer les cellules et les biomatériaux de manière précise afin de générer une construction 3D entièrement fonctionnelle. Les technologies de fabrication additive (AM), également connues sous le nom de fabrication de formes libres solides, de prototypage rapide et d'impression 3D, utilisent un processus hautement automatisé qui construit un objet en 3D par le dépôt successif de couches d'un matériau sous contrôle informatique et sont particulièrement avantageuses pour la fabrication de modèles 3D multifonctionnels hautement contrôlés. Cela permet une précision géométrique élevée et rapide avec une productivité accrue et un équipement contrôlé par ordinateur rentable.

Tableau XIV Techniques de fabrication des supports

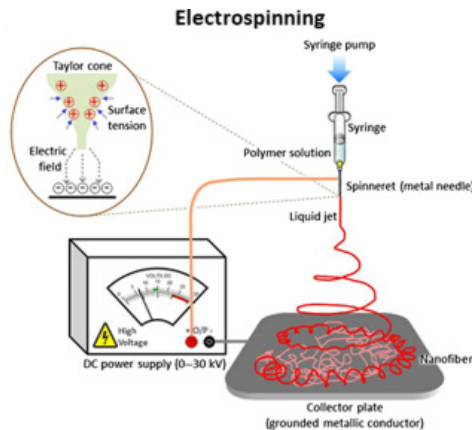
Techniques de fabrication	Méthodes	Avantages	Inconvénients
<p>Lyophilisation Supports poreux en 3D (Mandal et Kundu 2008)</p>	 <p>Le polymère ou l'hydrogel réticulé est congelé entre -20 °C et -80 °C. Des cristaux de glaces se forment, puis on réalise consécutivement un séchage dans un lyophilisateur. Les cristaux sont ainsi éliminés par sublimation. (Turnbull et al. 2018)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Modulation de la taille des pores en fonction du temps et de la température de congélation et du pH de 20 à 300 μm -Pas de température élevée -Pas d'étape de lixiviation séparée 	<ul style="list-style-type: none"> -Énergivore -Taille des pores irrégulières -Solidification contrôlée dans une seule direction a été utilisée pour créer une structure homogène de pores en 3D
<p>Mousse de gaz Supports 3D très poreux (Ikada 2006)</p>	 <p>On sature le polymère hautement poreux au CO2 à haute pression. Le CO2 dissous devient instable à cette pression et se sépare du polymère. Afin de minimiser l'énergie libre les molécules de CO2 regroupées, on obtient ainsi une nucléation des pores. On obtient une augmentation du volume du polymère et la diminution de sa densité.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Pas l'utilisation de solvants organiques -Pas températures élevées. -Contrôle de la porosité -Contrôle de la taille des pores 	<ul style="list-style-type: none"> -Propriétés mécaniques limitées -Mauvaise connectivité des pores
<p>Lixiviation des particules par coulées solvant (P. X. Ma et Langer 1999)</p>	 <p>C'est une méthode basée sur la dispersion du porogènes (sucre, sel, cire) qui détermine la taille et la géométrie des pores. (Abbasi et al. 2020) (Mano et al. 2007)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Contrôle de la porosité -Contrôle de la taille des pores -Contrôle de cristallinité 	<ul style="list-style-type: none"> -Propriétés mécanique limitées -Solvant et porogènes résiduels
<p>Lixiviation des porogènes Supports 3D très poreux (jusqu'à 93% de pores)</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Simple, polyvalent -Contrôle de la porosité -Contrôle de la taille des pores -Contrôle de la géométrie des pores 	<ul style="list-style-type: none"> Interconnectivité des pores peu précis -Ne convient pas pour les membranes minces
<p>Séparation des phases Supports 3D nanofibreux (Smith, Beck, et Ma 2007)</p>	 <ol style="list-style-type: none"> 1) Changement de température pour séparer la solution du polymère en deux phases : 1 pauvre en polymère et 1 concentrée en polymère 2) Dissolution de polymère dans du phénol 3) Dispersion de la molécule biologiquement active dans la solution 4) Baisse de la température, on sépare et trempe la phase liquide-liquide pour former un solide à deux phases 5) Élimination du solvant par extraction, évaporation et sublimation. Afin de créer des nanofibres, il faut la température et le solvant adéquats pour la séparation de phases. (G et al. 2017) 	<p>Peu se combiner avec d'autres techniques de fabrication :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Avec la lixiviation des particules : contrôle de la morphologie des pores -Avec prototypage rapide : pour support nanofibreux 	<ul style="list-style-type: none"> Difficile de contrôler la morphologie finale du support

<p>Auto-assemblage Supports 3D nanofibreux (S. Zhang 2003)</p>	<p>Self-Assembly</p>  <p>(W. Chen et al. 2019)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Contrôle de la porosité -Contrôle de la taille des pores -Contrôle du diamètre des fibres (beaucoup fines que celle produites par l'électrofilage) 	<ul style="list-style-type: none"> -Matériel cher -Paramètres de conception difficile
<p>Prototypage rapide Supports 3D fibreux (Woodfield et al. 2009)</p>	<p>Contrôlée par ordinateur, elle est extrêmement précise. Elle permet de de produire rapidement des objets en 3D en utilisant la méthode de fabrication par couches (Loh et Choong 2013):</p> <ul style="list-style-type: none"> (A) Impression 3D (B) Stéréolithographie (C) Frittage laser sélectif (D) Modélisation par dépôt fondu 	<ul style="list-style-type: none"> -Excellent contrôle de la matrice : porosité, taille des pores, géométrie, propriétés mécaniques, effets biologiques et dégradabilité. -Hautement reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> -Type de polymères limités -Faible résolution obtenue à cause du matériel
<p>Moulage par fusion (R. C. Thomson et al. 1995)</p>	 <ol style="list-style-type: none"> 1) Remplissage d'un moule en téflon avec de la poudre de PLGA et des microsphères de gélatine d'un diamètre spécifique 2) Chauffage du moule au-dessus de la température de transition vitreuse du PLGA tout en appliquant une pression au mélange 3) Cette action provoque la fixation des particules de PLGA entre elles 4) On retire le moule 5) Les microsphères de gélatine sont dissoutes en plongeant le mélange dans l'eau 6) Supports sont ensuite séchés (Allaf 2018) 	<ul style="list-style-type: none"> -Contrôle indépendant de la porosité et de la taille des pores -L'échange de nutriments/déchets de pore en pore 	<ul style="list-style-type: none"> -Température élevée requise pour les polymères non amorphes
<p>Laminage de la membrane (Maquet et Jerome 1997)</p>	 <p>On utilise une membrane de 500 à 2000 micromètres</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) On coupe la membrane à la forme voulue au laser 2) Membrane est imbibée de solvant 3) Empilage et assemblage 3D (Tran et al. 2010) 	<p>Fournir une matrice 3D</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Manque de force mécanique -Interconnectivité insuffisante
<p>Liaison des fibres Supports 3D fibreux (D. J. Mooney et al. 1996)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Un polymère synthétique est dissous dans du chloroforme 2) Ajout d'une fibre non tissée 3) élimination du solvant par évaporation 4) formation d'un matériau composite, constitué de fibres non liées et incorporées dans une matrice 5) collage des fibres à une température supérieure à la température de fusion du polymère. 6) Dissolution de la matrice du composite par un agent à base de chlorure de méthylène 	<ul style="list-style-type: none"> -Rapport surface/volume élevé -Excellente porosité 	<ul style="list-style-type: none"> -Mauvaises propriétés mécaniques -Applications limitées à certains polymères

Filet de fibres Supports 3D fibreux (G. Chen, Ushida, et Tateishi 2001)	Consiste à tisser ou à entrelacer des fibres individuelles selon un modèle tridimensionnel de taille de pore variable (I. G. Kim et al. 2015).	-Grande surface de fixation des cellules -Diffusion rapide des nutriments -Favorable à la survie et à la croissance des cellules	-Manque de stabilité structurelle
Electrofilage Supports 3D nanofibreux à microfibreux (Liang, Hsiao, et Chu 2007)	La technique d'électrofilage utilise la force électrostatique pour la production de fibres polymères <ol style="list-style-type: none"> 1) Une électrode est placée dans la solution de polymère 2) Une autre électrode est placée dans la solution du collecteur 3) On pompe une solution de polymères ce qui forme une goutte 4) En appliquant une tension électrique, la goutte se charge 5) La force de répulsion électrostatique s'oppose alors à la tension de surface forçant la gouttelette à s'étirer ; à un point critique, un flux de liquide jaillit de la surface 6) Le jet sèche en vol car le solvant s'évapore c'est ce qui produit les fibres 7) On récupère les fibres au nouveau du collecteur 	-Contrôle de morphologie de fibre de 10 nm à 100 µm -Pas besoin de température élevé -Plus de 200 polymères utilisables -Polyvalence -Installation simple -Peu couteuse	Difficulté d'obtention d'une structure 3D avec des tailles de pores appropriées

d. Techniques de bio fabrication pour la médecine régénérative

i. Électrofilage (Chandra, Soker, et Atala 2020):



Comme nous l'avons vu, il permet la fabrication des supports avec une large gamme d'architectures de fibres pour mieux imiter la structure et la fonction des tissus *in vivo* :

- Fibres uniformes
- Fibres avec des propriétés de gradient
- Fibres en noyau-coquille
- Fibres à motifs

Elle est surtout utilisée pour les greffes de peau, les systèmes de vascularisation, et les véhicules de transport de molécules (W. Chen et al. 2019; Soffer et al. 2008).

L'infiltration cellulaire en profondeur est assez faible avec cette méthode, cela est dû au tassement des fibres et des pores de petites tailles et irréguliers.

On peut améliorer ce procédé en modifiant :

- l'installation de filature avec un mandrin rotatif, l'électrofilage à espacement ou l'électrofilage magnétique électrique : on contrôle mieux l'alignement, le mélange, la géométrie, la complexité, et la collecte ciblée des fibres.
- les procédés d'électrofilage permettent de générer des fibres de géométrie et de complexité variées
 - **Électrofilage coaxial** : consiste à disposer deux aiguilles de manière concentrique contenant deux solutions de polymères, on obtient un jet de polymères composés où les polymères du noyau et de l'enveloppe sont séparés. Ce protocole permet de générer des fibres creuses ou non à partir de matériaux difficilement manipulables. On peut utiliser un mélange non miscible de polymères (Loscertales et al. 2004).
 - **Électrofilage en émulsion** : on encapsule des bioréactifs au sein de polymères hydrophobes, on contrôle ainsi la libération et l'intégration du composé bioactif dans les fibres. On peut créer des fibres creuses grâce à ce protocole (Spano et al. 2016). On utilise ce procédé pour administrer des médicaments, enzymes, et facteurs de croissance sans altérer leurs bioactivités et en modulant leurs profils d'absorption et de libération.
 - **Mélange de fibres** : on introduit plusieurs solutions de polymères dans l'aiguille pour permettre un mélange complet des matériaux. Les fibres ont l'avantage d'avoir les propriétés des polymères présents en solutions, on peut créer un gradient de composants au sein du support (Lobo et al. 2018). C'est le procédé qui a le plus grand potentiel de développement.
 - **Électrofilage des bords** : en appliquant un courant électrique de haute tension aux flux de fluides, on génère de multiples jets. Ce procédé augmente la vitesse de production de fibres jusqu'à 40 fois (Thoppey et al. 2010).
 - **Coélectrofilage** : on utilise un polymère naturel avec un polymère synthétique que l'on électrofile en même temps. Le ratio et le gradient des différents matériaux sont paramétrés. Le coélectrofilage augmente la taille des pores pour permettre l'infiltration des cellules (Bazilevsky, Yarin, et Megaridis 2007). On réduit la densité de tassement et augmente la taille des pores en utilisant des composants

sacrificiels⁷ pendant le coélectrofilage. Après la fabrication, le composant sacrificiel est retiré en traitant le support avec une solution aqueuse (Zander et al. 2013)

→ **Hydrofilage** : les fibres électrofilées sont collectées à la surface d'un bain d'eau. On obtient des supports avec des couches dont l'alignement a été modifié ; augmentation de la porosité du support pour une meilleure infiltration cellulaire (Tzezana, Zussman, et Levenberg 2008)

→ **Électrofilage 3D** : les collecteurs forment des architectures fibreuses multicouches. La technologie a été utilisée pour la reconstruction de l'oreille externe à l'aide d'un collecteur en forme d'oreille pour générer les supports (Walser et al. 2016)

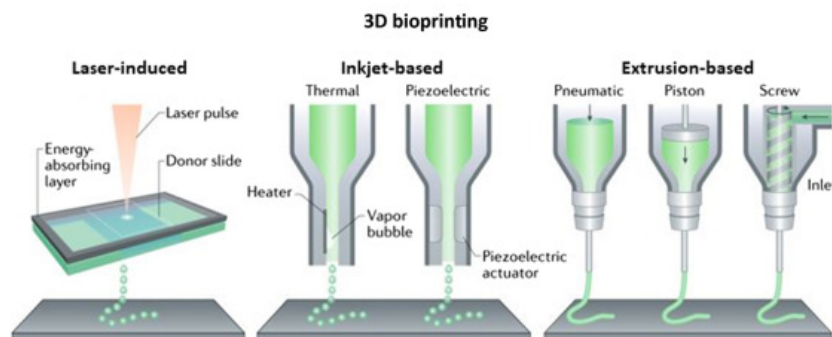
-utilisation de procédures de post-traitement qui permettent d'augmenter la pénétration des cellules

→ Ablation au laser : pour modeler les pores

→ Utilisation d'un peigne métallique pour séparer les fibres après l'électrofilage

→ Utilisation de l'énergie ultrasonique pour agiter mécaniquement les fibres immergées dans un liquide
On incorpore les cellules par des protocoles de culture cellulaire dynamique tels qu'un agitateur orbital, ou un bioréacteur à flux et à perfusion.

ii. Bioimpression tridimensionnelle par jet d'encre



La bioimpression 3D est une approche d'assemblage couche par couche pour élaborer une structure biologique 3D. Elle recrée la composition, la structure, et le degré de complexité des tissus et des organes entiers pour une utilisation clinique. La méthode par jet d'encre utilise des gouttes de cellules et de polymères pour bio imprimer des tissus cardiaques, osseux, neuronaux et

peaussiers.

Une vraie imprimante à jet d'encre modifiée a imprimé les premières cellules mais leur distribution et celle des biomatériaux n'étaient pas optimales. La conception d'une imprimante éjectant des gouttelettes par des procédés thermiques ou piézoélectriques était indispensable. Les tissus bio imprimés le sont rapidement, à faible coût, tout en étant de haute résolution (5 à 50 μm) et en permettant une excellente viabilité cellulaire. Malgré des contraintes en termes de viscosité des biomatériaux, d'encapsulation cellulaire et de directionnalité des gouttelettes de nombreux tissus complexes peuvent être élaborés.

iii. Bioimpression tridimensionnelle par extrusion

La bioimpression par extrusion permet le dépôt précis de filaments cylindriques continus contenant des matériaux/cellules à l'aide de systèmes pneumatiques, à piston ou à vis. Les structures extrudées ont une meilleure intégrité structurelle et sont utilisées pour former des supports 3D poreux (Mandrycky et al. 2016). La distribution par une microbuse (\varnothing 25 à 300 μm) est prédéfinie informatiquement. Le mouvement des buses, la quantité de biomatériau et les paramètres sont programmés par ordinateur. La bioimpression 3D par extrusion a fait l'objet d'une attention considérable pour la création de tissus ou d'organes artificiels malgré sa faible résolution : des matériaux de bio-encrage biomimétiques de la MEC natives ont été mis au point pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules.

L'institut de médecine régénérative de Wake Forest a développé une imprimante intégrée tissus-organes en utilisant des données d'imagerie, des encres spécifiques et un système multi buses.

⁷ Une pièce sacrificielle est une partie d'une machine ou d'un produit qui est intentionnellement conçue pour tomber en panne sous une contrainte mécanique excessive, une contrainte électrique ou d'autres situations inattendues et dangereuses.

Une des avancées majeures qu'a permis la bioimpression par extrusion est la génération de micro-canaux dans les tissus qui favorisent la diffusion de l'oxygène et des nutriments vers les cellules, et la partie centrale de la structure. Des os, du cartilage, des muscles squelettiques, des tissus cardiaques, de la peau, le foie, les reins, la vessie, les poumons et la trachée ont été imprimés et implantés *in vivo* dans des modèles animaux. Des progrès restent à faire pour élaborer des organes complexes à taille humaine, mais l'extrusion reste la meilleure technique pour fournir un l'environnement adéquat pour proliférer, se différencier et former des tissus (Kang et al. 2016).

Une autre technologie a fait son apparition, la combinaison de sept capillaires reliés chacun à sa propre réserve d'encre, au sein d'une seule tête d'impression qui permet d'extruder plusieurs encres biologiques en continue. Chaque capillaire est actionné et contrôlé individuellement, et la fabrication de constructions complexes est rendue possible par le passage rapide et sans heurts entre les différents réservoirs. Grâce à cette technologie, on élabore des tissus complexes rapidement (W. Liu et al. 2017).

Des **bioencres** plus performantes et plus adaptées sont en cours de développement :

-**hydrogels auto cicatrisants et amincissants par cisaillement** : assemblage supramoléculaire de nanoparticules, de petites molécules ou de macromolécules. On adapte leurs propriétés de gélification uniques et rhéologiques en fonction des besoins et des procédés d'impression (Jungst et al. 2016).

→ Dérivés des hexa peptides qui s'auto-assemblent en hydrogels nanofibreux stables (Loo et al. 2015)

→ Dérivés des protéines de soie d'araignée recombinantes permettent d'obtenir une bonne fidélité d'impression et une bonne compatibilité cellulaire (Schacht et al. 2015)

→ Dérivés d'acide hyaluronique : en introduisant des méthacrylates dans les macromères d'acide hyaluronique ou en double réticulant et photo polymérisant la liaison hôte-invité on augmente leur stabilité, ce qui permet de ne pas avoir recours à des supports (Highley, Rodell, et Burdick 2015).

-**hydrogels polymériques** (Ji et Guvendiren 2017): très ressemblant à la MEC natives dont on contrôle facilement les propriétés physico-chimiques et peuvent être constitués à base de :

→ PEG

→ Polyesters

→ Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm)

→ Polyphosphazènes

-**hydrogels supramoléculaires thermoréversibles** (Lorson et al. 2017) : utilisés comme bio-liens c'est à dire un polymère biocompatible est combiné à un matériau qui confère des propriétés uniques au bio-lien pour une application spécifique

- **dérivés de dMEC** (Pati et al. 2014) : ils favorisent une meilleure prolifération, différenciation et maturation des cellules, ainsi que des effets thérapeutiques globaux *in vivo* après la greffe

→ Patches de tissus cardiaques chargés de cellules souches pour le traitement des modèles d'infarctus du myocarde (Jang et al. 2017)

→ Patches de tissus hépatiques pour la régénération du foie (C. H. Lee et al. 2005)

-**bioencres nano composites** dont les propriétés s'adaptent aux applications spécifiques.

→ À base de nanotubes de carbone à paroi simple recouverte d'ADN/HA bioactif pour l'impression d'électronique flexible en 2D et 3D (Farahani, Dubé, et Therriault 2016)

→ Organes sur puce : structures imprimées à l'intérieur de la puce ont conféré diverses propriétés telles que la biocompatibilité, une conductance élevée et la piézorésistance (Lind et al. 2017)

La bioimpression 3D est devenue un moyen populaire de créer des tissus artificiels utilisés à la fois pour l'étude de la biologie ou de la pathologie tissulaire de base et pour la réparation ou la régénération *in vivo*. Une application récente de la bioimpression 3D des tissus est l'examen de la toxicité, le dépistage des drogues et le développement dans le but de réduire ou d'éliminer l'utilisation d'animaux à ces fins. De nombreux types de tissus font l'objet d'une bioimpression 3D pour une utilisation *in vitro*.

6. Néovascularisation des tissus

L'avancement de l'ingénierie des tissus et, en fin de compte, des organes, nécessite la capacité de modeler les tissus humains composés de cellules, de matrices extracellulaires et de systèmes vasculaires avec des microenvironnements contrôlés qui peuvent être maintenus sur des périodes prolongées. À ce jour, les méthodes de bioimpression ont permis d'obtenir des tissus minces qui ne survivent que pendant de courtes périodes.

La vascularisation est une fonction clef pour le bon apport en nutriment, en oxygène du tissu et le métabolisme cellulaire. La diffusion ne se fait que dans des structures de 100 à 200 μm , si le tissu n'est pas vascularisé correctement et qu'il est plus épais alors celui-ci va nécroser.

Pour améliorer leur pertinence physiologique, une méthode de bioimpression en 3D de tissus vascularisés et chargés de cellules qui dépassent 1 cm d'épaisseur qui peuvent être perfusés sur puce pendant de longues périodes (>6 semaines). Plus précisément, nous intégrons le parenchyme, le stroma et l'endothélium dans un seul tissu épais en co-imprimant plusieurs encres composées de cellules souches mésenchymateuses humaines et de fibroblastes dermiques néonataux humains dans une matrice extracellulaire personnalisée à côté du système vasculaire intégré, qui est ensuite recouvert de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Ces tissus vascularisés épais sont activement perfusés avec des facteurs de croissance pour différencier les CSM vers une lignée ostéogénique *in situ*. Cette étude longitudinale des phénomènes biologiques émergents dans des microenvironnements complexes représente une étape fondamentale dans la génération de tissus humains. Ces tissus vascularisés en 3D peuvent être activement perfusés avec des facteurs de croissance pendant de longues durées (>6 semaines) pour favoriser la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines vers une lignée ostéogénique *in situ*. La capacité de construire et de perfuser des tissus 3D qui intègrent le parenchyme, le stroma et l'endothélium est une étape fondamentale vers la création de tissus humains pour des applications *ex vivo* et *in vivo* (Kolesky et al. 2016).

La stratégie de bioimpression par extrusion utilise des biomatériaux biomimétiques et un système d'extrusion avancé pour déposer des structures vasculaires perfusables avec des arrangements hautement ordonnés dans un processus en une seule étape. Une bioencre sensible aux cellules a été utilisée en combinaison avec un système d'extrusion coaxial multicouche pour réaliser une bioimpression 3D directe. Ce mélange de bio-liens a pu être d'abord réticulé ioniquement par des ions calcium, puis par une photoréticulation covalente pour former des constructions stables. Les propriétés rhéologiques de la bioencre et les résistances mécaniques des constructions résultantes ont été ajustées ce qui a facilité le dépôt précis de tubes creux complexes multicouches perfusables en 3D. Cette bioencre mixte a également présenté des caractéristiques biologiques favorables qui ont favorisé la propagation et la prolifération des cellules endothéliales et souches encapsulées dans les constructions bio imprimées, conduisant à la formation de vaisseaux perfusables, très organisés et biologiquement pertinents. Cette nouvelle technique peut avoir un potentiel significatif dans l'ingénierie des constructions de tissus vascularisés à grande échelle en vue d'applications dans la transplantation et la réparation d'organes (Jia et al. 2016).

La bioimpression 3D des réseaux vasculaires représente la meilleure approche pour créer des réseaux vasculaires dans des tissus et organes artificiels. Les efforts futurs dans cette direction devraient également inclure des considérations de conception, telles que la capacité à résister à la pression d'éclatement et l'aptitude à l'anastomose chirurgicale directe pour accueillir le système vasculaire. Le processus de fabrication peut devenir encore plus complexe lorsque le système vasculaire fait partie de la conception. Toutefois, le succès *in vivo* des tissus et organes épais ne peut être garanti sans cela (Chandra, Soker, et Atala 2020).

7. Bioréacteurs

Les bioréacteurs récapitulent l'environnement physiologique dans lesquels les cellules existent *in vivo* afin de :

- Développer les cellules en vue d'une utilisation clinique potentielle
- Tester de nouveaux traitements potentiels dans un environnement similaire à celui d'un *in vivo*
- Établir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les bioréacteurs peuvent **imiter les environnements *in vivo*** en assurant le contrôle physique et biochimique des signaux de régulation des cellules et des tissus cultivés. Les progrès en termes d'imagerie et de capteurs permettent de contrôler en temps réel des paramètres de culture :

- le pH
- la consommation d'oxygène
- la prolifération cellulaire
- la sécrétion de facteurs.
- l'application de forces mécaniques
- le contrôle de la stimulation électrique
- les composants dynamiques de la culture
- l'induction de la différenciation cellulaire.

Ces systèmes disposent de capteurs et de méthodes d'imagerie pour suivre l'évolution physiologique et :

- soutenir de la croissance tissulaire des constructions en trois dimensions
- réaliser la culture de deux phénotypes cellulaires différents
- générer des conditions de culture dynamique pour favoriser le transfert de masse
- recréer les microenvironnements complexes des cellules

Plusieurs types de bioréacteurs existent en fonction de leur degré de complexité, il faut trouver le bon compromis entre complexité et fonctionnalités en tenant compte de l'application finale :

- **bioréacteur de perfusion** : simule les environnements *in vivo* pour la l'ingénierie tissulaire. Le flux de milieu dépend de l'environnement (ascendant, transverse, ou dépendant de la microgravité).
- **bioréacteur à lit fluidisé** : réalise des transferts de masse afin de conditionner le tissu
- **bioréacteur à paroi rotative** : réalise des transferts de masse afin de conditionner le tissu

Par contre si le bioréacteur n'est pas optimisé, les cellules en cours de culture sont sensibles à :

- l'**architecture de la structure** : conception du support, épaisseur, interconnectivité et taille des pores.
- l'oxygénation (**tension en oxygène** appropriée) : c'est une étape clef du bon fonctionnement des bioréacteurs, des agents de distribution de l'oxygène tels que les perfluorocarbures ou les globules rouges artificiels peut aider à créer un environnement équilibré en oxygène, tandis que l'utilisation de capteurs d'oxygène fluorescents peut aider à contrôler cet environnement.
- les **stimuli mécaniques** : différents types sont utilisés pour conditionner les cellules (contraintes de cisaillement, de compression, d'étirement ou de pression). Ils activent les voies de signalisation cellulaires de la mécano-transduction et provoquent des changements tels que des adhésions focales, des contacts de cellule à cellule et des modifications de l'expression des gènes. Certains tissus comme les muscles, les ligaments et les vaisseaux ont besoin de ces stimuli pour devenir matures : par exemple un étirement cyclique des muscles augmente la concentration en protéines de la MEC (Nieponice et al. 2007). Les hépatocytes ont besoin de subir une contrainte de cisaillement (même action que la veine porte dans le foie, débit sanguin de 1200 ml/min) afin d'exprimer leurs véritables performances (Chandra, Soker, et Atala 2020). Les cellules souches peuvent subir une mécanodifférenciation lorsqu'elles sont exposées à des stimuli mécaniques
- le **stress**.

L'amélioration des nouveaux bioréacteurs doit prendre en compte tous les paramètres, mais cette complexité ne doit pas affecter leurs fonctionnalités. Afin de répondre à ce besoin de développement des études *in silico* (analyses informatiques) prennent en compte un ensemble de données : de la physiologie naturelle aux paramètres du bioréacteur. En répliquant *in vitro* les mécanismes de conditionnement physiologique des vaisseaux sanguins, dérivés de l'analyse *in silico* des interactions fluide-structure, on retrouve des conditions de cultures appropriées pour l'organe (Tresoldi et al. 2017).

8. Structures

a. Scaffold/ Support

Afin de remédier aux difficultés dues à la culture cellulaire 2D : peu de contrôle au niveau des interactions entre les cellules et les substrats cellulaires dans les tissus naturels, et limites dans la recréation des caractéristiques biologiques et physiologiques des tissus et organes humains, des supports 3D sont construits.

Les cultures 3D sont en développement et de nouvelles technologies arrivent chaque jour. Une des structures les plus étudiées est le support qui est élaboré grâce aux :

- Protocoles de production : électrofilage, hydrogel, bioimpression 3D et décellularisation des tissus.
- Contrôle de ses microstructures : pores, fibres, et phases.
- Contrôle des interactions cellulaires : greffes de molécules de la MEC, de médicaments, de peptides ou encore utilisation de matériaux réactifs aux stimuli.

i. Supports tridimensionnels

Après l'expansion cellulaire, l'étape suivante de l'ingénierie d'un tissu ou d'un organe consiste à créer un moule, ou support, à la forme du tissu.

Les supports servent à remplir le rôle de soutien de la matrice extracellulaire, ils doivent donc correspondre aux critères biophysiques, biomécaniques du tissu ou de l'organe que l'on cherche à imiter. En fonction de la thérapeutique à élaborer et du tissu ciblé on choisit des biomatériaux et des technologies adaptées.

Il y a plusieurs types possibles des supports : tridimensionnels, poreux et hydrogels fait à partir de :

- polymères naturels
- polymères synthétiques
- composites : de nouveaux matériaux dérivés de la matrice extracellulaire dMEC existent, ils conservent la composition du tissu natif : les protéines structurelles, les facteurs de croissance et les cytokines. On obtient un support qui augmente la viabilité, la croissance, la réparation et le remodelage des tissus. En combinant les dMEC avec les polymères synthétiques, les matériaux inorganiques et les céramiques on arrive à combler les défauts mécaniques des dMEC. Ces structures ont une résistance, une biorésorbabilité et une ostéoconductivité.

Les caractéristiques de la structure ont un impact direct sur la fonctionnalité de celui-ci *in vitro* et *in vivo* :

- porosité : afin de permettre aux cellules de s'infiltrer et de coloniser la nouvelle matrice il faut que la porosité soit élevée. La microporosité est nécessaire pour une bonne adhésion et un étalement des cellules optimum, et rendra le tissu mécaniquement plus résistant.
- taille des pores : est importante car elle permet de déterminer si le support va retenir et maintenir les cellules
- interconnectivité : afin de favoriser la croissance, la prolifération, la migration, la vascularisation des cellules et l'accélération de la formation de nouveaux tissus les pores doivent être ouverts et interconnectés
- morphologie des fibres : diamètres et alignement

ii. Supports en hydrogel

Ce sont les structures les plus utilisées, elles sont configurées comme un réseau de polymères hydrophiles réticulés ayant la capacité d'absorption de l'eau. On peut transformer les polymères naturels et synthétiques en hydrogels qui ressemblent aux tissus en termes de propriétés mécaniques, de teneur en eau, de leur microstructure de type MEC et de leur biocompatibilité.

La croissance des cellules dépend de trois paramètres des hydrogels :

- **porosité** : plus elle est élevée plus l'infiltration cellulaires et l'apport en nutriments aux sections internes seront efficaces.
- **biodégradabilité** : favorise l'expansion tissulaire en laissant aux cellules la liberté de remodeler leur microenvironnement.
- **Type de biomatériau** : comme nous l'avons expliqué précédemment
 → Biopolymères favorisent davantage l'adhésion, la prolifération cellulaires et la croissance des tissus que les matériaux synthétiques., il est difficile d'obtenir des biopolymères de qualité constante et cela impact directement les réponses cellulaires.
 → Les modifications des biomatériaux : ajout de ligands au sein du polymère module les fonctions cellulaires

Pourtant les supports 3D en hydrogel ne favorisent pas la modélisation du microenvironnement complexe de nombreux tissus et organes d'ordre supérieur.

iii. Supports tridimensionnels imprimés

L'impression 3D consiste en un étalage successif de couche de matériau afin de former des structures en trois dimensions dont on configure la morphologie des pores et leur porosité. Nous verrons plus tard au sein de ce travail que les avancées de l'informatique, d'analyse et de traitement de données, il est possible de concevoir un modèle de support personnalisé pour le patient.

Les biomatériaux utilisables par cette technique sont réduits : PCL, le PLGA et le PEG. On parle de bioimpression 3D si l'encre contient des cellules en suspension, cela permet de créer un support en une seule étape. Plusieurs méthodes de réticulation existent : la chaleur, la lumière UV ou un liant. Les propriétés rhéologiques du biomatériau doivent permettre le dépôt de brins de différentes épaisseurs, la résistance pour conservation sa forme jusqu'à polymérisation et prévoir son gonflement pour anticiper le résultat d'impression.

L'encre joue le rôle central, elle doit être de haute-fidélité afin de minimiser les réactions inflammatoires des tissus hôtes, d'assurer l'activité des cellules encapsulées ou ensemencées, et doivent offrir de multiples fonctionnalités pour imiter les fonctions biologiques (Y. Zhang et Atala 2019).

Des valves cardiaques à trois feuillets ont pu être imprimées, elles sont constituées d'une base d'alginate et gélatine à laquelle des cellules interstitielles de valves aortiques ainsi que des cellules musculaires lisses de sinus aortique ont été ajoutées.

Nous aurons l'occasion de développer au sein de la partie médecine régénérative, les protocoles et les applications de la bioimpression 3D de façon plus précise.

iv. Supports électrofilés/nanofibreux

L'électrofilage produit des matériaux non tissés dont le diamètre des fibres varie du nanomètre au millimètre. En termes de morphologie les nanofibres sont similaires à celle que l'on retrouve au sein de matrice extracellulaire (Liao et al. 2006). De nombreux biomatériaux peuvent être utilisés par électrofilage et transformés en support 3D. Cette technique a pourtant des inconvénients :

- les mauvaises infiltrations et migrations des cellules dues à un tassement des fibres du support
- la cytotoxicité du solvant résiduel
- la faible résistance en cas d'utilisation pour les supports poreux. Ce défaut peut être contourné en paramétrant précisément l'électrofilage (Rnjak-Kovacina et al. 2011), en utilisant des porogènes (Phipps et al. 2012) ou encore en réalisant cette technique en milieu humide.

v. Supports décellularisés

Même si les supports 3D fournissent un microenvironnement *in vivo* pour favoriser les fonctions cellulaires et la croissance des tissus, ils ne possèdent pas :

- la composition intégrale des protéines de la MEC et l'ultrastructure du microenvironnement.
- de vaisseaux sanguins essentiels à l'apport en nutriments au cœur de la structure.

Ces inconvénients ont poussé les chercheurs à utiliser des tissus et des organes décellularisés. Une fois le tissu complètement décellularisé, il ressemble à une combinaison de matrice extracellulaire et de vaisseaux sanguins, C'est une nouvelle plateforme issue du vivant, à laquelle on va ajouter des cellules afin de recréer un organe complet. Le protocole de décellularisation dépend de la densité, de la teneur en lipides et de l'épaisseur du tissu. Plusieurs agents chimiques existent, ils ont le défaut de modifier la matrice extracellulaire (les détergents solubilisent les membranes cellulaires mais dissocient aussi les protéines de la MEC) et de perturber l'ultrastructure. Il faut s'assurer également de la bonne élimination de ces détergents pour éviter de contaminer les cellules ensemencées plus tard.

Afin d'éviter la lyse des protéines de la MEC, un processus de congélation/décongélation a été mis au point (Prasertsung et al. 2008) Il est tout de même nécessaire de retirer les débris cellulaires de l'organe. Ce protocole altère l'ultrastructure du microenvironnement.

b. Ingénierie d'organes entiers

Le manque de donneurs et la défaillance sont des problématiques de santé publique internationales. Un marché noir d'organes s'est mis en place dans certains pays. En effet, en France entre 2016 et 2020 les besoins en organes ont augmenté de **+44,5 %**, plus de **26000 patients** sont en attente d'un organe. Cet accroissement du nombre de patients en attente d'un organe résulte en partie du **vieillessement** de la population, de **l'élargissement des indications** de greffes, mais aussi d'une **amélioration des techniques chirurgicales**, des prises en charge des patients et des **traitements immunosuppresseurs** (Agence de la biomédecine 2018).

L'ingénierie tissulaire est porteuse d'espoir dans cette direction, de nombreux efforts étant consacrés à la bioingénierie des tissus et même des organes entiers.

Les tissus décellularisés

Ils sont utilisés en tant que support et préparés en retirant les cellules des tissus d'origine à l'aide de détergents doux, après quoi ils peuvent être transformés en différentes formes telles que des blocs ou de la poudre pour être utilisés. On obtient la MEC du tissu dont ils sont dérivés et ainsi la forme, la taille et les propriétés structurelles complexes du tissu natif sont également conservées. Les tissus décellularisés représentent le support idéal. Plusieurs **techniques de décellularisation** existent :

- **méthodes chimiques** : on utilise des agents tensioactifs doux et des acides ou des bases. Le risque de toxicité et d'altération de la MEC dus aux produits chimiques ont engendré la création de protocoles mécaniques.

- **méthodes mécaniques** : pression hydrostatique élevée, le gel-dégel ou le CO₂ supercritique

- **combinées**

Elle peut être utilisée dans le cadre de la réparation des tendons, os, hernies, tissus parodontales, tissus vasculaires, tissus utérins et les valves cardiaques. Les nouvelles technologies ont permis de décellulariser puis recellulariser des organes entiers tels que le rein, le foie, le poumon et le cœur (J. J. Song et al. 2013; Ko et al. 2015; Kitahara et al. 2016). Malheureusement ces techniques peuvent endommager la structure protéique de la MEC, ainsi la méthode choisie dépend type tissulaire et des réactifs. Les techniques peuvent être optimisées en fonction du type de tissu, de sa taille, du protocole de recellularisation envisagé.

Des applications structurelles ou reconstructives utilisant la MEC issue de tissus décellularisés sont disponibles sur le marché :

- **SynerGraft** autorisée par la FDA, pour la réparation de la valve cardiaque aortique humaine par une allogreffe de valve pulmonaire décellularisée au lieu d'une autogreffe. Les cellules du donneur sont éliminées à 99 % de la matrice tissulaire en plusieurs étapes :

- Étape 1 : lyse hypotonique qui agrandit les cellules jusqu'au point de désintégration

- Étape 2 : dégradation par les nucléases qui décomposent l'ADN des cellules

- Étape 3 : lavages séquentiels qui permettent d'obtenir une valve exempte de cellules du donneur.

Les premiers résultats sont encourageants mais pas significativement différent des autogreffes cellularisées. SynerGraft pourrait constituer une option plus durable pour les patients qui ont besoin d'une reconstruction du canal de sortie du ventricule droit. Un suivi supplémentaire à long terme est nécessaire pour voir si ce processus de décellularisation améliore la durabilité à long terme de l'allogreffe (Brown et al. 2011).

- **AlloDerm** Regenerative Tissue Matrix pour greffe dermique humaine. C'est une matrice dermique allogénique humaine acellulaire conservée par lyophilisation utilisée dans la reconstruction mammaire alloplastique, la reconstruction de la paroi abdominale, la rhinoplastie, la réparation vaginale et la reconstruction gingivale.

Un essai clinique sur une trachée fabriquée avec de la MEC issue de tissu décellularisée, montre qu'après 5 ans la trachée était complètement cellularisée et vascularisée sans que cela ne provoque de réponse immunogène significative (Gonfiotti et al. 2014).

La décellularisation peut endommager la membrane basale endothéliale des vaisseaux, dans ce cas les chercheurs ont utilisé des peptides ou de l'héparine sur l'endothélium du vaisseau décellularisé pour

empêcher la coagulation du sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins pendant le processus de régénération (Bao et al. 2015).

Une nouvelle approche consiste à utiliser le tissu décellularisé comme un dispositif intermédiaire reliant les tissus natifs aux matériaux synthétiques. Le dispositif de liaison assure la compatibilité entre le tissu natif et les matériaux synthétiques au niveau moléculaire. Un exemple de cette approche est la préparation d'un complexe de derme cutané décellularisé et de poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA) par immersion du derme décellularisé dans des monomères de méthacrylate de méthyle, suivie d'une polymérisation. Les recherches ont montré que cette élasticité composite était similaire à celle du derme cutané, tandis que la valeur du module de compression était comprise entre celle du derme et celle du PMMA (Matsushima et al. 2014).

La MEC est bien plus qu'un support, elle interagit avec les cellules et contrôle leur organisation. Son rôle et ses actions ne sont pas les mêmes en fonction des tissus, elle est déterminante dans la reconstruction d'un tissu. Les chercheurs explorent la possibilité de retenir le réseau vasculaire des organes décellularisés, et d'utiliser des molécules bioactives afin de fonctionnaliser la MEC décellularisée. Le risque de rejet immunitaire est important, même si on ne laisse aucune trace des antigènes natifs. En effet le collagène VI de la MEC présent dans le squelette décellularisé, peut déclencher une réponse immunitaire hyper aiguë et en même temps participe à la stabilité de la structure. Il faut ainsi essayer de moduler l'effet immunogène (Boer et al. 2014).

On élabore la stratégie de décellularisation en fonction du type de tissu cible, de la biomécanique du tissu, de la méthode de réticulation, car ce phénomène a des effets différents en fonction de la composition protéines structurales. La recellularisation doit distribuer les cellules de façon homogène au sein de la matrice (Robertson et al. 2014) :

- perfusion des cellules à travers le système vasculaire de la construction
- l'injection directe de cellules dans le tissu
- utilisation de la sonication pour faciliter l'ensemencement
- ré-endothélialisation du système vasculaire de la structure décellularisée
- utilisation de bioréacteurs

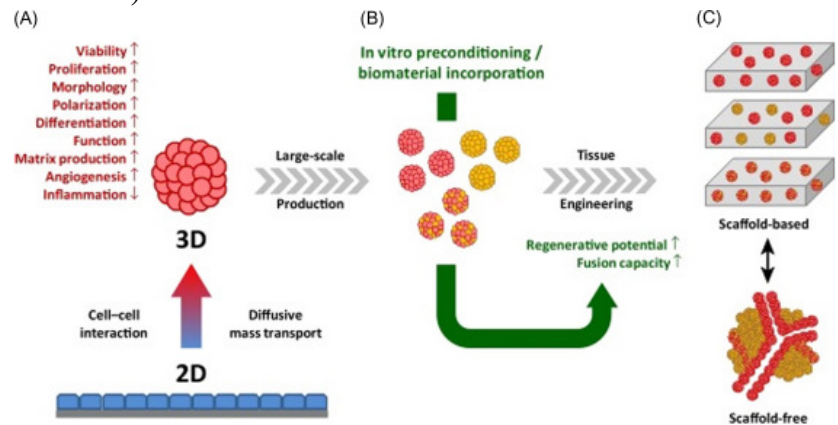
Bien que la décellularisation soit une avancée majeure dans le développement de l'ingénierie tissulaire, il faut optimiser les stratégies pour optimiser la reproductibilité des techniques.

c. Organoïdes et sphéroïdes

Les organoïdes, versions miniatures de tissus, sont créés et utilisés pour la recherche *in vitro* dans la modélisation des maladies, le screening des médicaments et le développement de médicaments. En régulant l'environnement de l'hydrogel on contrôle le comportement cellulaire en trois dimensions. Les organoïdes 3D ont été développés pour recréer le phénomène de croissance cellulaire contrôlé à des échelles de longueur appropriées en trois dimensions, qui se produit dans les tissus corporels. L'utilisation des organoïdes s'étend désormais au-delà de la recherche fondamentale pour englober la modélisation des maladies, la découverte/développement de médicaments et la médecine personnalisée. En outre, les organoïdes peuvent être facilement intégrés à des modèles de puces par le biais de la microfluidique. Les sphéroïdes cellulaires sont des complexes 3D composés uniquement de cellules, formés sur la base des tendances d'auto-assemblage de ces cellules (Cui, Hartanto, et Zhang 2017). Ils offrent de meilleures interactions entre les cellules et le transport de masse diffusif et sont utilisés non seulement pour l'étude des processus physiologiques et de développement et l'ingénierie tissulaire.

Figure 30 Utilisation des sphéroïdes cellulaires, de l'étude des processus biologiques fondamentaux à l'ingénierie tissulaire (Chandra, Soker, et Atala 2020)

- (A) Études des processus physiologiques et de développement
- (B) Amélioration du potentiel de régénération et de la capacité de fusion des sphéroïdes
- (C) Deux stratégies d'ingénierie tissulaire utilisant les sphéroïdes : avec ou sans support



Comme on peut le voir dans le schéma, plusieurs sphéroïdes d'origines cellulaires différentes se combinent. On les produit grâce à des micropuits ou des plaques de dépôt suspendues, pourtant ces dispositifs ne permettent pas de fabriquer des sphéroïdes ayant des structures similaires aux tissus natifs. De nouvelles méthodes ont été mises au point pour produire des sphéroïdes dont la structure se rapproche au maximum de celle des tissus natifs :

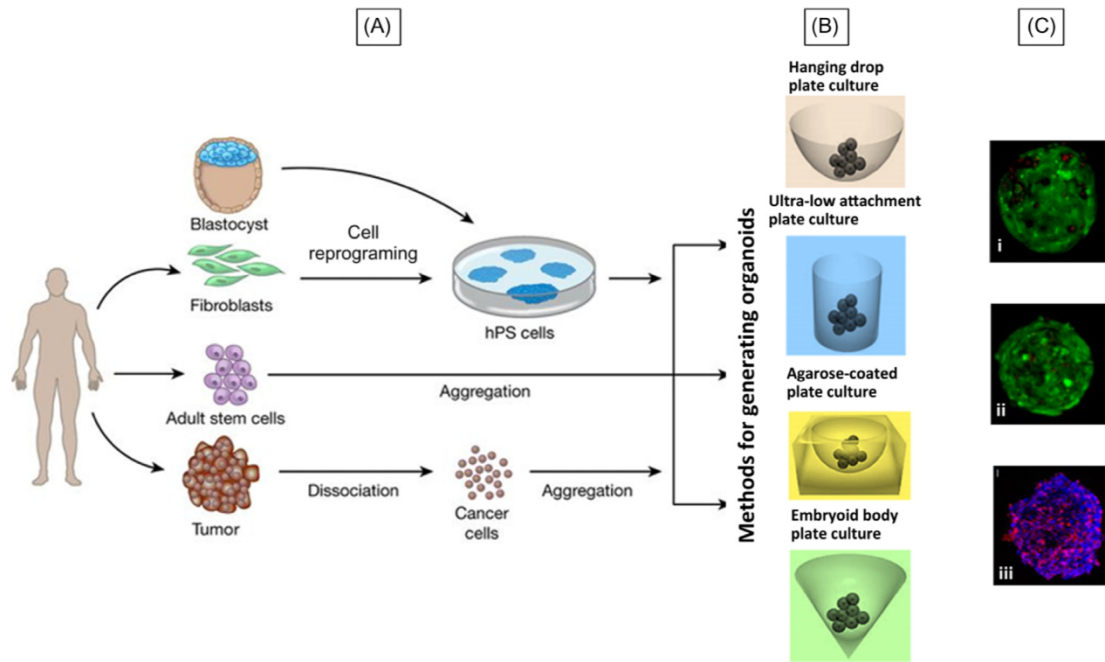
- auto-assemblage des fibroblastes grâce aux nanofibrilles générées par les phosphoprotéines et de glycoprotéines.
- injection de nanofibres fragmentées dans des sphéroïdes comme support physique artificiel pour contrôler la fonction cellulaire.
- mesurer le stress mécanique dans les sphéroïdes en injectant des microbilles ultrafines de polyacrylamide comme capteur de pression.

En utilisant plusieurs sources cellulaires et des techniques de fabrication (plaques de dépôt suspendues, plaques à fixation ultra-faible, plaques recouvertes d'agarose ou culture de surface MEC) on génère un organoïde (Figure 32 (B)). L'organoïde est un type de sphéroïdes qui présente un environnement physico-chimique et biologiques proche des tissus. Des organoïdes hépatiques, pulmonaires, pancréatiques, prostatiques, intestinaux, cardiaques et neuronaux permettent de recréer des conditions biologiques telles que l'organisation tissulaire, les lésions, la réaction aux molécules et la régénération. Des chercheurs ont produit des sphéroïdes corticaux humains ce qui leur a permis de prouver que les neurones gabaergiques pouvaient migrer du cerveau antérieur ventral au cerveau antérieur dorsal et s'intégrer dans les circuits corticaux(Birey et al. 2017).

Figure 31 Sources cellulaires et méthodes utilisées pour générer des organoïdes (Chandra, Soker, et Atala 2020)

Les CSE, IPS, CSA et les cellules tumorales peuvent servir à élaborer des organoïdes spécifiques à un tissu ou une pathologie.

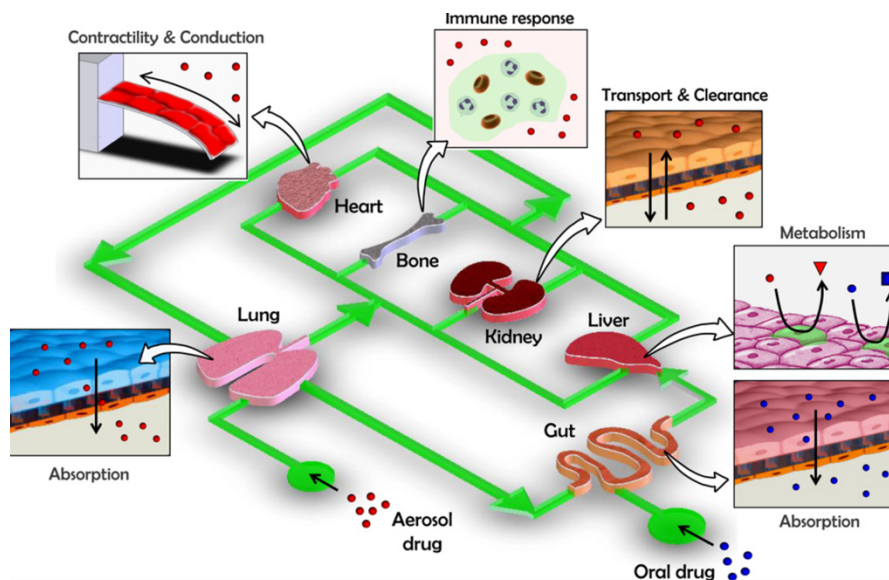
- i. Organoïde de foie
- ii. Organoïde cardiaque
- iii. Organoïde du cortex cérébral



d. Organ-on-chip ou Body-on-chip

Figure 32 Body-on-chip (Huh, Hamilton, et Ingber 2011)

Les microsystèmes biomimétiques représentant différents organes peuvent être intégrés dans un seul micro-dispositif et reliés par un système circulatoire microfluidique d'une manière physiologiquement pertinente pour modéliser un processus dynamique complexe d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion des médicaments, et pour évaluer de manière plus fiable l'efficacité et la toxicité des médicaments.



Les plateformes d'organes sur puce ou de corps sur puce peuvent
 -modéliser en 3D la biomimétiques de la physiologie *in vivo*
 -remplacer les modèles animaux
 -faire progresser la médecine personnalisée : retours spécifiques pour les patients sur l'effet de thérapies, facteurs environnementaux ou comportementaux.

Les études précliniques et les essais cliniques de molécules sont extrêmement coûteux, et le nombre de succès étant extrêmement réduit, les chercheurs se sont penchés vers des méthodes *in vivo* et *in vitro* alternatives aux techniques traditionnelles. Il est donc nécessaire de disposer de meilleurs modèles *in vitro*, physiologiquement pertinents, qui permettent de mieux prédire l'efficacité et la sécurité des médicaments

chez l'homme et qui peuvent être utilisés à haut débit. En dehors des organoïdes, l'ingénierie tissulaire a vu naître un système d'organes à base de micro fluides connus sous le nom « organ on chip » (Haddrick et Simpson 2019).

Ils permettent la récapitulation des microenvironnements structurels et physiologiques *in vivo*, les différents organoïdes spécifiques aux tissus peuvent être connectés dans un format de circuit intégré en utilisant la microfluidique pour créer un "body on chip".

La microfluidique peut nous permettre de créer des systèmes microphysiologiques en 3D, dont on contrôle le microenvironnement physique et chimique, et d'étudier des tissus et des organes vivants de manière plus complexe. Les systèmes multifonctionnels 3D basés sur la microfluidique peuvent également prendre en charge des cultures de cellules et d'organoïdes, où le contrôle de paramètres tels que la faible teneur en nutriments, les gradients d'oxygène et la distribution de médicaments/biologiques peut être utilisé pour des tests précis à haut débit et des applications d'échantillonnage de l'environnement. Les systèmes basés sur les micro fluides ont contribué de manière significative à la modélisation *in vitro* de tissus tels que le cœur (Aung et al. 2016), les reins (Kolesky et al. 2016) et la barrière hémato-encéphalique (Partyka et al. 2017). On cherche à comprendre les mécanismes physiologiques et biologiques afin de définir les environnements cellulaires. On crée des versions miniatures des organes qui capturent leurs fonctions, on peut ainsi étudier quantitativement les réponses à des signaux physico-chimiques.

Une évolution majeure est le « body-on-chip » qui contient différents organes placés sur une seule puce et connectés par les canaux microfluidiques représentant le système vasculaire. On peut ainsi avoir une visibilité sur les réactions des autres organes aux molécules, comme par exemple la toxicité, les effets synergiques, les interactions médicamenteuses, l'étiologie des pathologies et les processus biologiques. Les tissus de l'organe sur puce et du corps sur puce peuvent désormais être imprimés en 3D à haute résolution et de manière hautement répliquative. Cela a permis de faire progresser les systèmes d'organes sur puce et de corps sur puce du stade de l'investigation à celui de l'utilisation comme outil de diagnostic fiable (Chandra, Soker, et Atala 2020).

e. Surface intelligente

Nous savons que les supports présentent des limitations

- migration cellulaire insuffisante dans le support
- faible perméabilité permettant la pénétration des cellules et des nutriments
- la dégradation de la matrice peut diminuer la stabilité *in vivo* des tissus à base de matrice après l'implantation
- occupent un certain espace dans les tissus construit ce qui empêche l'interaction cellulaire

Pour surmonter ces limitations, un système de génération de tissus sans support était nécessaire pour une nouvelle classe de technologie de médecine régénérative. Des substrats intelligents de culture cellulaire thermo réactive peuvent être utilisés comme des outils puissants pour établir un type unique d'ingénierie tissulaire appelé "ingénierie des feuilles cellulaires" fiables (Chandra, Soker, et Atala 2020).

On utilise des **polymères thermoréactifs** pour l'ingénierie des feuilles cellulaires, ces matériaux changent en fonction de la température ou du pH. Ce comportement de commutation dépendant de la température a été largement utilisé dans le domaine de l'administration de médicaments et nous permet de concevoir des systèmes de libération induite par des stimuli (H. Takahashi, Shimizu, et Okano 2019).

Grâce à la surface thermoréactive du PIPAAm, les cellules adhèrent à une température classique de culture c'est-à-dire 37 degrés mais dès qu'elles passent en dessous de la température critique (32 degrés) la surface devient hydrophile et la surface n'est plus adhésive. On peut détacher spontanément différents types de cellules sans risque d'altération par des enzymes, on se retrouve avec une monocouche de cellules.

Afin de pouvoir utiliser ces feuillets cellulaires pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative, il faut obtenir plusieurs couches de cellules. Afin de réguler l'adhésion et le détachement des cellules, le PIPAAm doit être greffé par irradiation par faisceau d'électrons de manière covalente précisément à l'échelle nanométrique sur une solution de N-isopropylacrylamide sur une boîte de polystyrène pour culture de tissus. Son épaisseur doit être de 20 nm afin de fournir l'hydrophobicité suffisante pour l'adhésion cellulaire à une température de culture normale. On peut trouver des boîtes de culture thermosensible préparées dans le commerce.

Pour fabriquer n'importe quel type de feuille cellulaire, une surface thermoréactive appropriée doit être choisie en fonction des caractéristiques de la feuille cellulaire, comme le type de cellule.

Grâce aux **feuilles cellulaires** on peut récolter des cellules thérapeutiques en préservant les jonctions cellulaires et les MEC associées, il n'est donc pas nécessaire d'avoir un support artificiel. La MEC agit comme une colle pour faire adhérer les feuillets cellulaires au tissu hôte, sans besoin de sutures. Les traumatismes graves ou les troubles oculaires tels que le syndrome de Stevens-Johnson peuvent entraîner la perte complète des cellules souches épithéliales de la cornée et peuvent provoquer une opacification de la cornée avec une perte visuelle importante. Le seul traitement disponible est l'allogreffe de greffe de limbe. Des cultures de cellules épithéliales dérivées de tissus de la muqueuse buccale ont été fabriquées avec succès sur la surface intelligente et peuvent être transplantées simplement en les manipulant avec le support d'une membrane en poly (fluorure de vinylidène) et en plaçant la feuille sur le stroma cornéen du patient sans support.

Les feuillets cellulaires greffés adhèrent rapidement à la surface cornéenne de l'hôte sans suture.

Dans le modèle de lapin, la greffe a permis

- la conservation de la structure de l'épithélium cornéen
- la vascularisation et l'inflammation étaient inhibées
- la clarté et l'onctuosité de la cornée se rétablissaient

Une étude clinique a démontré qu'en greffant les feuillets de cellules épithéliales autologues aux patients, il y avait une bonne tolérance et une bonne efficacité après la greffe (Nishida et al. 2004).

On peut appliquer ce modèle à d'autres tissus comme le myocarde, l'œsophage, le ligament parodontal et le cartilage.

On peut établir des structures en trois dimensions grâce aux techniques de **stratification des feuillets**. Les feuilles cellulaires permettent de créer des tissus 3D sans support en les superposant, elles se lient étroitement grâce à la MEC préservée sous chaque feuille de cellules individuelle. Les cellules peuvent communiquer les unes avec les autres à la fois physiquement et biologiquement c'est donc une méthode efficace de conception de tissus fonctionnels en 3D. Par exemple, les cardiomyocytes cultivés sur la surface thermoréactives peuvent être récoltés sous la forme de feuille cellulaire continue, au sein de chacun de ces feuillets il existe un battement synchronisé. Lorsque les feuillets sont superposés, les battements à différents rythmes sont synchronisés dans l'ensemble du tissu myocardique 3D. La superposition permet l'interaction électrochimique entre chaque couche cellulaire, on peut donc construire un tissu en 3D sans avoir recours à un support. La technologie d'empilement de feuilles cellulaires promet de fournir des modèles de tissus/organes *in vitro* et des thérapies plus efficaces pour guérir les défaillances des tissus/organes (Haraguchi et al. 2012).

On peut également un **système de coculture** basé sur la superposition des feuillets, ce qui permet de construire des tissus uniques. Pour les tissus hépatiques, il est difficile de conserver les fonctions spécifiques des hépatocytes *in vitro*. On arrive à résoudre cette problématique en mettant en coculture les hépatocytes avec des cellules endothéliales, ce qui contribue au maintien des fonctions hépatiques par rapport aux cultures monocouches conventionnelles. La technologie de superposition des feuillets cellulaires multiples est une opération simple et a permis de reproduire avec succès les interactions entre les cellules et la matrice cellulaire hétérotopiques/homotypiques et les configurations d'hépatocytes natifs. Comme la construction hépatique 3D imite étroitement l'environnement *in vivo*, elle pourrait être utile comme modèle tissulaire pour le criblage de médicaments, comme tissu implantable pour les thérapies cellulaires et comme plate-forme de culture efficace pour les dispositifs de foie bio-immobilisé (K. Kim et al. 2017).

La vascularisation est nécessaire pour permettre l'échange de nutriments, d'oxygène et des déchets, au-delà d'une certaine épaisseur de tissu. Dans le tissu myocardique reconstitué par les feuillets superposés, on observe des nécroses. La coculture avec des cellules endothéliales est une approche prometteuse pour promouvoir la formation vasculaire dans les tissus artificiels, le feuillet endothélial est pris entre deux autres feuillets. Ils forment des ramifications de type vasculaire dans les couches cellulaires, ce qui favorise la vascularisation et les connexions aux vaisseaux de l'hôte après la greffe. Afin de retrouver du tissu vasculaire mature, on transfère les cocultures sur un lit vasculaire en utilisant une section réséquée de tissu

fémoral contenant une artère et une veine connectable. Lorsque la structure de feuillets cellulaires à trois couches est placée sur le lit vasculaire dans le système du bioréacteur, la MEC préservée permet aux feuillets cellulaires d'adhérer étroitement au lit vasculaire. On obtient grâce à ce procédé des réseaux de cellules endothéliales ramifiées se connectent aux vaisseaux sanguins provenant du lit vasculaire. Après la formation de vaisseaux sanguins tubulaires fonctionnels dans la construction tissulaire, les feuillets cellulaires peuvent survivre grâce aux nouveaux vaisseaux formés. On obtient des structures à six couches, qui peuvent être mises à l'échelle facilement (Sekine et al. 2013).

On peut utiliser ces **feuillets cellulaires** très facilement **associés à des supports** pour construire des structures encore plus complexes. Afin d'imiter un vaisseau sanguin natifs, on établit par électrofilage un squelette tubulaire sur lequel on enrobe de trois couches de feuillets cellulaires de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales. Contrairement au simple ensemencement, les cellules formant un feuillet cellulaire conservent les jonctions cellulaires essentielles et expriment des protéines contractiles lorsqu'elles sont appliquées sur la matrice vasculaire. Afin de pallier aux problèmes de nécrose, on utilise un bioréacteur à perfusion pulsatile pour améliorer l'alimentation et l'échange gazeux. De plus, le flux pulsatile et la pression exercée sur la structure cellulaire ont permis d'obtenir une maturité tissulaire capable de supporter le niveau de flux sanguin de l'artère native (Ahn et al. 2015).

L'anisotropie tissulaire est un facteur essentiel pour fournir des fonctions biomimétiques aux tissus artificiels. Au niveau du muscle squelettique natif, la structure en faisceau des myofibres hautement orientées est essentielle pour générer des fonctions mécaniques. On peut utiliser la micro-modélisation pour orienter les substrats de culture. Certains substrats régulent l'orientation des cellules en 2D dans un premier temps puis les cellules alignées sont empilées en feuilles de cellules, couche par couche. La surface fonctionne pour réguler l'orientation des cellules et libérer la feuille cellulaire (Lücker et al. 2014).

Dans le tissu myocardique natif, les couches de cardiomyocytes alignés qui sont orientés dans différentes directions dans l'ensemble du tissu. Cette structure bien organisée et orientée en 3D est importante pour générer la propagation électrique anisotrope que l'on trouve dans le myocarde natif. En utilisant la technique de stratification, les feuilles cellulaires composées de cellules alignées peuvent être superposées pour obtenir les directions souhaitées. Cette technique d'organisation de l'orientation des cellules dans les tissus artificiels devrait être utile pour produire des tissus myocardiques biomimétiques (H. Takahashi et al. 2011).

Grâce à cette technique de feuillet cellulaire on arrive de façon très simple à reproduire des structures très complexes, il ne reste qu'à développer et combiner cette méthode afin d'en tirer tout son potentiel.

9. Objectifs

Un véritable besoin clinique existe, les solutions thérapeutiques pour les tissus endommagés ne sont pas nombreuses. En effet la plupart des traitements ne servent qu'à compenser la fonction défaillante, la thérapeutique véritablement efficace est la transplantation mais les organes ne sont pas toujours disponibles ou les conditions logistiques ne permettent pas l'accès à ceux-ci au bon endroit et au bon moment. Certaines lésions ne pouvant pas être traitées par une greffe, le remplacement du tissu est indispensable.

On cherche à générer un nouveau tissu ou organe sain pour remplacer le tissu et sa fonction. Un exemple frappant sont l'insuffisance rénale chronique qui touche 10% de la population mondiale, l'ingénierie tissulaire peut être la solution.

Les besoins cliniques sont très nombreux, quelques exemples ci-dessous :

- Maladies rénales
- Pathologie du foie
- brûlures de peau
- défauts osseux
- reconstruction cornéenne
- système nerveux lésé (Maladie neurodégénérative)
- réparation du cartilage
- maladies vasculaires
- maladies pulmonaires
- tissus gastro-intestinaux
- tissus génito-urinaires

L'approvisionnement en cellules est également un goulot d'étranglement pour la bio-ingénierie des organes entiers. Avec l'exploration d'un plus grand nombre de sources de cellules souches adultes et d'iPS humaines, il serait possible de fabriquer des tissus et des organes prêts à l'emploi à l'avenir. Cela permettra de réduire, voire d'éliminer, la liste d'attente toujours plus longue et le temps nécessaire aux transplantations et de traiter certaines pathologies sans alternatives thérapeutiques.

Plusieurs tissus issus de l'ingénierie tissulaire sont en voie de transfert clinique pour des applications de médecine régénérative sont déjà utilisés chez les patients. Il s'agit notamment de cartilage, d'os, de peau, de vessie, de greffes vasculaires, de tissus cardiaques. Bien que des tissus complexes tels que le foie, le poumon, le rein et le cœur aient été recréés en laboratoire et soient testés sur des animaux, leur transfert clinique doit encore relever de nombreux défis.

10. Devenir de l'ingénierie tissulaire

Malgré les progrès des sciences fondamentales et appliquées dans l'ingénierie tissulaire dans de nombreux domaines, les succès cliniques et commerciaux sont lents à émerger. En effet on est confronté à des problèmes de mise à l'échelle des techniques de biofabrication. Le nombre d'essais cliniques plus faible que prévu, les processus réglementaires et l'économie de la santé en sont quelques-unes des raisons. La prochaine décennie devrait voir d'autres avancées, notamment l'incorporation d'un plus grand nombre de nouvelles technologies, l'évolution des biomatériaux intelligents, l'utilisation généralisée des cellules souches, la fabrication de tissus plus complexes et d'organes entiers, l'utilisation de tissus issus du génie biologique en remplacement des essais sur les animaux, la médecine personnalisée et la traduction clinique d'un nombre bien plus important de produits issus du génie tissulaire. Le développement de tissus et d'organes complexes implique le processus complexe de croissance cellulaire coordonnée, de différenciation, de morphogenèse et de maturation de diverses populations de cellules. Bien que la capacité à concevoir des tissus complexes et des organes entiers soit attrayante et puisse avoir un impact sur la médecine translationnelle, elle constitue toujours un défi majeur. Pour relever ce défi, les connaissances issues de multiples disciplines telles que le développement, l'anatomie, la physiologie et la biologie cellulaire devront être associées à des technologies habilitantes telles que les biomatériaux, la biofabrication (y compris la bioimpression 3D), les bioréacteurs avancés, la modélisation 3D, l'imagerie à haute teneur et les nanotechnologies.

III. Médecine régénérative

1. Définition

La médecine régénérative représente le domaine de la médecine qui vise à **remplacer ou à régénérer les cellules, les tissus et les organes humains** dans le but de **rétablir les activités fonctionnelles normales**. Elle utilise pour cela la thérapie cellulaire (administration de cellules pour développer de nouveaux tissus) ou l'ingénierie tissulaire (implantation de substituts biologiques construits *in vitro*). La médecine régénératrice dynamise l'évolution technologique vers la médecine du futur.

La médecine régénératrice commence à représenter une **source potentielle de traitements curatifs**, tant pour les blessures aiguës que pour les maladies chroniques. Nous allons mettre en avant les applications cliniques pour certains organes et pathologies. Comme nous l'avons vu jusqu'à présent avec la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire, la médecine régénérative a énormément avancée mais il lui reste de nombreux défis à relever avant d'être utilisée en routine quotidienne. Les médecins, les chirurgiens, les cliniciens et, en général, les politiques de santé ne sont pas enclins à remplacer les approches conventionnelles par des thérapies innovantes sans procéder à des expériences prolongées et approfondies. En effet, des inquiétudes réelles subsistent quant aux défis liés à la manipulation et à la fabrication de tissus vivants, à la réglementation, au remboursement et à la mise en service, ainsi qu'à l'adoption clinique.

2. Domaines d'applications cliniques

Les approches technologiques multidisciplinaires, allant des thérapies de remplacement traditionnelles à la thérapie cellulaire, génétique et tissulaire, convergent rapidement vers le développement de nouvelles approches de médecine régénérative. Cette synergie fait également appel à des technologies de pointe liées aux thérapies par petites molécules et aux produits biologiques innovants dans le domaine de la découverte et du développement de médicaments. De même, les dernières avancées dans le domaine des cellules souches, de l'édition des gènes et de la reprogrammation cellulaire font de la médecine régénératrice l'une des voies les plus prometteuses avec de multiples applications.

Nous allons montrer que les principes de la médecine régénérative peuvent être appliqués dans de multiples contextes quotidiens, et devenir le traitement de référence avec des profils d'efficacité et de sécurité assurés. Les avancées ne sont pas aux mêmes niveaux en fonction des différents appareils, organes et tissus développés, certains ont déjà été implantés et d'autres sont encore en phase précliniques.

Nous allons parcourir quelques-unes des innovations de médecine régénérative et nous nous intéresserons plus en détail au rein qui est l'organe le plus recherché.

a. Appareil urinaire : vessie

La vessie est un organe du système urinaire qui stocke l'urine terminale provenant des reins *via* l'uretère, pour ralentir les mictions. L'urine est évacuée par l'urètre au cours du phénomène de miction. La vessie est creuse composée d'une paroi extensible fonction de la quantité d'urine (de 0,5 à 0,8 litre, l'envie d'uriner survient à partir de 0,3l). Elle est composée de quatre couches dont deux fonctionnelles :

- urothélium : l'épithélium interne est une muqueuse tapissant l'intérieur de la vessie au contact de l'urine, composée d'un tissu urothélial et de la lamina propria qui régule certains aspects de la physiologie globale de la vessie en réponse à des stimuli tels que la distension pendant le remplissage.
- un chorion : c'est une couche sous-muqueuse contenant les vaisseaux sanguins, les nerfs et les glandes.
- une couche externe de muscles lisses ou détrusor : permet à la vessie de se contracter ou de se relâcher, les fibres musculaires lisses sont disposées en spirale longitudinalement et circulairement.
- graisse périvésicale qui entoure la vessie.

L'épithélium transitionnel, les fibres élastiques et le tissu musculaire viscéral des parois de la vessie contribuent à sa distensibilité et à son élasticité, lui permettant de s'étendre facilement et de retrouver sa taille initiale plusieurs fois par jour. Afin de régénérer une vessie fonctionnelle, le détrusor et l'épithélium interne doivent absolument être présents.

La structure biologique et les fonctionnalités de la vessie peuvent être endommagées suite à des cancers, des traumatismes, des troubles congénitaux et des inflammations. En plus de la pénurie d'organes « greffables », la demande augmente avec le vieillissement de la population et l'augmentation des nouveaux cas de défaillances d'organes. De plus en plus d'organes sont nécessaires, il faut envisager la reconstruction des voies urinaires inférieures avec **des tissus autogènes non urologiques** par :

- Greffe de vessie
- Traitement médicamenteux
- Segments gastro-intestinaux : ce n'est pourtant pas un tissu adapté au contact de l'urine, en effet le tissu absorbe les solutés alors qu'il devrait excréter des protéines en attendant l'évacuation. Ils entraînent plusieurs complications : production de mucus, urolithiase, infection, perforation, troubles métaboliques et même cancer.
- Des muqueuses provenant de plusieurs sites corporels
- Des tissus homologues provenant d'un donneur cadavérique ou donneur vivant de rein
- Des tissus ou substances hétérologues comme le collagène bovin

L'objectif de ces stratégies thérapeutiques est d'assurer les fonctions de stockage et de vidange associées à une bonne conformité. Cependant il est très difficile de modéliser des tissus ayant les mêmes capacités en ingénierie tissulaire. Le tissu implanté peut être rejeté ou ne pas reproduire les fonctionnalités du tissu vésical natif. Par conséquent, le remplacement des tissus urologiques perdus ou déficients par des tissus fonctionnellement équivalents améliorerait les résultats de la chirurgie reconstructive du système génito-urinaire.

Modèles pré clinique de régénération des tissus (Y. Zhang et Atala 2019):

Deux modèles expérimentaux *in vivo* ont été utilisés pour la régénération de la vessie :

- l'hémicyclostoplastie : on retire 40 à 50 % des tissus vésicaux
- la cystoplastie sous-totale : on retire plus de 75% des tissus vésicaux sont retirés

Dans les études précliniques on a tendance à utiliser les petits animaux pour tester de nouvelles sources de cellules, et en cas d'hémicyclostoplastie car ce sont des modèles moins chers dont on connaît très bien l'histologie. Pour la cystoplastie totale on utilise des animaux de grandes tailles (comme les porcs), afin de se rapprocher de la physiologie, de l'histologie et de l'anatomie de l'organisme humain. Des modèles animaux de fibrose vésicale ont été mis au point, notamment en déviant le trajet de l'uretère.

	Hémicyclostoplastie	Cystoplastie
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Évaluation de la technique d'ingénierie tissulaire à partir de tissus ensemencés ou non ensemencés - La vessie conserve souvent sa fonction contractile grâce à la vessie d'origine et à celle régénérée - Histologiquement, urothélium entièrement régénéré ; régénération et innervation musculaires partielles 	<ul style="list-style-type: none"> - Évaluation de la technique d'ingénierie tissulaire à partir de tissu ensemencé - Le tissu agit comme réservoir urinaire - L'urothélium est régénéré - La capacité de la vessie augmente précocement
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Risque de rétrécissement du greffon et de formation de calculs vésicaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque élevé d'effondrement ou de rétrécissement du greffon et de formation de calculs vésicaux - Innervation, myogenèse et apport sanguin limités au centre de la greffe - Le volume de la vessie peut diminuer avec le temps

Avant l'implantation on doit connaître les cellules, les supports ou structure tridimensionnelle, les biomatériaux utilisés pour assurer la bonne régénération de la vessie et afin d'anticiper et de mieux comprendre leurs réactions (Y. Zhang et Atala 2019).

Les cellules doivent être caractérisées, on doit connaître le profil de prolifération, les phénotypes, les effets paracrines des cellules souches, des cellules souches différenciées urothélialement et myogéniquement ou des cellules urothéliales et musculaires lisses.

Les supports doivent être biocompatibles, biodégradables, il est nécessaire de connaître les propriétés mécaniques, à porosité, la taille des pores et la composition protéique bioactive

Les interactions entre cellules et supports doivent être connues en amont afin de démontrer les interactions entrant en compte pour l'adhésion et l'infiltration des cellules dans le support en utilisant des techniques histologiques

Modèles non cliniques

Des études ont ensemencé un support de polymères avec des cellules musculaires et urothéliales que l'on attache pour former des feuillettes de cellules qui sont implantés *in vivo*. Les cellules histologiquement viables s'auto assemblent dans leurs types de tissus respectifs et respectent leurs phénotypes natifs. Des structures composites de tissus stratifiés pouvaient être créées de novo.

→ Par exemple, dans le cas de **modèle canin**, suite à des cystectomies partielles, les vessies augmentées avec des matrices de collagènes voient leurs capacités augmenter de 30%, contre une augmentation de 100% pour les matrices ensemencées. Pour les greffons libres sans cellules, l'urothélium était bien développé mais les cellules musculaires forment une couche anormale, partiellement développement complet. Ces différences dans ces couches sont dues au potentiel de réparation de l'urothélium plus important que celui du tissu musculaire. Cependant, la contracture ou la résorption du greffon est généralement évidente. La réponse inflammatoire vers la matrice peut contribuer à la résorption du greffon libre. On a émis l'hypothèse que la construction d'une structure 3D *in vitro* avant l'implantation faciliterait la différenciation terminale éventuelle des cellules après l'implantation *in vivo* et minimiserait la réponse inflammatoire à la matrice, évitant ainsi la contracture et le rétrécissement du greffon (J. J. Yoo et al. 1998; Monsour et al. 1987).

Les matrices implantées avec des cellules pour l'augmentation de la vessie ont conservé la plupart de leur diamètre implanté, la structure 3D facilite la différenciation terminale et minimise la réponse inflammatoire. Par opposition aux matrices sans cellules, dans lesquelles le greffon se contracte et se rétrécit, cela est dû à une pénurie de cellules musculaires et une réaction inflammatoire plus agressive dans les matrices implantées sans cellule. La signalisation épithéliale mésenchymateuse est importante pour la différenciation du muscle lisse de la vessie (Master et al. 2003).

→ **Dans un modèle de rat** après une cystectomie partielle, on utilise de la matrice acellulaire vésicale (BAM), préparée en éliminant mécaniquement et chimiquement les composants cellulaires du tissu vésical. Elle ne permet pas d'obtenir une régénération complète de la vessie, car les couches musculaires se sont développées de manières incomplètes (Jayo et al. 2008). Dans un modèle canin, on peut utiliser cette technique pour améliorer la régénération des tissus en lui associant des cellules souches pour améliorer la régénération des tissus (Haichao Yuan et al. 2013).

En réalisant des greffes de vessies artificielles *in vivo* mais on ne peut pas déterminer si les paramètres fonctionnels observés sont causés par le segment augmenté ou par le tissu vésical natif intact.

En réalisant une cystectomie subtotalaire que l'on remplace par une vessie artificielle issue de l'ingénierie tissulaire et composée de trois couches urothélium, sous muqueuse et une couche musculaire. On retrouve un volume vésical proche du tissu natif, malgré une compliance mauvaise, on retrouve les phénotypes musculaire et urothélial. Si une grande partie de la vessie doit être remplacée, toutes compositions des supports ne sont pas équivalentes. L'utilisation de bioréacteurs, dans lesquels la stimulation mécanique est déclenchée au moment de la production d'organes, a également été proposée comme un paramètre important pour le succès.

On privilégiera les vessies issues de l'ingénierie tissulaire à base des supports ensemencés par des cellules (Jayo et al. 2008; Kwon, Yoo, et Atala 2008).

La vessie artificielle doit encore relever de nombreux défis, tels que le choix approprié des modèles animaux ; chaque modèle animal présente en effet sa propre spécificité

→ **La composition de l'urine de lapin conduit à la formation de calculs vésicaux lorsque l'animal est soumis à des implants de matériaux vésicaux exogènes**

→ **Les animaux plus grands ont une anatomie similaire au corps humain que les rats ou les lapins**
Études cliniques

La première expérience clinique de reconstruction des tissus vésicaux artificiels post cystoplastie remonte à 1998. Une étude pilote sur sept patients, de 4 à 19 ans, souffrant de myéломéningocèle nécessitant une cystoplastie d'augmentation, car ils souffraient d'une incontinence urinaire grave en raison de leurs vessies neuropathiques (haute pression ou peu accommodantes). La vessie a été reconstruite à l'aide :

- d'une matrice de collagène ensemencée avec les propres cellules de la vessie du patient, avec ou sans omentum
- d'un support combiné de PGA et collagène ensemencé de cellules et de couverture omental. Les patients ont montré une meilleure compliance, une diminution des pressions de remplissage des extrémités, une augmentation des capacités et des périodes sèches plus longues dans le temps.

Après un suivi moyen de 46 mois, aucune conséquence métabolique et aucun calcul rénal n'ont été constatés et la production de mucus et la fonction rénale sont restées normales. Enfin, les biopsies des vessies artificielles ont montré une architecture structurelle et un phénotype adéquat. Cette expérience montre clairement que les vessies artificielles ont continué à s'améliorer avec le temps, reflétant leur développement continu. Bien que ce rapport soit prometteur en termes de démonstration de la sécurité de l'implantation des tissus artificiels, il ne constitue qu'un début pour atteindre l'objectif de concevoir des vessies pleinement fonctionnelles. Il s'agissait d'une expérience clinique limitée ; la technologie n'est pas encore prête à être largement diffusée car des études expérimentales et cliniques supplémentaires sont nécessaires. Les études de phase II de la FDA sont terminées (Atala et al. 2006).

Lors de la phase II de l'essai clinique mené par Joseph et ses équipes, 11 patients ont été greffés avec un support de PGA ensemencée de cellules urothéliales autologues. Les résultats de cette expérience sont médiocres, aucune amélioration clinique ou statistique n'est constatée. On note des ruptures vésicales et des obstructions intestinales qui sont des effets indésirables dangereux nécessitant une intervention chirurgicale d'urgence. L'échec de cette étude clinique pourrait s'expliquer par l'état pathologique de la vessie qui offrait des cellules de mauvais état à ensemercer sur des supports. Pour l'instant, on ne peut pas envisager l'utilisation de la vessie artificielle qui est encore loin de remplacer l'utilisation classique du tissu gastro-intestinal pour la cystoplastie d'augmentation (Joseph et al. 2014).

Il est nécessaire de réaliser une étude avec suivi à long terme et caractérisé par la comparaison avec un groupe témoin traité avec le traitement de référence (tissus gastro-intestinaux). Tous ces paramètres doivent être pris en compte et ils sont fondamentaux pour trouver les procédures optimales de régénération de la vessie avant d'envisager l'application clinique (Sloff et al. 2014).

Conclusion

La vessie issue de l'ingénierie tissulaire est une alternative prometteuse aux approches traditionnelles mais aucun avantage important n'est apparu en comparant plusieurs biomatériaux introduits dans des études expérimentales.

Outre l'importance de la standardisation des études précliniques, un intérêt accru est réservé à l'obtention de cellules souches adéquates pour les organes issus du génie tissulaire urologique. À cet égard, Bharadwaj et ses collaborateurs ont obtenu des cellules souches à partir d'urine excrétée et les ont différenciées en phénotypes de muscles lisses et d'urothélium vésical, ce qui montre une perspective future potentielle pour les soins urologiques (Bharadwaj et al. 2013).

b. Appareil respiratoire : trachée

Le succès d'une trachée issue de la médecine régénérative n'est déterminé que par sa capacité à conduire l'air tout au long de la vie, devenant ainsi un conduit biologique durable. De nombreuses tentatives ont été faites pour créer une trachée artificielle, mais aucune ne s'est avérée supérieure.

En mars 2010, au Great Ormond Street Hospital de Londres, une trachée artificielle à base de CSM issues de la moelle osseuse a été implantée à un enfant de 12 ans, né avec une sténose trachéale congénitale du segment long et une écharpe pulmonaire. Après une brève stimulation par le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ont été prélevées en préopératoire et ensemencées sur un support avec des plaques d'épithélium autologue. L'érythropoïétine humaine recombinante (EPO) a été appliquée de manière topique pour stimuler

l'angiogenèse, ainsi que le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) pour soutenir la chondrogenèse. Le greffon s'est revascularisé dans la semaine qui a suivi l'implantation. La restauration de l'épithélium est devenue évidente au bout d'un an, alors que le greffon n'a pas eu de force biomécanique focale avant 18 mois, sans nécessiter d'intervention médicale. De plus, 18 mois après l'opération, il a été réalisé un scanner de la poitrine et un scanner de ventilation-perfusion, qui ont donné des résultats normaux. Au bout de deux ans de suivi, le patient avait des voies respiratoires fonctionnelles et est retourné à l'école, après avoir grandi de 11 cm (Elliott et al. 2012).

La trachée est un organe particulier car elle n'a pas de fonction physiologique spécifique. Son rôle est de conduire l'air inspiré et expiré. On peut donc associer ce succès clinique à la simplicité de structure de la trachée. Il est difficile de retrouver un organe similaire au sein du corps humain.

c. Appareil circulatoire : vaisseaux

Les vaisseaux sanguins sont une des clefs du succès des stratégies de médecine régénérative et de l'ingénierie des organes. Les vaisseaux ont été le siège de nombreuses études d'ingénierie tissulaire et de produits utilisés quotidiennement pour les lésions vasculaires. Plusieurs techniques de reconstruction des vaisseaux ont été étudiées cliniquement :

- **La construction de greffons vasculaires vivants fonctionnels *in vitro*** avec des cellules, supports et bioréacteurs. Les vaisseaux sanguins artificiels sont très bien développés grâce aux bioréacteurs. Ce sont des dispositifs capables de reproduire des stimuli biochimiques et biophysiques comme dans des conditions physiologiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les bioréacteurs pulsatiles contrôlés par ordinateur sont plus performants car on peut paramétrer la pression et le pouls sur une large gamme de fréquences (L. Song et al. 2012).

- **Les greffes à base de matériaux xenogéniques ou synthétiques** ont été largement utilisées mais il y a un manque de potentiel de croissance (incontournable chez les patients pédiatriques) et un risque accru de sténose, d'infection et de thrombo-embolisation.

- **Les greffes autologues** : les supports biodégradables sontensemencés avec des cellules autologues. C'est la stratégie de choix. Elle permet de limiter les réactions immunitaires associées à une dégradation du support, laissant un nouveau tissu au lieu d'un corps étranger. Plusieurs études confirment la bonne tolérance et efficacité des greffes autologues :

→ **Remplacement d'une artère pulmonaire sténosée** : on utilise un support tubulaire biodégradable composé de PCL-PLA et renforcé avec du PGA tissé etensemencé de cellules endothéliales. Les cellules ont été obtenues à partir des cellules souches du patient par le biais d'un échantillon de sang. L'autogreffe vasculaire tissulaire (TEVA) a ensuite été placée dans un système de bioréacteur pour l'acclimater aux conditions du corps jusqu'à l'implantation. Ni occlusion ni anévrisme de TEVA n'ont été observés chez le receveur 7 mois après l'implantation. Suite au succès de l'approche de Shin'oka, 25 connexions extracardiaques cavopulmonaires avec TEVA comme conduit ont été réalisées sur des patients pédiatriques d'un âge moyen de 5,5 ans. Le suivi à long terme, 4 ans après l'implantation, n'a révélé aucun cas de mortalité liée au greffon, ni de formation d'anévrisme, de rupture du greffon ou de calcification. Seuls deux décès ont été signalés à la suite d'une insuffisance cardiaque tardive. Ce premier essai clinique sur l'homme a confirmé l'efficacité de TEVA et l'absence d'événements indésirables, tels que la rupture du greffon ou la modification de l'anévrisme (Matsumura et al. 2003; Shin'oka, Imai, et Ikada 2001).

→ **Greffon vasculaire murin** de petit diamètre (< 6 mm) issu du génie tissulaire. Ce procédé est difficile car des thromboses et des occlusions surviennent (Kurobe et al. 2012; 2015).

Malgré les résultats cliniques prometteurs obtenus avec des vaisseaux de grand diamètre, il reste des problèmes importants à résoudre, du choix du matériau, de la géométrie et de la composition du support, qui devraient être normalisés, à la définition d'un processus précis de processus aseptiques, de préservation et de transport des greffons.

Récemment, l'attention s'est déplacée vers les vaisseaux sanguins sans support réalisés par la technologie de bioimpression. C'est un dispositif d'impression contrôlé par ordinateur pour déposer des agrégats cellulaires, des cellules et des biomatériaux ou des cellules encapsulées dans des hydrogels dans des géométries 3D définies. Dans ce cas, des vaisseaux sanguins de différents diamètres et des motifs cellulaires ont été imprimés en utilisant des systèmes multicellulaires sphériques et cylindriques comme bioimpression. Comme la méthode de fabrication s'est avérée précise, fiable et évolutive, des études supplémentaires sont maintenant nécessaires pour tirer parti des avantages de la bioimpression afin d'obtenir des vaisseaux sanguins implantables reproductibles dans un avenir proche (Shafiee et Atala 2016; Colombo et al. 2017). L'appareil vasculaire est un point clef du développement de médecine régénérative, sans lui les tissus ne sont pas intégrés à la physiologie et ne peuvent pas se développer (pas d'interaction, pas de croissance, pas de survie des cellules...).

d. Appareil visuel : la cornée

L'œil est facile d'accès pour les évaluations avant traitement et les collections de cellules. C'est un organe immunoprivilégié composé de plusieurs tissus différents eux-mêmes contenant des types cellulaires différents.

Les reconstructions artificielles sont à un stade différent de la recherche :

- La **cornée** est l'organe qui suscite le plus grand intérêt, cela est dû à l'altération de la fonction de vision suite à sa cicatrisation lors d'un traumatisme ou d'une inflammation. La greffe de la cornée, principale thérapie pour la cécité cornéenne, n'est pas accessible à de nombreuses personnes concernées. On peut agir sur les différentes couches de la cornée : l'épithélium, l'endothélium et le stroma.

Les solutions thérapeutiques sont :

→ **Greffe de cornées cadavériques** : la greffe de la cornée est la chirurgie la plus fréquemment utilisée pour ces malades, le taux de réussite étant très élevé.

→ **Kératoprothèse (KPros)** : une cornée artificielle que l'on greffe chez des patients atteints de maladies sévères de la cornée. Lorsque la greffe de cornée est impossible et/ou n'apportera aucun bénéfice à long terme, l'implantation de la kératoprothèse peut désormais s'avérer une solution alternative chez les patients atteints plus sévèrement, ou présentant des pathologies plus complexes et plus difficiles à traiter.

La kératoprothèse a reçu l'approbation de la FDA en 1992, mais ce n'est que depuis les 7 dernières années qu'on en a vu une utilisation plus marquée aux États-Unis (Avadhanam, Smith, et Liu 2015).

→ **Implantation de support** transparent composé d'un gel de gélatine mince fonctionnalisés à l'héparine contenant le transfert de cellules endothéliales cornéennes humaines. Cette construction artificielle a été implantée et progressivement intégrée aux tissus environnants dans un modèle de lapin (Niu et al. 2014).

→ **Implantation de cellules souches** : provenant de multiples sources puis sont isolées, développées, et différenciées. On peut les utiliser comme cellules cornéennes fonctionnelles *in vivo*. Dans un modèle murin, les cellules souches cornéennes adultes greffées permettent de rendre la cornée génétiquement trouble, transparente (Du et al. 2009). Pour des rats dont la cornée a été brûlée par un alcalin, l'implantation de cellules souches mésenchymateuses permet d'améliorer et d'accélérer la cicatrisation des plaies de la cornée (Yao et al. 2012).

→ **Constructions stromales auto-assemblées** sont prometteuses pour les applications de la médecine régénérative mais présentent cependant des limites importantes. Les cellules allogéniques peuvent être problématiques dans les applications cliniques, de sorte que les autogreffes dérivées par le patient sont plus susceptibles d'être préférées. Cela pose des limites chirurgicales importantes, car les patients devront subir une intervention chirurgicale pour isoler le tissu du donneur et attendre ensuite une période importante pour la fabrication d'un implant (Simpson et al. 2019).

→ **Composites cellules et biomatériaux** : on utilise des cellules souches alliées à du collagène ou des fibres de soie ou de la fibroïne de soie (Simpson et al. 2019).

→ **Implants composites contenant une fonction bioactive** : la vision peut être altérée par des infections, il est donc intéressant d'utiliser l'implant comme vecteur d'antibiotique par exemple. Cela permet de traiter la perte de vision et la cause de celle-ci (Simpson et al. 2019).

→ Supports de pré régénération basés sur la MEC ont été proposés comme alternatives au stroma cornéen, composés en grande partie collagène. Ce sont des **MEC décellularisés humaines et xenogéniques** (de la cornée de porc aux écailles de poisson) aux matrices fabriquées à partir de collagène humain et animal extrait, de RHC, ou d'analogues peptidiques courts de protéines de matrice. Elles peuvent exister sous forme d'implants (Simpson et al. 2019).

→ **Holoclar®** (9 000 à 316 000 cellules/cm²) est un médicament de thérapie innovante issu de l'ingénierie tissulaire à base de cellules souches limbiques autologues amplifiées pour la restauration de la couche externe de la cornée endommagée par des blessures chimiques ou physiques. Ce médicament a été mis sur le marché et approuvé par la Commission européenne en 2017. HOLOCLAR a l'AMM dans le traitement, chez l'adulte, de la déficience en cellules souches limbiques modérée à sévère (définie par la présence d'une néovascularisation cornéenne superficielle dans au moins deux quadrants de la cornée, avec atteinte de la cornée centrale et une acuité visuelle sévèrement altérée), unilatérale ou bilatérale, causée par des brûlures oculaires chimiques ou physiques. Un minimum de 1 à 2 mm² de limbe non endommagée est nécessaire pour la biopsie. La thérapie est basée sur la biopsie d'une minuscule portion (min 1-2 mm²) de limbe non endommagée et sa croissance en laboratoire à l'aide de techniques spécifiques. Le limbe est situé entre la sclérotique, la partie blanche de l'œil, et la cornée, la partie antérieure de l'œil, et il est riche en cellules souches capables de guérir la cornée endommagée. Grâce à ce système, une nouvelle feuille de cornée peut être développée et greffée à nouveau sur l'œil. La combinaison de l'Holoclar® et des greffes de cornée peut restaurer une cornée normale pour des brûlures profondes de la cornée auparavant incurable, les atteintes de la cornée centrale et les acuités visuelles sévèrement altérées (Haute Autorité de Santé 2016).

- La **rétine** est affectée dans de nombreuses pathologies ophtalmiques : la rétinite pigmentaire, la rétinopathie diabétique et la DMLA. C'est la première cause de perte d'acuité chez les personnes âgées. La DMLA est une maladie multifactorielle qui entraîne la dégénérescence de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) ce qui provoque la lésion de la macula donc l'altération de la vision. La thérapie traditionnelle consiste en des médicaments capables d'arrêter la néovascularisation, mais pas de réparer les dommages précédents.

→ **Utilisation des iPS et de CSE pour régénérer les EPR** (M. J. Song et Bharti 2016). Nous avons vu précédemment, l'étude japonais du centre RIKEN qui a utilisé des IPS pour la DMLA atrophique sans qu'aucun événement majeur ne vienne perturber l'essai clinique.

→ **Greffe de suspension de cellules EPR humaines dérivées des CSE** : deux essais cliniques de phase I/II chez 18 patients souffrant de la maladie de Stargardt ou de DMLA. Aucun événement indésirable majeur et aucune réponse immunitaire n'ont été observés chez les patients sur une période moyenne de 22 mois (S. D. Schwartz et al. 2015).

D'un point de vue réglementaire, les implants régénératifs et les greffes de cornée et de rétine sont principalement classés comme des dispositifs médicaux ou des MTI. Le type d'implant le plus simple à fabriquer est un support entièrement synthétique, en particulier un support thermostable qui peut être stérilisé par irradiation gamma ou par faisceaux d'électrons. Ces supports ne sont pas soumis aux règles concernant les xéno greffes. Les supports dérivés d'animaux, soit par décellularisation soit par isolement de protéines structurelles, nécessitent davantage de tests pour se conformer aux exigences visant à prévenir la transmission d'agents pathogènes.

Il existe une grande variété de solutions pour régénérer la cornée. Plus récemment, la bioimpression 3D a été utilisée pour imprimer des stromas cornéens complets avec des cellules. Des progrès ont été réalisés dans les thérapies cellulaires, les supports basés sur la MEC, les nanomatériaux et les combinaisons de progrès dans les cellules et les biomatériaux. Le défi que représente le remplacement des cornées de donneurs humains et des KPros comme norme de soins actuelle reste complexe. Les progrès des thérapies cellulaires ont considérablement amélioré l'efficacité probable des autogreffes de cornée, et les biomatériaux ont améliorés

les propriétés structurelles des supports de MEC. Cependant, aucune thérapie n'est apparue comme une solution stable et abordable pour les nombreuses causes de dommages cornéens. Il est possible qu'à l'avenir, les supports en biomatériaux soient combinés à des techniques chirurgicales telles que la greffe épithéliale limbique ou des solutions de culture cellulaire afin de personnaliser les supports disponibles dans le commerce pour une médecine personnalisée. La nano médecine ouvre également la porte à la possibilité d'incorporer des thérapies pour les infections oculaires directement dans les solutions chirurgicales, ce qui pourrait accélérer la récupération postopératoire et prévenir la récurrence d'infections latentes chez les patients atteints de cécité cornéenne causée par des infections telles que le HSV (Simpson et al. 2019).

e. Appareil rénal : rein

Les maladies rénales sont l'une des principales causes de décès dans le monde, et l'insuffisance chronique touche **12% de la population mondiale**. Nous nous intéressons au rein plus particulièrement car c'est le premier organe à être transplanté avec succès et constitue l'une des opérations de transplantation les plus courantes et les plus efficaces pratiquées dans le monde. Pourtant la pénurie de donneurs s'est révélée être un obstacle majeur au traitement des maladies rénales, laissant des millions de patients atteints de maladies rénales chroniques sans remplacement fonctionnel total. En France en 2018, le nombre total de candidats à une greffe a atteint 19 625 et 3 567 greffes rénales ont été réalisées en France. Le coût de l'insuffisance rénale terminale s'élève à **4 milliards d'euros en France**, et ce chiffre ne fait qu'augmenter avec le vieillissement, l'augmentation de la population, et les diagnostics plus précoces.

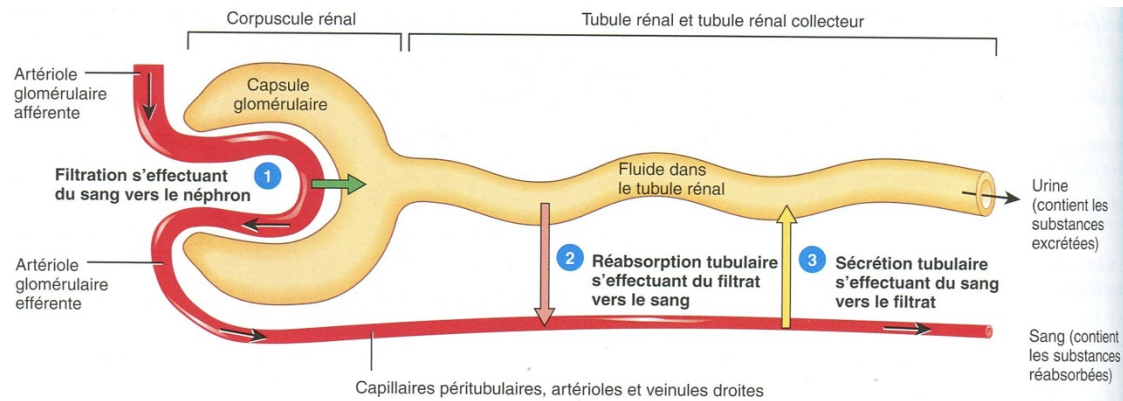
Trois traitements existent : la **greffe**, l'**hémodialyse** et la **dialyse péritonéale** et sont pris en charge à 100% par l'assurance maladie. La transplantation mobilise des équipes spécialisées et un suivi intensif la première année (86 000 euros l'année de la greffe, et 20 000 euros les années suivantes) mais c'est le seul traitement définitif de l'insuffisance rénale chronique. L'hémodialyse nécessite des séances trois fois par semaine avec des équipes de soignants et un équipement technique pointu et coûteux (89 000 euros par an). La dialyse péritonéale nécessite un suivi minutieux et cher (64 000 euros). En 2018, 89 692 patients étaient traités (45 % étaient porteurs d'un greffon rénal, 51 % étaient en hémodialyse et 4% en dialyse péritonéale) (Agence de la biomédecine 2018).

L'objectif des équipes est d'améliorer la qualité des soins et réduire l'impact économique : des économies substantielles en favorisant les greffes et la dialyse péritonéale. Si l'on passait à 900 greffes par an, cela permettrait d'économiser 250 millions d'euros et d'améliorer la qualité de vie des patients. Seulement, il semblerait que l'activité de greffe serait arrivée à un plafond, dans la mesure où on a optimisé au maximum le potentiel des donneurs en état de mort encéphalique. Bien que la transplantation d'organes offre le meilleur pronostic de survie, la **demande dépasse largement la disponibilité** des dons d'organes. L'accès à la greffe se fait plus facilement chez les individus jeunes non diabétiques de type 2, avec des donneurs vivants et en utilisant greffe préemptives (c'est-à-dire avant dialyse).

Tableau XV Les différentes insuffisances rénales

Insuffisance rénale aiguë (IRA)	Insuffisance rénale chronique (IRC)	Insuffisance rénale terminale (IRT).
Perte brutale (heures, jours) de la capacité à fonctionner et à filtrer le sang efficacement	Diminution prolongée de la capacité à fonctionner et à filtrer le sang efficacement	Perte de la capacité à fonctionner et à filtrer le sang efficacement
- Si urgence : hémodialyse Sinon -Mesures de réanimation pour rétablir la perfusion rénale -Levée d'obstacle en urgence pour IRA post-rénale -Suppression du toxiques ou traitements immunosuppresseurs pour les IRA rénale.	Traitements médicamenteux pour compenser l'anémie, l'hypertension artérielle, l'hyperuricémie, l'hypocalcémie et l'hyperphosphorémie	Épuration extra-rénale ou la transplantation rénale

Figure 33 Anatomie Rénale coupe transversale (France Rein s. d.)



Anatomie et fonctions du rein :

Le rein adulte contient plus de 20 types de cellules hétérogènes réparties entre les différents compartiments, y compris les structures vasculaires, interstitielles, glomérulaires et tubulaires à l'architecture complexe. La fonction rénale répond au système nerveux autonome, elle est sensible aux médiateurs hormonaux. C'est un organe composé de 1,2 millions de néphrons qui assurent les fonctions d'**excrétion** et d'**épuration**. Grâce aux échanges entre les capillaires et les glomérules, les tubules, les tubes contournés proximaux et distaux. Le procédé d'excrétion du rein se déroule en trois étapes : la filtration glomérulaire (repose sur les différences de pressions) suivie de la réabsorption tubulaire et pour finir la sécrétion tubulaire.

Phénomènes responsables du maintien de l'homéostasie par le rein :

- filtration du sang provenant de l'artère rénale
- régulation du gradient ionique
- régulation de l'équilibre hydrique
- régulation de l'équilibre acido-basique dans le sang
- régulation endocrinienne, enzymatiques et vitaminiques :
- Maintien de l'hémodynamique : la rénine par l'intermédiaire de l'angiotensine agit sur la pression artérielle
- Production des globules rouges par l'intermédiaire de l'érythropoïétine
- Production de calcitriol, forme active de la vitamine D3 au sein de l'organisme
- Synthèse d'enzymes ayant un rôle dans le métabolisme du GSH, la captation des radicaux libres, et la néoglucogenèse.
- Catabolisme des facteurs de croissances, cytokines et hormones peptidiques de faible poids moléculaires.
- Immunomodulation par les cellules des tubules proximaux qui sont présentatrices d'antigènes et contiennent des molécules stimulatrices des voies de synthèse des cytokines.

Dans des situations pathologiques liées à une **insuffisance rénale**, on retrouve une nécrose tubulaire aigues donc une **perte de la fonction d'immunorégulation**. La fonction immunomodulatrice des reins a longtemps été négligée, pourtant c'est cette perte d'immunorégulation qui provoque un syndrome de réponse inflammatoire systémique, le dysfonctionnement de multiples organes et des septicémies. Les thérapies de compensation de la fonction rénale ne sont pas à ce jour capables de maintenir les fonctions endocriniennes et immunologiques nécessaires au maintien de la fonction des reins et son intégration dans le corps humain.

Les thérapies extracorporelles visant à remplacer au moins partiellement la fonction rénale comprennent l'hémodialyse, l'hémofiltration (HF), l'hémodiafiltration (HDF) et la DP. Ces traitements utilisent des membranes semi-perméables artificielles ou naturelles dans des circuits extracorporels pour remplacer la fonction de filtration sanguine du rein en éliminant les déchets et les électrolytes en excès par des. Le problème de ces thérapies réside dans les complications rencontrées comme la surcharge volumique, l'acidose, l'urémie élevée. Les thérapies conventionnelles assurent le rôle de filtration ce qui permet de gérer les symptômes et retarder la progression de la maladie mais ne parviennent pas à assurer les fonctions endocriniennes perdues du rein, et donc les rôles métaboliques, endocriniens et immunologiques du rein fonctionnel sont des mécanismes potentiels de la différence de survie des patients qui reçoivent une greffe de rein.

Tableau XVI Thérapies de compensation de la fonction rénale

	Hémodialyse	Hémofiltration	Hémodiafiltration Hémodialyse + hémofiltration	Dialyse péritonéale
Transport	Diffusion : transfert moléculaire de solutés par gradient de concentration	Convection : épuration du sang en eau plasmatique et diverses molécules selon un gradient de pression hydrostatique	Diffusion + Convection	3 à 4 cycles par jour 1) Remplissage de la cavité péritonéale avec le dialysat 2) Échange pendant une durée déterminée 3) vidange
Membrane	Semi perméable Intermittente	Semi perméable Continue	Semi perméable Continue ou intermittente	Péritoine Continue
Liquide de substitution	Non	Oui	Oui	
Réinjection	Non		Oui	
Transfert volumique	Faible 2 à 3 litres par séance			
Avantages	Facile Ancienne Efficace pour les petites molécules (300 < Da < 550)	Bonne performance pour les moyennes et grosses molécules (< 50 kDa) Bonne stabilité hémodynamique		
Inconvénients	Mauvaise performance pour les moyennes et grosses molécules (< 50 kDas)	Si faible débit d'ultrafiltration à faible efficacité pour les petites molécules		
Cout par an	89 k€	89 k€	94 k€	64 k€

Nous allons décrire les sources cellulaires utilisées pour les thérapies cellulaires et les applications associées pour traiter les maladies rénales ainsi que plusieurs approches de l'ingénierie des constructions rénales afin de restaurer et régénérer le rein *in situ*. En effet, en dehors du rôle de filtration, le rein est multifonctionnel et les thérapies de remplacement de la fonction rénale à l'heure actuelle ne sont pas capables de remplacer les autres fonctionnalités du rein natif.

Pour résoudre ce problème, des approches d'ingénierie tissulaire et de médecine régénérative ont été proposées comme solutions prometteuses. La biologie des cellules souches et les technologies de culture cellulaire ont permis aux chercheurs d'identifier et de caractériser les cellules dérivées du rein et divers types de cellules qui pourraient être utilisées pour traiter les maladies rénales. L'approche la plus simple utilise la greffe de cellules, dans laquelle des cellules thérapeutiques uniques peuvent être administrées à un patient souffrant d'insuffisance rénale pour restaurer la fonction rénale. Comme cette approche est plus facile à administrer et moins invasive que d'autres alternatives, la plupart des études ont été réalisées en utilisant des stratégies de thérapie cellulaire. Avec l'ingénierie tissulaire on essaie d'élaborer des structures rénales 3D intégrables chez le patient

Une stratégie consiste à utiliser des cellules endogènes et tirer parti des mécanismes de guérison de l'organisme et des cellules rénales endogènes afin de régénérer la fonction rénale.

Thérapies issues de la bioingénierie tissulaire :

Afin de pallier ces lacunes un dispositif de remplacement rénal a été développé ayant pour objectif de **remplacer les fonctions endocriniennes et métaboliques** du rein.

Le **dispositif d'assistance rénale (DAR)** (Nikolovski, Gulari, et Humes 1999): contient des cellules vivantes supportées physiquement par des supports synthétiques non dégradables. Onensemence des progéniteurs des tubules rénaux sur une membrane poreuse en fibres creuses de polysulfone à laquelle on ajoute un feuillet de MEC afin de faciliter la croissance des cellules épithéliales. La membrane poreuse n'a pas qu'un rôle de soutien physique des cellules, elle assure la nutrition des cellules, empêche l'attaque des cellulesensemencées par le système immunitaire du patient et empêche les réactions immunologiques chez les patients le temps de la performance. Le DAR permet de reconstituer les fonctions de transport (présence de microvillosités apicales, vésicules endocytaires et jonctions serrées) métabolique et de sécrétions (synthèse et excrétion d'ammoniaque, synthèse de la vitamine D3, excrétion de la GSH) (H. D. Humes et al. 1996).

Des études sur les chiens utilisant un système d'hémofiltration ainsi qu'un DAR, ont démontré le remplacement des fonctions de filtration, transport, métaboliques, et endocrinologiques du rein (H. David Humes et al. 1999; H. D. Humes et al. 1999; H. David Humes et al. 2002).

L'impact du DAR cellulaire sur un modèle porcin ayant des lésions rénales aiguës dues à une septicémie : cellulaire les niveaux de cytokines sériques IL-6 et d'INF-gamma sont significativement plus bas. Bien qu'on connaisse la corrélation entre IR et mauvais états des patients, et des défauts de l'immunité humorales et cellulaire dans le cadre d'IRC, l'étude nous montre que la mortalité est liée à une bio activité du rein et non pas juste de la baisse de clairance (Fissell et al. 2002; 2003).

Humes et ses équipes, ont testé un **modèle de rein bio artificiel** dans une cohorte de 10 patients souffrant d'IRA et de défaillances de multiples organes et étant en hémofiltration continue en soins intensifs. Les résultats démontrent la sécurité du DAR pendant 24 heures, l'augmentation de la fonction rénale (débit urinaire élevé corrélé au temps de traitement) et le maintien de fonction cardiovasculaire. Les taux de mortalité hospitalière prévus sont entre 80 et 95 %, au sein de cette étude il est réduit à 40%. Les cellules du DAR avaient une activité endocrinienne (conversion de vitamine D de sa forme inactive à celle active) et métabolique (dégradation du GSH) différenciées ex vivo (H. David Humes et al. 2003).

Lors des essais de phase I/II, les réponses en termes de cytokines sériques sont patient et physiopathologie dépendants. Chez les patients avec un profil pro-inflammatoire élevé, le DAR a permis une diminution de G-CSF, de l'IL-6, de l'IL-10 et du rapport IL-6/IL-10 ce qui marque la diminution de l'inflammation.

Aux USA, un essai clinique randomisé, ouvert et contrôlé de phase II a été mené chez 58 patients atteints de lésions rénales sévères nécessitant une hémofiltration en continue. 40 patients ont reçu le DAR pendant 72 heures et l'hémofiltration continue et 18 uniquement l'hémofiltration continue. Le profil de sécurité du DAR a été jugé comme acceptable et considérablement amélioré le taux de survie à j180 par rapport au groupe témoin (H. David Humes et al. 2003).

Un essai de phase IIb visant à évaluer la viabilité d'un processus de fabrication commerciale n'a pas pu s'effectuer car :

- on ne dispose pas d'une source fiable de cellules permettant de produire le DAR à grande échelle
- aucun processus rentable de stockage et de distribution n'a pu être déterminé

Actuellement, deux innovations vont permettre de résoudre les problématiques qui ont empêchés le bon déroulement de la phase IIb de cet essai clinique. L'approvisionnement peut se faire avec la méthode de propagation améliorée permettant d'étendre les cellules progénitrices épithéliales rénales. Les donneurs sont nombreux même parmi les profils de santé sous optimaux. Les rendements cellulaires sont constamment supérieurs à mille cellules par gramme de cortex, ce qui permet de fabriquer plus de 100 000 dispositifs par rein de donneur. Une possibilité de thérapie autologue pourrait se faire très facilement, en effet plus de 1,8 10¹⁰ cellules progénitrices/cortex g ont été isolées du seul rein testé dans le cadre de l'insuffisance rénale terminale. En prélevant dès le démarrage de l'IRC 0,1 gramme de cortex on pourrait fabriquer 18 dispositifs qui conserveraient la fonction métabolique même après Cryo préservation (Westover, Buffington, et Humes 2012).

Un système "prêt à l'emploi" doit être créé pour répondre aux situations d'urgence et aiguës. C'est le cas du **système bio artificiel de cellules épithéliales rénales (SRBCE)** qui est le premier récipient de culture cellulaire tout-en-un qui peut être cryopréservé et fonctionner comme un dispositif de cryostockage et un système d'administration de thérapie cellulaire pour traduire cliniquement des produits issus de l'ingénierie tissulaire (Fahy, Wowk, et Wu 2006; Buffington et al. 2012). Ce système peut supporter une densité de cellules très élevée et la cryopréservation permet de lever la contrainte de distribution. Des disques de carbone recouverts de niobium qui sont inertes biologiquement, pas dégradables et thermomécaniques favorables à la cryoconservation sont utilisés comme supports. La taille des disques permet d'avoir un nombre suffisant de cellules et des milieux de culture cellulaire contenant de l'oxygène et des nutriments ont été perfusés à travers et autour des disques poreux. L'oxygène et les nutriments peuvent diffuser de façon homogène Grâce à la porosité des disques qui est de l'ordre de 80%. L'intégralité des éléments du dispositif a été sélectionné pour assurer la sécurité, la viabilité cellulaire, l'activité métabolique et l'efficacité thérapeutique. Ce dispositif a démontré une distribution uniforme du flux pendant la perfusion *in vitro* et tous les composants du dispositif sont restés intacts, sans indication de dégradation sur une période de 6

mois (Pino et Humes 2019). On peut fabriquer des dispositifs en série Grâce aux technologies de moulage par injection et stéréolithographie (Pino et al. 2017). On retrouve toutes les propriétés du DAR sauf celui du transport moléculaire, cela est dû à la différence de matériau.

Le DAR a un effet immunomodulateur, il influence l'activation systémique des leucocytes et l'équilibre des cytokines inflammatoires et peut modifier l'état pro-inflammatoire de l'IRA afin d'améliorer la morbidité et la mortalité. Les concentrations de cytokines pro inflammatoires INF gamma et IL-6 baisse avec l'utilisation du DAR. L'IL-10 a un rôle partiellement connu pour la régulation de la réponse immunitaire, elle aurait un rôle anti-inflammatoire dans le choc endotoxique et la septicémie gram négative :

→ Administration d'IL-10 recombinante protège contre le choc septique (Matsumoto et al. 1998)

→ Administration d'anticorps anti IL-10 augmente la mortalité (Marchant et al. 1994)

Même si le mécanisme reliant le taux d'IL-10 et la fonction tubulaire sont à déterminer, l'IL-10 hépatique serait produite en réponse la sécrétion rénale d'IL-6 (Kielar, Rohan Jeyarajah, et Lu 2002).

L'essai clinique I/II utilisant le DAR contenant des cellules tubulaires rénales prouvent leur rôle immunomodulateur :

-patients présentant un taux élevé de cytokines sériques, la thérapie avec le DAR a permis de réduire considérablement les taux de G-CSF, d'IL-6, d'IL-10 de IL-6/IL-10. Le DAR permet de rééquilibrer la réponse pro-inflammatoire excessive avec la réponse anti-inflammatoire concomitante (H. David Humes et al. 2004)

-patients traités par le DAR présentent un taux de cytokines du liquide de lavage bronchique très diminués par rapport au groupe témoin

Les cellules tubulaires rénales ont donc un rôle dans l'amélioration de plusieurs organes en cas de sepsis en influençant les lésions micro vasculaires et la réponse pro-inflammatoire locale.

Lors d'IRA, l'activation des leucocytes joue un rôle central dans le processus de dysfonctionnement micro vasculaire dans les organes distants. En limitant leur activation le DAR permet d'éviter les lésions micro vasculaires (Maroszyńska et Fiedor 2000).

Il est possible d'imaginer un **rein artificiel transportable pour l'insuffisance rénale terminale**, il est nécessaire que ce dispositif soit durable et sécurisé. **WeBAK** est un rein portable en cours de développement, basant sa technologie sur les sorbents⁸ pour régénérer le dialysat péritonéal, qui est perfusé à travers le SRBCE afin de maintenir les cellules dans le dispositif de thérapie cellulaire. Le dialysat sert de source d'O₂ et de nutriments pour les cellules du SRBCE. Dans une étude préclinique chez l'ovine, la viabilité des cellules et la fonction métabolique ont été maintenues pendant 7 jours. Cette technologie a beaucoup de potentiel, et doit être testée cliniquement (Johnston et al. 2017). Il faut encore évaluer la durabilité cellulaire, la biocompatibilité et les protocoles d'administration de ces dispositifs.

Bien que le DAR couplé à l'hémodiafiltration soit un procédé permettant d'améliorer l'état des patients, cela ne reste pas pratique pour les patients. Il faudrait un rein bio artificiel adapté à une utilisation à long terme capable de fonctionner en continu, comme le rein natif, pour réduire les risques liés aux fluctuations de volume, aux électrolytes et aux concentrations de solutés et maintenir la régulation des toxines acido-basiques et urémiques. Un tel traitement nécessite la conception et la fabrication d'un appareil de dialyse compact, implantable ou portable, et le développement de dispositifs miniaturisés de cellules tubulaires rénales ayant une longue durée de vie.

Des dispositifs de dialyse portables ont été développés pour améliorer la qualité de vie des patients mais ils sont coûteux et les dialysats ne sont pas pratiques.

L'idéal serait un rein hybride bio artificiel intègre des fonctions de filtration et de cellules tubulaires, un bioréacteur de cellules tubulaires rénales démontre un bon profil de sécurité et d'efficacité dans les modèles animaux. Cependant ce sont des systèmes de grande taille. Il faudrait optimiser la fonction de filtration afin de miniaturiser les reins artificiels, de se passer de dialysat, de mettre en place des systèmes complexes qui interagissent avec tous les paramètres en continu.

est généralement une substance solide qui adsorbe ou absorbe un autre type de substance

Médecine régénérative rénale : approche avec cellules

Afin de rétablir la fonction rénale on peut considérer la greffe de cellules ou reins artificiels, Plusieurs types cellulaires peuvent être utilisés :

- cellules progénitrices de la capsule de Bowman
- cellules souches ou progéniteurs des papilles rénales
- cellules souches ou progéniteurs des tubules rénaux
- cellules rénales primaire
- cellules souches embryonnaires
- iPS
- cellules dérivées des cellules souches dépositaires
- cellules souches mésenchymateuses

Les 20 types cellulaires composant le rein forment une population mixte de cellules qui maintient l'homéostasie dans le microenvironnement rénal qui soutient les interactions entre les cellules. La perturbation de l'homéostasie rénale se produit après une blessure ou en cas de maladie, ce qui provoque la libération de signaux cellulaires et moléculaires pour interagir avec les composants cellulaires afin de faciliter la régénération et la réparation du rein endommagé. Les régulateurs extrinsèques dans la niche rénale initient la différenciation et l'auto-renouvellement de diverses cellules rénales et cellules souches (Ko, Yoo, et Atala 2019).

Cellules progénitrices de la capsule de Bowman

Plusieurs expériences démontrent et caractérisent une population de progéniteurs multipotents au sein des glomérules humain, cela ouvre de nouvelles portes pour médecine régénérative :

Expérience 1 (Bussolati et al. 2005): Les cellules CD133+ provenant d'un rein humain adulte normal, n'ont pas l'expression de marqueurs hématopoïétiques et expriment le PAX-2, un marqueur rénal embryonnaire, ce qui suggère leur origine rénale. Elles ont des capacités d'expansion et d'auto-renouvellement limitées et se différencient *in vitro* en cellules épithéliales ou endothéliales. Dans un modèle de souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère si :

- Les cellules injectées en sous cutanée :
 - Sous forme indifférenciées, les cellules ont formé des tubules avec l'expression de marqueurs épithéliaux rénaux
 - Sous forme différenciées, les cellules ont formé des vaisseaux fonctionnels
 - Les cellules injectées en intraveineuse ; se fixent au niveau de la lésion et s'intègrent dans les tubules
- Ainsi il semblerait que les cellules CD133+ du rein représentent une population de cellules souches adultes résidentes multipotentes qui peuvent contribuer à la réparation des lésions rénales.

Expérience 2 (Sagrinati et al. 2006): Au sein de la capsule de Bowman, il existe des cellules épithéliales pariétales qui coexpriment les marqueurs de cellules souches CD24 et CD133 et les facteurs de transcription spécifiques des cellules souches Oct-4 et Bmi-1. Il se trouve que ces cellules peuvent être auto renouvelées et clonées facilement dans des conditions de culture appropriées. En fonction du milieu et du protocole de culture on induit la transformation des cellules épithéliales pariétales en :

- cellules tubulaires présentant des caractéristiques phénotypiques de tubules proximaux et/ou distaux
- cellules ostéogéniques
- adipocytes
- cellules présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules neuronales

L'injection de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) CD24+CD133+ dans un modèle murin présentant un déficit immunitaire combiné sévère :

- Restaure des structures tubulaires de différentes parties du néphron
- Améliore les dommages morphologiques et fonctionnels des reins

Expérience 3 (Ronconi et al. 2009): lors de la sclérose des glomérules on observe une déplétion des podocytes. Les PEC CD24+CD133+ présentant des marqueurs progéniteurs ont un potentiel hétérogène de différenciation et régénération :

- Cellules CD133+CD24+PDX- situé au pôle urinaire régènèrent :

→ Cellules tubulaires

→ Podocytes

- Cellules CD133+CD24+PDX+ situé entre les pôles urinaire et vasculaire régénèrent

→ Podocytes uniquement, elles pourraient ainsi traiter les lésions podocytaires, la protéinurie et les lésions glomérulaires.

Les cellules situées au niveau du pôle vasculaire ont un phénotype de podocytes différenciées mais ne présentent pas de marqueurs typiques des progéniteurs.

Cellules souches ou progéniteurs des papilles rénales

La papille rénale est une niche pour les cellules souches rénales adultes qui peuvent se différencier en cellules ayant des phénotypes mésenchymateux, neuronaux et épithéliaux (Oliver et al. 2004). *In situ*, on a trouvé des cellules nestin(+), CD133/1(+) et plusieurs marqueurs de cellules souches embryonnaires humaines (SSEA4, Nanog, SOX2, et OCT4/POU5F1), entre les épithéliums tubulaires dans les boucles de Henle de la papille rénale, mais pas du cortex. Ces cellules peuvent adopter des phénotypes de tubules épithéliaux et de type neuronal. La papille rénale humaine abrite des cellules présentant les caractéristiques des cellules souches/progénitrices du rein adulte qui peuvent être amplifiées et modulées phénotypiquement en culture tout en conservant la capacité de former de nouveaux tubules rénaux (Ward et al. 2011).

Cellules souches ou progéniteurs des tubules rénaux

Une lésion ischémique du rein produit une nécrose tubulaire aiguë et une apoptose, suivies d'une régénération tubulaire et d'un rétablissement de la fonction rénale. Les cellules composant les tubules de régénération sont dérivées de cellules épithéliales tubulaires rénales. Lin a montré que les cellules intra rénales sont la principale source de réparation rénale, et qu'une seule injection de cellules souches de moelle épinière ne contribue pas de manière significative à la récupération fonctionnelle ou structurelle rénale (F. Lin, Moran, et Igarashi 2005). Les tubules du rein présentent une remarquable capacité d'auto-renouvellement en cas de lésion, cela est dû aux cellules des tubules proximaux PT dotées d'un phénotype plus robuste, permettant une résistance accrue aux lésions rénales aiguës, ce qui permettrait un repeuplement rapide des tubules (Lindgren et al. 2011).

Cellules rénales primaires

Les cellules épithéliales rénales CD10+ et CD13+, deux marqueurs épithéliaux des tubules rénaux proximaux, constituent une population de cellules épithéliales tubulaires proximales pures, fonctionnelles et stables qui présentent des marqueurs de tubules proximaux et des caractéristiques épithéliales sur le long terme (Van der Hauwaert et al. 2013).

Les cellules rénales humaines ont été efficacement développées en culture et ont conservé leur phénotype, leur capacité de migration et leurs fonctions d'absorption de l'albumine. La cellule rénale humaine en culture tridimensionnelle a formé des tubules différenciés au niveau proximal et distal fonctionnels et spécifiques jusqu'à 6 semaines au sein du rein. Ces résultats démontrent que les cellules rénales humaines cultivées en trois dimensions sont capables de générer des structures rénales *in vitro*. Ce système pourrait à terme être développé en une thérapie cellulaire efficace pour les patients atteints d'IRC (George et al. 2016).

Autres sources cellulaires :

Les **CSE** du rein ont été étudiées comme traitement potentiel de l'insuffisance rénale mais des dilemmes éthiques, le risque de cancer et l'immunogénicité doivent encore être résolus.

Les **iPS** présentent certains avantages en termes d'utilisation. Des études précliniques *in vitro* et certaines études précliniques *in vivo* ont démontré la possibilité d'effets thérapeutiques positifs dans le traitement des maladies rénales. Cependant, un système de culture cellulaire suffisamment sophistiqué pour la culture cellulaire de masse est encore nécessaire pour maintenir les phénotypes et prévenir la formation de tératomes et l'immunogénicité.

Les **cellules souches dérivées de tissus fœtaux et adultes** ont une capacité de croissance cellulaire inférieure et cela élimine la question de la formation éventuelle de tératomes. Des études précliniques utilisant des **cellules souches du liquide amniotique** ont démontré des résultats bénéfiques dans le traitement de l'insuffisance rénale.

Les **cellules souches mésenchymateuses** ont montré des effets thérapeutiques dans la récupération rénale. Les CSM peuvent être facilement prélevées dans la moelle osseuse (CSM-MB) et dans le tissu adipeux (CSAD). Des résultats bénéfiques pour les CSM de MO et les CSM des adipocytes dans le traitement des maladies rénales ont été signalés dans plusieurs modèles précliniques. En fonction de la typologie de la maladie rénale (aigüe ou chronique) il est préférable de choisir soit les CSM de MO, soit les CSM des adipocytes (Zhu et al. 2013). Une étude clinique montre que la greffe de CSM associée à une transplantation permet d'améliorer les résultats (Perico et al. 2011).

On va aborder les différents supports utilisables pour la reconstitution du tissu rénal, il existe trois types de systèmes de support (Ko, Yoo, et Atala 2019):

- **polymères naturels** :

→ **Collagène + vitrigel** : polymère stable et fin sur lequel onensemence les cellules glomérulaires épithéliales et mesangiales. Il fournit un microenvironnement qui imitait les structures glomérulaires natives ce qui permet la formation d'un tissu glomérulaire (P.-C. Wang et Takezawa 2005).

→ **Collagène + matrigel** : en y ensemençant une population mixte de cellules rénales de rats néonataux, celles-ci s'auto assemblent en structures tubulaires et glomérulaires (Lü et al. 2012).

→ **Gel de collagène** : en y ensemençant une population de cellules rénales humaines primaires qui conservent leurs phénotypes tubulaires distale ou proximale, on produit des structures tubulaires rénales avec leurs fonctionnalités rénales (comme l'adsorption d'albumine) pour des études *in vitro*. En greffant en sous cutanée, dans un modèle murin, les cellules de la construction rénale 3D ont conservé leurs phénotypes rénaux et sont restées viables pendant 6 semaines. On peut donc envisager que le gel de collagène soit capable de générer des architectures utilisées pour la génération rénale (Yamaleyeva et al. 2012).

→ **Matrice à base d'acide hyaluronique** : permet de développer un tissu de typologie rénale à partir de tissus de rein fœtaux. L'HA a favorisé la ramification des bourgeons urétériques, la transformation mésenchymateuse en épithélium et la différenciation du mésenchyme métanéphrique et des bourgeons urétériques (Rosines et al. 2010).

- **polymères synthétiques** : leur profil de biodégradation, leur non-toxicité et la simplicité de fabrication, permettent aux polymères synthétiques d'être utilisés comme sources de support pour les tissus rénaux. Il faut faire attention à leur dégradation qui peut provoquer des inflammations.

→ **Acide poly glycolique** : on yensemence des cellules rénales isolées des tubules proximaux et distaux et des glomérules de lapin ce qui génère des structures de type rénale. On injecte ces constructions chez les souris athymiques ce qui entraîne la prolifération des cellules et la formation de structure de type néphron (Gunatillake et Adhikari 2003).

→ **Polycarbonate** : avec des cellules murines on établit un support de forme tubulaire que l'on introduit en sous cutanée chez des souris athymiques. Des structures de type glomérulaires sont formées avec une intégration vasculaire et on conserve les structures tubulaires chez qui on retrouve phénotypes rénaux de cellules tubulaires proximales et distales et de cellules de la boucle ascendante de Henle. Les structures nouvellement formées présentaient une fonction rénale en excréant des niveaux élevés de soluté dans un liquide jaune semblable à de l'urine (James J. Yoo, Ashkar, et Atala 1996).

→ **Acide poly glycolique** : On obtient une reconstruction rénale en injectant *in vivo* les cellules rénales implantées sur des supports dérivés de polymères PGA en 3D. Ainsi des glomérules et des tubules sont formées, ce qui suggère que les structures rénales peuvent être reconstituées en greffant des segments rénaux avec des supports biodégradables de soutien (S.-S. Kim et al. 2003).

→ **Structures synthétiques dérivées de PGA** : en y ensemençant des cellules rénales dérivées de fibroblastes bovins clonés et en réalisant un transfert nucléaire on obtient des architectures très organisées à base de structures tubulaires et glomérulaires. La construction implantée a formé des structures tubulaires et glomérulaires hautement organisées qui présentaient une sécrétion de liquide urinaire provenant de l'implant.

Le transfert nucléaire permet d'obtenir des cellules histocompatibles, ce qui est une avancée majeure pour la médecine régénérative.

-matrices tissulaires biologiques

→ **Matrices de tissus acellulaires** : dont la dégradation est lente et sont remodelé à l'aide des protéines de la MEC secrétés par les cellules en croissance. Elles permettent de reproduire de l'architecture spatiale précise du rein. Par conséquent, une grande attention a été portée au développement de techniques de décellularisation rénale pour produire des supports rénaux acellulaires capables de maintenir les structures rénales natives telles que les ECM, les facteurs bioactifs et l'intégrité vasculaire. On peut recréer des structures rénales complètes (Sullivan et al. 2012).

Les supports décellularisés est une approche prometteuse qui permettrait de pallier le manque d'organes disponibles. C'est un protocole composé de décellularisation puis de recellularisation dans les plis de collagène, cette technique permet d'élaborer des organes entiers *in vitro*. Une étude d'implantation d'une construction de rein de rat issue du génie biologique a démontré la faisabilité de la technologie de génie rénal complet basée sur la décellularisation/recellularisation du tissu rénal. Dans le processus de recellularisation des matrices rénales acellulaires, des études antérieures ont utilisé des CSE et des explants de reins viables pour recréer *in vitro* des structures rénales artificielles. Bien que ces approches aient démontré la faisabilité de l'utilisation de la recellularisation d'une matrice rénale pour la bioingénierie d'un rein, le domaine de l'ingénierie des organes entiers en est encore à ses débuts ; plusieurs défis doivent être relevés avant que des applications cliniques ne soient possibles (J. J. Song et al. 2013; Ko, Yoo, et Atala 2019).

L'un de ces défis est le succès à long terme de la perméabilité vasculaire des organes bio-ingénierie *in vivo*. Sans un réensemencement endothélial complet et fonctionnel des matrices vasculaires, une thrombose importante est susceptible de se produire dans le système vasculaire acellulaire, ce qui rend la construction réticulée non fonctionnelle. Pour résoudre ce problème, une technique d'ensemencement cellulaire a été développée et elle permet de générer un revêtement efficace des cellules endothéliales des parois vasculaires des matrices acellulaires des reins de porc. Le support rénal acellulaire a été préparé à partir de reins de porc natifs en utilisant notre technique de décellularisation décrite par Sullivan. La conjugaison des molécules d'anticorps CD31 dans la lumière vasculaire a amélioré la rétention des cellules endothéliales sur le système vasculaire et la perméabilité vasculaire de la structure implantée pendant l'implantation. Ces résultats suggèrent que l'ensemencement des cellules endothéliales et la conjugaison des anticorps pourraient maintenir la perméabilité vasculaire des reins entiers issus du génie biologique *in vivo*. Toutefois, pour que cette technologie puisse être utilisée en clinique, il faut relever d'autres défis importants. Il s'agit notamment de la fabrication des supports rénaux acellulaires sur une base Clinique, la réticulation efficace des supports en utilisant des sources cellulaires cliniquement pertinentes pour recréer des structures rénales et une implantation viable à long terme sans thrombose grave (Ko, Yoo, et Atala 2019).

Médecine régénérative rénale : approche sans cellules ou régénération *in situ*

L'objectif est de fabriquer un support afin de recruter les cellules efficacement. Une fois les cellules recrutées, elles sont influencées par le microenvironnement. L'administration intra rénale de médicaments à partir d'un hydrogel porteur implanté sous la capsule rénale est une manière innovante d'induire la régénération du tissu rénal et/ou de prévenir l'inflammation ou la fibrose rénale. On favorisera les MEC naturelles et les polymères synthétiques (Orlando et al. 2013). Il est nécessaire de contrôler la biodégradation de la MEC afin d'optimiser les effets thérapeutiques en maintenant suffisamment longtemps les molécules greffées. Différents composants sont utilisés et étudiés :

- Le **collagène de type I polymérisé** (P-collagène) a été utilisé avec succès pour réduire les cicatrices hypertrophiques humaines grâce à ses propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. Le composé pourrait être utile dans une stratégie de réduction de la néphrotoxicité chronique de la cyclosporine (Sánchez-Pozos et al. 2010).

- Deux **hydrogels à base de PEG** entraînent des réponses tissulaires différentes suite à l'implantation sous capsulaire (Dankers et al. 2012):

→ Hydrogel à chaîne étendue pour l'administration intra rénale à long terme de médicaments organiques.

→ Hydrogel bi fonctionnel pour l'administration à court terme et rapide de médicaments protéiques au cortex rénal.

- Une **microsphère à base de gélatine réticulée**, résistante à la dégradation enzymatique, avec une dégradation continuellement ajustable. Elle pourrait être utilisée pour développer des matériaux qui catalysent la régénération des reins en présence d'une maladie rénale (F.-M. Chen, Zhang, et Wu 2010).

- **Microsphères mono dispersées** injectées en sous capsulaire comme système d'administration locale de médicaments au rein : on note aucun effet négatif lié à la méthode de livraison (Zandstra et al. 2015).

- La **protéine morphogène osseuse 7 (BMP-7)**, un membre de la famille des TGF- β 1, est fortement exprimée dans le rein. Dans le cas d'une délétion génétique du TGF- β 1 chez les souris, celle-ci présente une grave altération du développement des reins. L'administration de BMP-7 exogène améliore la réparation des cellules épithéliales tubulaires rénales endommagées et est associée à l'inversion des lésions rénales chroniques par la transition épithéliale vers le mésenchyme (Zeisberg et al. 2003).

- Les **anticorps de la protéine de l'épididyme humain 4 (HE4)** neutralisant la fibrose ont été administrés pour modifier l'environnement fibrotique des reins blessés. L'administration d'un anticorps anti-HE4 a accéléré la dégradation du collagène de type I et a inhibé la fibrose chez la souris. Les auteurs ont conclu que la protéine HE4 est un biomarqueur potentiel de la fibrose rénale et pourrait être une nouvelle cible thérapeutique (LeBleu et al. 2013).

- Le **THR-123**, un agoniste de la signalisation de la BMP, conduisait à la réparation des cellules tubulaires endommagées et améliorait la fonction rénale en réduisant la fibrose dans plusieurs modèles de maladies rénales. Le **THR-123 plus le captopril**, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, a facilité les effets thérapeutiques synergiques en contrôlant la fibrose rénale. (Sugimoto et al. 2012).

L'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et la médecine régénérative ont fait des avancées prometteuses pour la restauration et la régénération des lésions causés par l'insuffisance rénale. Ces approches comprennent la thérapie cellulaire utilisant des sources de cellules autologues et allogéniques "prêtes à l'emploi", l'ingénierie de constructions rénales à base de cellules, et l'utilisation de cellules rénales endogènes et d'une niche pour la régénération rénale *in situ*. Ces études expérimentales ont permis de tester de nouvelles stratégies pour les traitements cliniques des maladies rénales, et certaines sont cliniquement applicables.

Néanmoins, plusieurs défis doivent être relevés pour améliorer les résultats thérapeutiques. Il faut poursuivre les travaux pour comprendre le milieu complexe du microenvironnement rénal et pour développer des techniques de culture et d'expansion des cellules souches rénales afin de soutenir les futures thérapies cellulaires pour les maladies rénales. En outre, les études futures devraient porter sur de meilleures méthodes pour concevoir des constructions rénales issues du génie tissulaire et leur implantation sûre et efficace, déterminer de nouvelles façons de prévenir les effets secondaires immunologiques des thérapies cellulaires et examiner les moyens de réduire la thrombose et d'améliorer l'innervation des cellules greffées ou l'ingénierie des constructions rénales.

f. Conclusion

Ils existent de nombreuses solutions de médecine régénérative que nous n'avons pas évoquées. Les os, les tendons, les ligaments, le cœur, le foie, le pancréas Font l'objet de recherches précliniques et cliniques. Nous avons abordé deux principaux sujets qui sont la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire qui sont des moteurs pour la médecine régénérative mais il ne faut pas oublier que les molécules bioactives et la thérapie génique sont des pièces cruciales du puzzle. Il n'est pas possible de dissocier ces quatre sujets qui sont les piliers et les fondations de la médecine régénérative. De nombreux challenges subsistent comme nous avons pu le notifier, les avancées sont grandes mais les thérapeutiques tardent à arriver. Cela est dû à l'effet poupée russe de la médecine régénérative : on a ouvert la première poupée, la bioingénierie, puis la seconde, la thérapie cellulaire, puis la troisième, la thérapie génique et enfin la quatrième et peut être pas dernière : les molécules bioactives. L'imbrication de ces domaines engendrent la découverte de nombreux paramètres influençant les recherches, il faut les équilibrer de façon très fine afin d'obtenir des solutions thérapeutiques efficaces et sûres.

3. Évolution et perspectives

En moyenne on considère que **toutes les 30 secondes, un patient meurt de maladies qui pourraient être traitées par remplacement de tissus** (Atala 2009). Une approche fondée sur la thérapie cellulaire l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative pourrait probablement offrir la solution définitive pour les enfants souffrant de malformations congénitales, les jeunes soldats défigurés à la guerre et les personnes âgées souffrant de maladies chroniques invalidantes, qui pèsent de plus en plus lourdement sur les économies nationales du monde (Colombo et al. 2017).

Le marché actuel est en **forte croissance** et s'élargira rapidement lorsqu'un traitement révolutionnaire pour une maladie non transmissible ou un facteur lié au mode de vie sera disponible. De nombreux fonds d'investissement en capital-risque et de grandes entreprises investissent de plus en plus dans ce secteur porteur qui pourrait changer le monde de la médecine. Environ **13,3 milliards d'USD** de financement mondial ont été levés en 2018 pour des investissements dans la médecine régénératrice.

Tableau XVII Les enjeux de la médecine régénérative

	Besoins	Actions
Enjeux qualitatifs	- Innocuité - Sécurité - Capacité de s'intégrer à l'organisme sans rejet du système immunitaire	→ Recherches scientifiques plus exigeantes → Harmonisation des processus de recherches et de productions
Enjeux quantitatifs	- Capable de fournir à tout le monde sans disparité les traitements - Répondre aux besoins de cellules	→ Nécessite une industrialisation de bioproduction
Enjeux temporel	Besoin de cellules de façon quasi-immédiate pour répondre aux situations d'urgences	→ Les banques de cellules peuvent être une des solutions mais comportent des limites
Enjeux translationnels	Passage des recherches académiques et essais cliniques à la commercialisation	→ Meilleurs modèles de financement → Une réglementation mieux défini
Enjeux éthiques	- Quelle éthique adopter ? - Quelles sont les principes éthiques que nous sommes prêts à bafouer pour permettre la survie de patients ? - Quel cadre éthique mettre en place ? - Doit-on examiner chaque cas avec un comité éthique ou doit-on légiférer ?	

Il est temps de **traduire les succès et les recherches de laboratoires en thérapies viables**, il est nécessaire d'unir les forces des chercheurs (bio-ingénieurs, ingénieurs des matériaux, biologistes) et les acteurs de santé (médecins, pharmaciens, infirmiers...) pour mettre au point des solutions viables, sécurisées et efficaces. En répondant à ces enjeux, on encadrera davantage les recherches qui pourront se faire de façon plus rapide et efficace et on évitera la recrudescence des traitements miracles vendus abusivement à des patients qui souvent après une errance diagnostic de plusieurs années se confrontent à une absence de thérapeutiques. La synergie des ressources et d'un réservoir de talents de plus en plus expérimentés, permettront de guérir les maladies les plus difficiles à traiter dans le monde.

Selon Colombo et ses équipes, il est nécessaire de réunir certains **critères pour réaliser des études pré cliniques** afin que ceux-ci évoluent en essais cliniques puis en thérapies (Colombo et al. 2017) :

- Utilisation de **grands échantillons** pour assurer la viabilité de l'expérience
- Utilisation de constructions de tissus/organes présentant des **dimensions similaires à celles des tissus humains** pour résoudre la problématique d'échelle
- **Choix appropriés des modèles animaux** qui ne doivent pas faire état de sur- ou sous-estimations : taille de l'animal, similarités des tissus et de son environnement

- Sélection de **bioréacteurs pertinents** (spécialement pour les vaisseaux) pour améliorer la construction de l'organe artificiel au moyen de stimuli adéquats qui se rapprochent au maximum de ceux que l'on retrouve au sein de l'organisme
- **Utilisation de tissus malades** et/ou d'organes animaux dysfonctionnels en vue d'applications cliniques
- **Suivi long** afin d'assurer l'innocuité (non-immunogénicité, non tumorigénicité) et l'efficacité (persistance des cellules, renouvellement ou mort cellulaires)
- **Comparaisons avec le traitement de référence** : en se plaçant de ce point de vu on peut mesurer l'amélioration du service médical rendu.

Plusieurs technologies doivent être développées afin d'apporter et de générer *in vivo* un tissu sain capable d'interagir avec son microenvironnement c'est-à-dire en étant irrigué par les vaisseaux sanguins et répondant aux influx nerveux. Il faut donc améliorer :

- La **vascularisation** et l'**innervation** des constructions artificielles
- L'utilisation de **différents types cellulaires** au sein même d'une construction afin de générer des organes complexes
- Construction de **bioréacteurs plus performants** pour confirmer les modèles animaux, s'assurer de la validité des données et de la maturité de la construction
- Il est nécessaire **d'harmoniser les conditions de travail**, en effet de nombreuses avancées et découvertes ont vu le jour ces dernières années mais aucune d'entre elles n'ont changé la donne.

Lorsque tous ces problèmes seront complètement résolus, l'approche TERM deviendra supérieure aux thérapies cliniques existantes.

a. Principales évolutions de l'industrie

Après une année 2019 qui a été la deuxième plus forte en termes de financement de la médecine régénérative, la demande de financement reste forte en 2020 malgré les conditions sanitaires exceptionnelles. Bien que le marché des introductions en bourse puisse être limité par le cycle électoral américain et la situation sanitaire due au COVID-19, dans l'ensemble, les indications laissent présager une autre année solide pour les financements dans le secteur. L'émergence de COVID-19 a paralysé le monde et cette crise sanitaire a eu un impact sans précédent sur les entreprises de tous les secteurs. Cependant le soutien croissant des gouvernements, de plusieurs entreprises peut contribuer à la lutte contre cette maladie hautement contagieuse et sur le long terme les effets de cette crise sanitaire vont s'estomper très vite (Fortune Business Insights 2019).

Premières autorisations des produits de médecine régénérative

Plusieurs produits sont sur le point d'être lancés, et vont recevoir leurs autorisations de mise sur le marché aux États-Unis, dans l'UE et au Japon en 2020. Le nombre de produits entrant sur le marché va croître très rapidement. On peut donner l'exemple de nouveaux produits arrivés très récemment :

Nom de la thérapeutique	Date d'AMM	Indications	Mécanismes d'action
Integra® Derm al Regeneration Template Single Layer	2017	Suite à des traitements excisionnels de blessures de pleine ou partielle épaisseur lorsqu'une autogreffe suffisante n'est pas possible en raison de l'état du patient.	Ces matrices de régénération dermique monocouche permettent reconstruction des défauts de réparation du derme en une seule étape. Le gabarit IDRT-SL est composé d'une matrice poreuse de collagène de tendon bovin réticulé et de glycosaminoglycane pour la régénération dermique.
Luxturna® de Novartis®	2018	Traitement des adultes et des enfants présentant une perte visuelle due à une dystrophie rétinienne héréditaire résultant de mutations bi-alléliques confirmées du gène RPE65 et possédant suffisamment de cellules rétinienne viables. C'est le premier traitement de thérapie génique proposé pour cette maladie orpheline. Le service médical rendu et l'ASMR sont importants.	
RVT-802 issu du partenariat entre Enzyvant® et l'Université de Duke	2020 En cours	Traitement de l'immunodéficience chez les patients atteints d'athymie congénitale : maladie rare, les bébés qui en sont atteints ne possèdent pas de thymus. Le thymus produit les cellules T nécessaires à la régulation du système immunitaire, si elle n'est pas traitée elle est mortelle	Nouvelle thérapie régénératrice basée sur l'ingénierie tissulaire Désignation FDA : -thérapie innovante -thérapie avancée en médecine régénérative -thérapie de maladie pédiatrique rare Désignation EMA : médicament orphelin
RYONCIL (remestemcel-L) par Mesoblast®	2020 en cours	Demande prioritaire en l'absence de traitement approuvé pour les enfants de moins de 12 ans atteints de SR-GVHD Produits biologiques sa thérapie cellulaire allogénique pour le traitement pédiatrique de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte réfractaire aux stéroïdes. Extension de la demande auprès de la FDA pour : -le traitement de la maladie de Crohn réfractaire aux molécules biologiques -l'encéphalopathie ischémique hypoxique -GVHD chronique -la détresse respiratoire du au COVID 19	Thérapie expérimentale comprenant des cellules souches mésenchymateuses cultivées et expansées provenant de la moelle osseuse d'un donneur non apparenté. Il est administré aux patients dans une série de perfusions intraveineuses. On pense que RYONCIL a des propriétés immunomodulatrices pour contrecarrer les processus inflammatoires en régulant à la baisse la production de cytokines pro-inflammatoires, en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires et en permettant le recrutement de cellules anti-inflammatoires naturelles dans les tissus concernés. Une étude sur l'utilisation du RYONCIL™ dans le cadre du syndrome de détresse respiratoire aiguë modéré à sévère dû à une infection par COVID-19, a été autorisée par la FDA.
TEMCELL® par JCR Pharma		Traitement de l'épidermolyse bulleuse par voie intraveineuse. Il existe de nombreuses variantes génétiques et symptomatiques de l'épidermolyse bulleuse, toutes partageant le symptôme important d'une peau extrêmement fragile qui se boursoufle et se déchire à la suite de frottements ou de traumatismes mineurs. Les organes internes et les systèmes corporels peuvent également être gravement affectés par la maladie. L'EB est toujours douloureuse, souvent envahissante, et est dans certains cas mortelle avant l'âge de 30 ans. On rapporte 25 000 personnes atteintes aux USA et aucun traitement n'existe.	

Pipeline riche

Le pipeline clinique de la médecine régénérative est solide, avec plusieurs essais en phase finale en cours. En 2020, des prévisions un certain nombre de données très médiatisées issues de ces essais en phase avancée. En 2020, un certain nombre d'entreprises vont déposer une demande d'agrément :

Nom de la thérapeutique	Indications	Mécanismes d'action
<p>Tab-cel® (tabelecleucel)</p> <p>Immunothérapie allogénique à cellules T qui est en phase III</p>	<p>Pour les patients atteints de maladie lymphoproliférative post-transplantation associée au virus Epstein-Barr (EBV) suite à une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques ou une greffe d'organe solide.</p> <p>L'EBV est un virus courant qui infecte plus de 90 % des personnes dans le monde. Pour la plupart des personnes en bonne santé, il provoque des symptômes semblables à ceux du rhume et reste ensuite dans l'organisme, mais il est généralement contrôlé par le système immunitaire, de sorte qu'il n'y a plus de symptômes après l'infection initiale. A la suite d'une transplantation on met le patient sous traitement immunosuppresseur, et si le système immunitaire est affaibli, l'EBV peut être réactivé et provoquer une croissance incontrôlée de cellules dans les ganglions lymphatiques et d'autres organes du patient. Ce virus peut provoquer un grave cancer du sang ou lymphome appelé maladie lymphoproliférative post-transplantation.</p>	<p>La FDA a désigné tabeclucel comme thérapie innovante pour le trouble lymphoprolifératif post-transplantation associé au virus Epstein-Barr à la suite d'une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques, en 2015.</p> <p>En 2016, le tabeclucel a été accepté dans la voie réglementaire des médicaments prioritaires de pour la même indication, apportant un soutien réglementaire renforcé. En outre, tab-cel® a le statut de médicament orphelin aux États-Unis et dans l'UE.</p>
<p>HAV par Humacyte</p>	<p>HAV, permettant un accès vasculaire pour l'hémodialyse en comparaison avec les fistules artério-veineuses.</p>	<p>Produit par ingénierie tissulaire un vaisseau acellulaire. Le HAV est un tube vasculaire stérile, composé de tissu conjonctif humain et de protéines. Ce tissu conjonctif complexe présente des similitudes avec le tissu vasculaire humain, mais le HAV n'est pas un tissu vivant.</p>
<p>Lifileucel (LN-144)</p>	<p>Thérapie infiltrant des tumeurs en se basant sur l'immunothérapie pour éliminer les tumeurs solides notamment le mélanome.</p>	<p>On prélève les lymphocytes T du patient qui ont la capacité de reconnaître et d'entraîner la mort des propres cellules cancéreuses du patient. Certaines de ces cellules se déplacent naturellement vers les tumeurs cancéreuses existantes et y pénètrent, et sont alors appelées lymphocytes infiltrant les tumeurs (LIT). Cependant, l'environnement immunosuppresseur des tumeurs cancéreuses limite leur nombre et leur activité, ce qui diminue leur capacité à attaquer efficacement le cancer. Le lifileucel est dérivée de l'isolement lymphocyte infiltrant des tumeurs naturel du patient à partir d'un échantillon de tumeur cancéreuse prélevé sur le patient. On les extrait et ils prolifèrent pour former des populations de l'ordre de milliards. Les patients reçoivent une thérapie de préconditionnement pour réduire l'environnement immunosuppresseur du cancer qui reste chez le patient puis les LIT sont administrées par perfusion intraveineuse au patient sous forme de lifileucel. Les LIT ciblent et infiltrent le cancer chez le patient et attaquent le cancer en plus grand nombre. Les patients reçoivent jusqu'à 6 doses d'interleukine 2 (IL-2) immédiatement après la perfusion de TIL pour soutenir la croissance et l'activation du TIL chez le patient, et pour augmenter l'activité anticancéreuse de la thérapie TIL.</p>

Un environnement réglementaire positif

49 milliards de dollars : c'est l'estimation du poids du marché de la médecine régénérative d'ici à 2021. Les États-Unis, le Japon et le Royaume-Uni ont mis en place des mesures audacieuses en investissant les fonds requis et en modernisant la réglementation afin de s'assurer une part importante de ce marché (Alliance de médecine régénérative du Canada 2017).

Certaines thérapies bénéficient d'un protocole accéléré d'approbation permettant l'accès des patients aux traitements, la balance bénéfices/risques est toujours évaluée scrupuleusement afin de ne pas nuire au patient. Au niveau mondial, des désignations ont été créées pour apporter plus rapidement la solution thérapeutique au chevet du malade :

RMAT: Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation (Center for Biologics Evaluation and Research s. d.):

Comme décrit dans la section 3033 de la loi sur les cures du 21^e siècle, un médicament peut être désigné comme thérapie avancée de médecine régénérative (RMAT) si :

- Le médicament est **une thérapie de médecine régénérative**, qui est définie comme une thérapie cellulaire, un produit d'ingénierie tissulaire thérapeutique, un produit à base de cellules et de tissus humains, ou tout produit combiné utilisant de telles thérapies ou de tels produits, à l'exception de ceux réglementés uniquement en vertu de la section 361 de la loi sur le service de santé publique et de la partie 1271 du titre 21 du code des règlements fédéraux ;
- Le médicament est destiné à traiter, modifier, inverser ou guérir **une maladie ou un état grave ou mettant la vie en danger**
- Les preuves cliniques préliminaires indiquent que le médicament a le potentiel de répondre aux besoins médicaux non satisfaits pour cette maladie ou cet état

PRIME : priority medicines (*Committee for medicinal products for human use* s. d.)

C'est un programme lancé par l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour renforcer le soutien au développement de médicaments qui ciblent un besoin médical non satisfait. Ce programme volontaire est basé sur une interaction renforcée et un dialogue précoce avec les développeurs de médicaments prometteurs, afin d'optimiser les plans de développement et d'accélérer l'évaluation pour que ces médicaments puissent atteindre les patients plus tôt. Grâce à PRIME, l'Agence offre un soutien précoce et proactif aux développeurs de médicaments afin d'optimiser la production de données solides sur les avantages et les risques d'un médicament et de permettre une évaluation accélérée des demandes de médicaments. Cela aidera les patients à bénéficier le plus tôt possible de thérapies susceptibles d'améliorer sensiblement leur qualité de vie.

- **Évaluation accélérée** : PRIME s'appuie sur le cadre réglementaire existant et sur les outils déjà disponibles tels que les avis scientifiques et l'évaluation accélérée. Cela signifie que les développeurs d'un médicament ayant bénéficié de PRIME peuvent s'attendre à pouvoir bénéficier d'une évaluation accélérée au moment de la demande d'autorisation de mise sur le marché.
- **Favoriser un dialogue précoce** : en s'engageant très tôt avec les développeurs de médicaments, PRIME vise à améliorer la conception des essais cliniques afin que les données générées soient adaptées à l'évaluation d'une demande d'autorisation de mise sur le marché. Un dialogue et des conseils scientifiques précoces permettent également de garantir que les patients ne participent qu'à des essais conçus pour fournir les données nécessaires à une demande, en utilisant au mieux des ressources limitées.
- Principaux avantages pour les demandeurs : une fois qu'un médicament candidat a été sélectionné pour le programme PRIME, l'Agence fera :
 - o Nommer un rapporteur du comité des médicaments à usage humain (CHMP) ou du comité des thérapies innovantes (CAT) dans le cas d'une thérapie innovante, afin de fournir un soutien

continu et d'aider à développer les connaissances avant une demande d'autorisation de mise sur le marché ;

- Organiser une réunion de lancement avec le rapporteur du CHMP/CAT et un groupe multidisciplinaire d'experts, afin qu'ils fournissent des orientations sur le plan de développement global et la stratégie réglementaire ;
 - Désigner un point de contact dédié ;
 - Fournir des avis scientifiques aux étapes clés du développement, en impliquant d'autres parties prenantes telles que les organismes d'évaluation des technologies de la santé, afin de faciliter un accès plus rapide des patients au nouveau médicament ;
 - Confirmer la possibilité d'une évaluation accélérée au moment de la demande d'autorisation de mise sur le marché.
- **Critères d'éligibilité** : le régime est axé sur les médicaments susceptibles d'offrir un avantage thérapeutique majeur par rapport aux traitements existants, ou de bénéficier aux patients sans options de traitement. Ces médicaments sont considérés comme des médicaments prioritaires par l'EMA. Pour être accepté dans le cadre du programme PRIME, un médicament doit démontrer son potentiel à bénéficier aux patients dont les besoins médicaux ne sont pas satisfaits, sur la base de données cliniques précoces.

SAKIGAKE (The Ministry of Health, Labour and Welfare s. d.): c'est un système de mise en pratique de médicaments innovants/d'appareils médicaux/médicaments régénératifs initialement développé par le Japon. Il a pour but de promouvoir une stratégie facilitant tout le processus, de la R&D, la recherche/les essais cliniques, la sécurité avant et après la commercialisation, la couverture d'assurance, jusqu'à la mondialisation des produits innovants qui doivent être mis en pratique. Cet ensemble de mesures vise plus particulièrement les produits pharmaceutiques, les dispositifs médicaux et la médecine régénérative innovants qui peuvent guérir des maladies graves (telles que les maladies rares, le cancer, etc.), à moins qu'une thérapie établie ne soit disponible.

- **Critères d'éligibilité** : produits médicaux pour les maladies nécessitant d'urgence une thérapie innovante qui peuvent satisfaire les deux conditions suivantes :
 - Avoir d'abord été développés au Japon et avoir prévu une demande d'autorisation (consultation de la The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) dès le début de la R&D)
 - On peut s'attendre à une efficacité importante (c'est-à-dire une amélioration radicale par rapport à la thérapie existante), en fonction sur les données du mécanisme d'action, de l'étude non clinique et de la phase précoce des essais cliniques (phase I à II)
- **Avantages de la désignation** :
 - De réduire le temps jusqu'à l'autorisation
 - 1) Consultation prioritaire : raccourcit le temps d'attente, passe de 2 mois à 1 mois, pour une consultation sur les essais cliniques dès la soumission des matériaux.
 - 2) Consultation pré demande : encourage la consultation et accepte les documents en anglais
 - 3) Révision prioritaire : durée totale d'examen est de 6 mois au lieu de 12 mois : ils acceptent de se contenter des résultats de l'étude de phase III après la demande au cas par cas afin de réduire le délai entre la R&D et l'approbation
 - Faciliter la R&D
 - 1) Partenaire d'examen : la PMDA désigne un responsable pour prendre en charge la gestion globale de l'ensemble du processus d'approbation, y compris l'assurance de la conformité, la gestion de la qualité, les mesures de sécurité et l'examen de la demande
 - 2) Mesures de sécurité importantes après la commercialisation : les mesures de sécurité post-commercialisation sont renforcées telles que l'extension de la période de réexamen après les approbations, faciliter la coalition avec les sociétés scientifiques et la diffusion d'informations au niveau mondial.
- **Procédure de désignation** :
 - Option 1 : La demande doit être soumise à la Division de l'évaluation et de l'autorisation et être examinée par la PMDA. Le résultat de la désignation doit être notifié dans les 60 jours.

- Option 2 : La division de l'évaluation et de l'autorisation doit prendre contact avec un demandeur potentiel. Le résultat de la désignation doit être notifié dans les 30 jours suivant la soumission, si le demandeur y consent.

Tableau XVIII Thérapeutiques ayant bénéficié de protocoles accélérés

	Indications	Mécanismes d'action
<p>SB623 de SanBio</p> <p>SAKIGAKE + RMAT</p>	<p>Désignation RMAT pour les lésions cérébrales.</p> <p>Aucune désignation pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la DMLA sèche -la rétinite pigmentaire -Parkinson -les lésions de la moelle épinière -Alzheimer. 	<p>Fabriqué à partir de cellules souches mésenchymateuses adultes modifiées et cultivées, dérivées de la moelle osseuse, qui subissent une modification génétique temporaire. L'implantation de cellules SB623 dans le tissu nerveux lésé du cerveau devrait déclencher la capacité naturelle de régénération du cerveau à récupérer les fonctions motrices perdues lors de lésions cérébrales traumatiques primaires ou secondaires.</p>
<p>MGTA-456 de Magenta</p> <p>RMAT</p> <p>Magenta a l'intention de terminer le recrutement pour la phase 2 en 2020 et de poursuivre le dialogue avec la FDA sous la désignation RMAT sur la conception d'une étude permettant l'enregistrement, et d'avoir des discussions avec l'Agence européenne des médicaments pour le développement en Europe.</p>	<p>Pour les patients atteints de troubles métaboliques héréditaires et la rémission chez les patients atteints de cancers du sang.</p> <p>En étude de phase 2 en cours chez des patients atteints de troubles métaboliques héréditaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> - adrénoleuco dystrophie cérébrale -la mucopolysaccharidose de type IH - la leucodystrophie métachromatique - la leucodystrophie à cellules globoïdes. <p>Il s'agit de troubles neurologiques rares, à évolution rapide, qui sont mortels lorsqu'ils ne sont pas traités.</p>	<p>Thérapie cellulaire conçue pour fournir une forte dose de cellules souches hématopoïétiques adaptées au patient pour permettre la reconstruction du système immunitaire et sanguin.</p> <p>Le MGTA-456 permettrait une résolution rapide, durable et sécurisé qui n'existe pas avec les traitements actuels. Les chercheurs de l'université du Minnesota étudient également la formulation cryopréservé du MGTA-456 dans le cadre d'un essai clinique de phase 2 chez des patients atteints de cancers du sang à haut risque.</p>
<p>Viralym-M par AlloVir</p> <p>PRIME + RMAT</p>	<p>Thérapie allogénique multi-virus spécifique aux cellules T, disponibles sur le marché, conçues pour traiter :</p> <p>les maladies virales actives chez les patients -immunodéprimés, y compris les patients ayant subi une TCSH, une transplantation d'organe solide, ou les patients souffrant d'immunodéficience primaire, de cancer ou de VIH.</p>	<p>Dans une étude positive de preuve de concept de phase 2, publiée dans le Journal of Clinical Oncology (Tzannou, JCO, 2017), plus de 90 % des patients ayant échoué au traitement conventionnel et ayant reçu Viralym-M ont démontré une réponse clinique complète ou partielle, et la plupart ont présenté une résolution complète des principaux symptômes cliniques. Viralym-M a le potentiel de combattre ou de prévenir une série de maladies virales graves et potentiellement mortelles chez les patients alors qu'ils sont immunodéprimés.</p>

b. Marché de la médecine régénérative en 2020

En 2019, on décompte plus de 987 entreprises de médecine régénérative (496 en thérapie génique, 625 en thérapie cellulaire et 133 en ingénierie tissulaire) sur les cinq continents. Les leaders mondiaux sont les **USA** avec plus de 534 entreprises, suivi de l'**Europe** et **Israël** qui en possèdent 237.

En 2019, Selon l'alliance pour la médecine régénérative environ 1 066 essais cliniques de médecine régénérative étaient en cours dans le monde dont :

- 381 en phase I
- 591 en phase II
- 94 en phase III

Tableau XIX Nombres d'essais clinique utilisant la médecine régénérative (Alliance for Regenerative Medicine 2019)

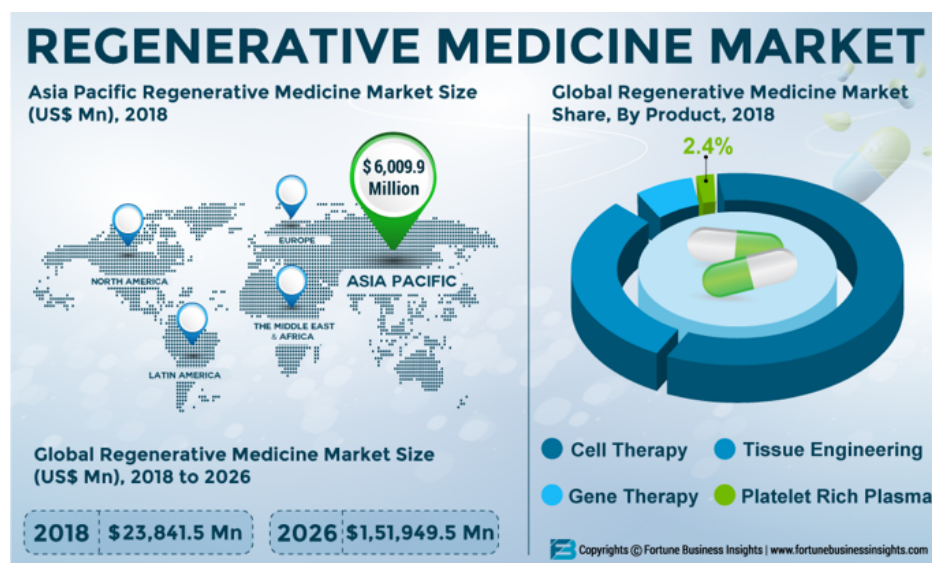
	Thérapie Génique	Immuno-oncologie cellulaire à base de modification génétique	Thérapie Cellulaire	Ingénierie tissulaire
Total	352	452	216	46
Phase I	111	222	42	6
Phase II	209	215	144	23
Phase III	32	15	30	17

Ces essais cliniques ont de multiples domaines d'applications comme : la cancérologie, les maladies génétiques, les troubles métaboliques, les troubles endocriniens, les troubles musculo squelettiques, les affections du système nerveux, l'infectiologie, la gastroentérologie, la cardiologie, les altérations de l'appareil respiratoire, les maladies lymphatiques, la chirurgie, l'otorhinolaryngologie, l'hématologie, l'ophtalmologie et la dermatologie

En 2019, **9,8 milliards** de dollars ont été levés via les financements publics, les financements privés, les partenariats industriels (1,43 M^d), les ventures capital (4,1M^d), les introductions en bourses (0,56 M^d), les follow-up (2,43 M^d), et enfin les fusions/acquisitions. Les grandes et moyennes entreprises pharmaceutiques continuent d'intensifier leurs activités dans le secteur de la thérapie cellulaire et génique avec des acquisitions de développeurs de thérapies cellulaires et géniques.

Le marché qui était évalué à 23 841,5 millions de dollars en 2018 devrait atteindre **151 949,5 millions de dollars en 2026** ce qui correspond à un taux de croissance annuel de l'ordre de 26,1% (Fortune Business Insights 2019).

Figure 34 Marché de la médecine régénérative (Fortune Business Insights 2019).



De nouvelles start-ups émergent, plusieurs entreprises du secteur sont entrées en bourse, ont fusionnées ou ont été rachetées. La demande est bien présente et ne fait qu'augmenter les thérapeutiques symptomatiques, les traitements de compensation qui permettent de maintenir en vie les patients plus longtemps. On peut rajouter à cela le **vieillessement de la population**, et **l'espérance de vie qui augmente**. Les patients sont de plus en plus impatients, lorsqu'une percée sera réalisée dans le traitement d'une maladie non transmissible

(comme le cancer, le diabète, les maladies cardiaques) ou d'un facteur lié au mode de vie (par exemple, faire pousser les cheveux aux bons endroits, développer les capacités cognitives ou augmenter l'espérance de vie en bonne santé), la demande augmentera de façon exponentielle surtout si on assure un profil de sécurité (Fortune Business Insights 2019).

4. Dispositif d'aide et de soutien au développement de médicament de thérapie innovante :

De nombreux dispositifs de soutien existent pour pousser la recherche à donner des résultats probants. En mai 2019, la France dénombre 84 produits uniques répartis dans 100 programmes : 71 de recherches (R&D et précliniques) et 29 en cours d'essais cliniques. Les bio médicaments prennent le pas sur les molécules chimiques, le problème étant le coût de développement de ces solutions thérapeutiques. En 2017, 7,5 milliards des dollars ont été injectés dans la recherche et le développement des médicaments, dont 3,8 spécifiquement pour les MTI (Fortune Business Insights 2019):

- thérapie génique : 3,1 milliards
- thérapie cellulaire : 1,9 milliards
- ingénierie tissulaire : 363 millions

La France est le deuxième pays Européen, après la Grande Bretagne, détenant le plus de programmes de développement de MTI. La France a été pionnière dans l'industrie du médicament chimique, et dispose d'un vivier de compétences, d'expertise et d'infrastructure pour devenir leader sur ce marché haute technicité.

Le financement peut être privés par des laboratoires pharmaceutiques, des fonds d'investissements ou les constructeurs ainsi tous les coûts leurs incombent. Quant au promoteur institutionnel, les coûts peuvent être divisés entre les différents protagonistes (crédits de recherche alloués par l'Agence nationale de la recherche (ANR), par la Banque publique d'investissement de France (les pôles de compétitivité, le fonds unique interministériels et les projets industriels d'avenir), par le Commissariat général à l'investissement, par les hôpitaux, les associations, et sponsoriser par un laboratoire pour les fournitures et le matériel).

Afin de soutenir des projets de contribution au progrès médical, à la qualité et aux pratiques de prises en charge des patients, l'État réalise **des appels à projets nationaux de recherche**. Le ministère des solidarités et de la santé a mis en place 5 programmes de financements *via* des appels à projets nationaux couvrant les champs de la recherche clinique, translationnelle, infirmière et paramédicale, médico-économique, sur la performance du système de soins.

Deux programmes à visée directement « thérapeutique », permettant l'accès à des innovations médicales :

Programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) a pour objectif améliorer la santé humaine et le progrès des techniques de soins dans le respect de la personne. Il a été mis en place depuis 1993, la CNAM finance deux appels d'offres nationales par an. L'éligibilité des projets est évaluée par le Comité national de recherche clinique (CNRC). Ce programme comprend trois appels à projet sur des thématiques ciblées :

- Pour le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC-N)
- Pour le programme hospitalier de recherche clinique national en cancérologie (PHRC-K)
- Pour le programme hospitalier de recherche clinique interrégional (PHRC-I).

Programme de recherche translationnelle (PRT) permet d'appliquer concrètement à la recherche clinique les découvertes issues de la recherche fondamentale Il comprend 2 appels à projets :

- Pour le programme de recherche translationnelle en santé (PRT-S)
- Pour le programme de recherche translationnelle en cancérologie (PRT-K).

La législation prévoit des incitations scientifiques et financières pour encourager la recherche et le développement dans le domaine des MTI. Les promoteurs de ces thérapies peuvent obtenir des réductions sur les redevances payables à l'EMA de :

- 65 % de réduction des frais pour une demande d'avis scientifique pour les MTI (90 % pour les PME)
- 90% de réduction des frais pour la procédure de certification.

Afin de motiver les laboratoires et les chercheurs à travailler sur les maladies orphelines, dont la prévalence est très faible (<5/10000) donc le marché également, un **statut de « médicament orphelin »** a été déterminé. Cette désignation permet de bénéficier d'incitations telles que l'assistance au protocole (conseils sur le développement de votre médicament orphelin). Un produit désigné orphelin bénéficie :

- D'un conseil scientifique
- D'une assistance procédurale
- D'une réduction des frais administratifs
- D'une exclusivité commerciale de 10 ans pour chaque indication, qui peut être prolongée de 2 années supplémentaires après l'obtention d'un plan d'investigation pédiatrique (PIP).

De même, le plan d'investigation pédiatrique vise à motiver les laboratoires à effectuer des études spécifiques contre des compensations. Un PIP décrit les études que vous devez mener pour obtenir des données pertinentes pour l'évaluation d'un médicament pour enfants. Le respect d'un PIP peut entraîner des incitations et des récompenses pour le développement d'un médicament chez l'enfant (y compris la prolongation du certificat complémentaire de protection ou de l'exclusivité commerciale pour les médicaments orphelins).

Discussion

Le secteur de la médecine régénérative n'en est qu'au début de son développement. On observe une croissance exponentielle des thérapies expérimentales, leur adoption clinique était limitée.

Il est donc nécessaire de procéder à des ajustements au sein des méthodes de recherches, du cadre réglementaire, des infrastructures de recherches et de production, de la formation des professionnels de santé et l'économie de la santé.

Les recherches précliniques devraient suivre un modèle consistant à comprendre la physiopathologie de la maladie, les facteurs de variabilités et les mécanismes d'actions entrant en jeu pour le développement d'une thérapeutique.

Afin d'aborder plus sereinement les recherches cliniques, il faudrait répondre aux questionnements éthiques, élucider les facteurs contribuant à la variabilité de la réponse clinique, protéger le patient avec des recommandations et s'assurer du respect des règles encadrant les essais cliniques.

Le cadre réglementaire est difficile à mettre en place pour ces thérapeutiques qui évoluent rapidement. Mais à des fins de qualité, de sécurité et de d'efficacité, le législateur devrait pouvoir réviser la réglementation très régulièrement afin de combiner un soutien à la recherche et à sa traduction avec le développement continu d'un cadre flexible, proportionné et rigoureux pour protéger les patients contre les préjudices. La commission européenne doit avoir des devoirs de contrôle sur les thérapeutiques frauduleuses, d'information des patients et de référencement des thérapeutiques autorisées.

Il serait intéressant d'introduire la médecine régénérative aux professionnels de santé et de promouvoir un code de conduite incluant la responsabilité de suivre des directives professionnelles. Inclure un enseignement sur les questions éthiques, juridiques et sociales.

Des investissements doivent soutenir le passage de la recherche fondamentale à la clinique. Il serait bon de créer de nouveaux modèles de collaboration entre l'industrie et les universités, soutenu par la commission Européenne. Les unités de recherches et les institutions devraient être impliquées dans les recherches de clinique et d'industrialisation.

La médecine régénérative est un domaine qui suscite d'énormes espoirs, il est donc important d'apporter les moyens financiers, humains, réglementaires à la hauteur des attentes des patients.

- Abbasi, Naghmeh, Stephen Hamlet, Robert M. Love, et Nam-Trung Nguyen. 2020. « Porous scaffolds for bone regeneration ». *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* 5 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.
- Agence de la biomédecine. 2018. « Le rapport annuel du programme REIN 2018 ». 17.
- Aguirre-Chagala, Yanet E., Víctor Altuzar, Eleazar León-Sarabia, Julio C. Tinoco-Magaña, José M. Yañez-Limón, et Claudia Mendoza-Barrera. 2017. « Physicochemical Properties of Polycaprolactone/Collagen/Elastin Nanofibers Fabricated by Electrospinning ». *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 76 (juillet): 897-907. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.118>.
- Ahn, Hyunhee, Young Min Ju, Hironobu Takahashi, David F. Williams, James J. Yoo, Sang Jin Lee, Teruo Okano, et Anthony Atala. 2015. « Engineered Small Diameter Vascular Grafts by Combining Cell Sheet Engineering and Electrospinning Technology ». *Acta Biomaterialia* 16 (avril): 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.030>.
- Allaf, Rula M. 2018. « 4 Melt-molding technologies for 3D scaffold engineering ». In *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*, 75-100. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100979-6.00004-5>.
- Alliance de médecine régénérative du Canada. 2017. « Des chefs de file des cellules souches et de la médecine régénérative unissent leurs efforts afin de mieux positionner le Canada dans le domaine ». CellCan. 2017. <https://www.cellcan.com/98/AMRC.cellcan>.
- Alliance for Regenerative Medicine. 2019. « Advancing Gene, Cell, & Tissue-Based Therapies ». <https://alliancerm.org/publication/2019-annual-report/>.
- Almeida, Patricia E. de, Everett H. Meyer, Nigel G. Kooreman, Sebastian Diecke, Devaveena Dey, Veronica Sanchez-Freire, Shijun Hu, et al. 2014. « Transplanted Terminally Differentiated Induced Pluripotent Stem Cells Are Accepted by Immune Mechanisms Similar to Self-Tolerance ». *Nature Communications* 5 (mai): 3903. <https://doi.org/10.1038/ncomms4903>.
- Al-Nbaheen, May, Radhakrishnan Vishnubalaji, Dalia Ali, Amel Bouslimi, Fawzi Al-Jassir, Matthias Megges, Alessandro Prigione, James Adjaye, Moustapha Kassem, et Abdullah Aldahmash. 2013. « Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential ». *Stem Cell Reviews and Reports* 9 (1): 32-43. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9365-8>.
- Amir, Hadar, Thomas Touboul, Karen Sabatini, Divya Chhabra, Ibon Garitaonandia, Jeanne F. Loring, Robert Morey, et Louise C. Laurent. 2017. « Spontaneous Single-Copy Loss of TP53 in Human Embryonic Stem Cells Markedly Increases Cell Proliferation and Survival ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (4): 872-85. <https://doi.org/10.1002/stem.2550>.
- Amit, M., V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky, R. Coleman, et J. Itskovitz-Eldor. 2003. « Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells ». *Biology of Reproduction* 68 (6): 2150-56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012583>.
- Andrzejewska, Anna, Barbara Lukomska, et Mirosław Janowski. 2019. « Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost: MSCs: From Roots to Boost ». *STEM CELLS* 37 (7): 855-64.

<https://doi.org/10.1002/stem.3016>.

Anokye-Danso, Frederick, Chinmay M. Trivedi, Denise Juhr, Mudit Gupta, Zheng Cui, Ying Tian, Yuzhen Zhang, et al. 2011. « Highly Efficient MiRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 8 (4): 376-88. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>.

Aoto, Kaori, Kousei Ito, et Shigeki Aoki. 2018. « Complex Formation between Platelet-Derived Growth Factor Receptor β and Transforming Growth Factor β Receptor Regulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Cancer-Associated Fibroblasts ». *Oncotarget* 9 (75): 34090-102. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26124>.

Ara, Jahan, Jill See, Polina Mamontov, Ashleigh Hahn, Peter Bannerman, David Pleasure, et Judith B. Grinspan. 2008. « Bone Morphogenetic Proteins 4, 6, and 7 Are up-Regulated in Mouse Spinal Cord during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroscience Research* 86 (1): 125-35. <https://doi.org/10.1002/jnr.21462>.

Araki, Ryoko, Masahiro Uda, Yuko Hoki, Misato Sunayama, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Mayumi Sugiura, et al. 2013. « Negligible Immunogenicity of Terminally Differentiated Cells Derived from Induced Pluripotent or Embryonic Stem Cells ». *Nature* 494 (7435): 100-104. <https://doi.org/10.1038/nature11807>.
Atala, Anthony. 2009. *Growing New organs*. TED Med. https://www.ted.com/talks/anthony_atala_growing_new_organs/transcript.

Atala, Anthony, Stuart B. Bauer, Shay Soker, James J. Yoo, et Alan B. Retik. 2006. « Tissue-Engineered Autologous Bladders for Patients Needing Cystoplasty ». *Lancet (London, England)* 367 (9518): 1241-46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68438-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68438-9).

Augustin, Mona Maria. 2012. « Preconditioning Methods in Cell Therapy of the Heart. » Helsinki.
Aung, Aereas, Ivneet Singh Bhullar, Jomkuan Theprungsirikul, Shruti Krishna Davey, Han Liang Lim, Yu-Jui Chiu, Xuanyi Ma, et al. 2016. « 3D Cardiac Mtissues within a Microfluidic Device with Real-Time Contractile Stress Readout ». *Lab on a Chip* 16 (1): 153-62. <https://doi.org/10.1039/c5lc00820d>.

Avadhanam, Venkata S., Helen E. Smith, et Christopher Liu. 2015. « Keratoprostheses for Corneal Blindness: A Review of Contemporary Devices ». *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 9: 697-720. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S27083>.

Avivar-Valderas, Alvaro, Cristina Martín-Martín, Cristina Ramírez, Borja Del Río, Ramón Menta, Pablo Mancheño-Corvo, Maitane Ortiz-Virumbrales, et al. 2019. « Dissecting Allo-Sensitization After Local Administration of Human Allogeneic Adipose Mesenchymal Stem Cells in Perianal Fistulas of Crohn's Disease Patients ». *Frontiers in Immunology* 10: 1244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01244>.

Azzouna, Atf, et Habib Chouchane. 2011. « Cellules souches animales et humaines. Aspects scientifiques et questions éthiques ». In *Développement durable et autres questions d'actualité*, 307-24. Transversales. Dijon cedex: Educagri éditions. <https://doi.org/10.3917/edagri.legar.2011.01.0307>.

B

Bajetto, Adriana, Alessandra Pattarozzi, Alessandro Corsaro, Federica Barbieri, Antonio Daga, Alessia Bosio, Monica Gatti, Valerio Pisaturo, Rodolfo Siritto, et Tullio Florio. 2017. « Different Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Glioblastoma Stem Cells by Direct Cell Interaction or Via Released Soluble Factors ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 312. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00312>.

Banfi, A., A. Muraglia, B. Dozin, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, et R. Quarto. 2000. « Proliferation Kinetics and Differentiation Potential of Ex Vivo Expanded Human Bone Marrow Stromal Cells:

Implications for Their Use in Cell Therapy ». *Experimental Hematology* 28 (6): 707-15.
[https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(00\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00160-0).

Bao, Ji, Qiong Wu, Jiu Sun, Yongjie Zhou, Yujia Wang, Xin Jiang, Li Li, Yujun Shi, et Hong Bu. 2015. « Hemocompatibility Improvement of Perfusion-Decellularized Clinical-Scale Liver Scaffold through Heparin Immobilization ». *Scientific Reports* 5 (juin): 10756. <https://doi.org/10.1038/srep10756>.

Bason, Caterina, Marialucia Gallorini, et Anna C. Berardi. 2018. « The Extracellular Matrix, Growth Factors and Morphogens in Biomaterial Design and Tissue Engineering ». In *Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Biomaterials*, édité par Anna C. Berardi, 3-26. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77023-9_1.

Bazilevsky, Alexander V., Alexander L. Yarin, et Constantine M. Megaridis. 2007. « Co-electrospinning of Core-Shell Fibers Using a Single-Nozzle Technique ». *Langmuir* 23 (5): 2311-14.
<https://doi.org/10.1021/la063194q>.

Bejleri, Donald, et Michael E. Davis. 2019. « Decellularized Extracellular Matrix Materials for Cardiac Repair and Regeneration ». *Advanced Healthcare Materials* 8 (5): e1801217.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201801217>.

Belenguier, Germán, Ana Domingo-Muelas, Sacri R. Ferrón, José Manuel Morante-Redolat, et Isabel Fariñas. 2016. « Isolation, Culture and Analysis of Adult Subependymal Neural Stem Cells ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 91 (4-5): 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.005>.

Belmadani, Abdelhak, Phuong B. Tran, Dongjun Ren, et Richard J. Miller. 2006. « Chemokines Regulate the Migration of Neural Progenitors to Sites of Neuroinflammation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (12): 3182-91.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0156-06.2006>.

Bencherif, S. A., R. W. Sands, D. Bhatta, P. Arany, C. S. Verbeke, D. A. Edwards, et D. J. Mooney. 2012. « Injectable Preformed Scaffolds with Shape-Memory Properties ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (48): 19590-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211516109>.

Berniakovich, Ina, et Marco Giorgio. 2013. « Low Oxygen Tension Maintains Multipotency, Whereas Normoxia Increases Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (1): 2119-34. <https://doi.org/10.3390/ijms14012119>.

Bhagat, Vrushali, et Matthew L. Becker. 2017. « Degradable Adhesives for Surgery and Tissue Engineering ». *Biomacromolecules* 18 (10): 3009-39. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00969>.

Bharadwaj, Shantaram, Guihua Liu, Yingai Shi, Rongpei Wu, Bin Yang, Tongchuan He, Yuxin Fan, et al. 2013. « Multipotential Differentiation of Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Therapeutic Applications in Urology ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (9): 1840-56. <https://doi.org/10.1002/stem.1424>.

Bhutani, Kunal, Kristopher L. Nazor, Roy Williams, Ha Tran, Heng Dai, Željko Džakula, Edward H. Cho, et al. 2016. « Whole-Genome Mutational Burden Analysis of Three Pluripotency Induction Methods ». *Nature Communications* 7 (février): 10536. <https://doi.org/10.1038/ncomms10536>.

Bianco, Paolo, Pamela Gehron Robey, et Paul J. Simmons. 2008. « Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays ». *Cell Stem Cell* 2 (4): 313-19. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>.

Birey, Fikri, Jimena Andersen, Christopher D. Makinson, Saiful Islam, Wu Wei, Nina Huber, H. Christina Fan, et al. 2017. « Assembly of Functionally Integrated Human Forebrain Spheroids ». *Nature* 545 (7652): 54-59. <https://doi.org/10.1038/nature22330>.

Boer, Ulrike, Falk F. R. Buettner, Melanie Klingenberg, Georgios C. Antonopoulos, Heiko Meyer, Axel Haverich, et Mathias Wilhelmi. 2014. « Immunogenicity of Intensively Decellularized Equine Carotid Arteries Is Conferred by the Extracellular Matrix Protein Collagen Type VI ». *PLoS One* 9 (8): e105964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105964>.

Boland, Lauren K., Anthony J. Burand, Devlin T. Boyt, Hannah Dobroski, Lin Di, Jesse N. Liszewski, Michael V. Schrodt, Maria K. Frazer, Donna A. Santillan, et James A. Ankrum. 2019. « Nature vs. Nurture: Defining the Effects of Mesenchymal Stromal Cell Isolation and Culture Conditions on Resiliency to Palmitate Challenge ». *Frontiers in Immunology* 10: 1080. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01080>.

Boucher, Hélène. 2015. « Etude de l'influence des gènes régulateurs du rythme circadien dans la prolifération, la différenciation et la division de cellules souches humaines ». Biothérapies et Biotechnologies, UNIVERSITE PARIS.DIDEROT (Paris 7) SORBONNE PARIS CITE.

Brown, John W., Mark Ruzmetov, Osama Eltayeb, Mark D. Rodefeld, et Mark W. Turrentine. 2011. « Performance of SynerGraft Decellularized Pulmonary Homograft in Patients Undergoing a Ross Procedure ». *The Annals of Thoracic Surgery* 91 (2): 416-22; discussion 422-423. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.10.069>.

Buffington, Deborah A., Christopher J. Pino, Lijun Chen, Angela J. Westover, Gretchen Hageman, et H. David Humes. 2012. « Bioartificial Renal Epithelial Cell System (BRECS): A Compact, Cryopreservable Extracorporeal Renal Replacement Device ». *Cell Medicine* 4 (1): 33-43. <https://doi.org/10.3727/215517912X653328>.

Buganim, Yosef, Dina A. Faddah, Albert W. Cheng, Elena Itskovich, Styliani Markoulaki, Kibibi Ganz, Sandy L. Klemm, Alexander van Oudenaarden, et Rudolf Jaenisch. 2012. « Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase ». *Cell* 150 (6): 1209-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.023>.

Bussolati, Benedetta, Stefania Bruno, Cristina Grange, Stefano Buttiglieri, Maria Chiara Deregibus, Dario Cantino, et Giovanni Camussi. 2005. « Isolation of Renal Progenitor Cells from Adult Human Kidney ». *The American Journal of Pathology* 166 (2): 545-55. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62276-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62276-6).

C

Caen, J. 2010. « Les cellules souches du cordon et du placenta: de la recherche aux applications thérapeutiques ». *Bulletin De L Academie Nationale De Medecine* 194: 141-52.

Cai, Shenshen, Yanchun Liu, Xiao Zheng Shu, et Glenn D. Prestwich. 2005. « Injectable Glycosaminoglycan Hydrogels for Controlled Release of Human Basic Fibroblast Growth Factor ». *Biomaterials* 26 (30): 6054-67. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.012>.

Caiazzo, Massimiliano, Maria Teresa Dell'Anno, Elena Dvoretzkova, Dejan Lazarevic, Stefano Taverna, Damiana Leo, Tatyana D. Sotnikova, et al. 2011. « Direct Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Mouse and Human Fibroblasts ». *Nature* 476 (7359): 224-27. <https://doi.org/10.1038/nature10284>.

Calloni, Raquel, Elvira Alicia Aparicio Cordero, João Antonio P egas Henriques, et Diego Bonatto. 2013. « Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 22 (9): 1455-76. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0637>.

Campeau, Philippe M., Moutih Rafei, Marie-No elle Boivin, Ying Sun, Gregory A. Grabowski, et Jacques Galipeau. 2009. « Characterization of Gaucher Disease Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Reveals an Altered Inflammatory Secretome ». *Blood* 114 (15): 3181-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02->

205708.

Caplan, A. I. 1991. « Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5): 641-50. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.

Caplan, Arnold I., et James E. Dennis. 2006. « Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators ». *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076-84. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>.

Carreras-Planella, Laura, Marta Monguió-Tortajada, Francesc Enric Borràs, et Marcella Franquesa. 2019. « Immunomodulatory Effect of MSC on B Cells Is Independent of Secreted Extracellular Vesicles ». *Frontiers in Immunology* 10 (juin): 1288. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01288>.

Center for Biologics Evaluation and Research. s. d. « Guidance for Industry, Expedited Programs for Regenerative Medicine Therapies for Serious Conditions. » Food and Drug Administration. Consulté le 18 novembre 2020.

Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. 2003. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113 (5): 643-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00392-1).

Chandra, Prafulla K., Shay Soker, et Anthony Atala. 2020. « Chapter 1 - Tissue engineering: current status and future perspectives ». In *Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition)*, édité par Robert Lanza, Robert Langer, Joseph P. Vacanti, et Anthony Atala, 1-35. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6>.

Chandrawati, Rona. 2016. « Enzyme-Responsive Polymer Hydrogels for Therapeutic Delivery ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 241 (9): 972-79. <https://doi.org/10.1177/1535370216647186>.

Chang, Jen-Hsuan, Ping-Hsing Tsai, Kai-Yi Wang, Yu-Ting Wei, Shih-Hwa Chiou, et Chung-Yuan Mou. 2018. « Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Reprogramming Fibroblasts by Nonviral-Based Mesoporous Silica Nanoparticles ». *Scientific Reports* 8 (1): 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18324-8>.

Charbord, Pierre. 2010. « Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Historical Overview and Concepts ». *Human Gene Therapy* 21 (9): 1045-56. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.115>.

Chartier-Harlin, Marie-Christine, Jennifer Kachergus, Christophe Roumier, Vincent Mouroux, Xavier Douay, Sarah Lincoln, Clotilde Levecque, et al. 2004. « Alpha-Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson's Disease ». *Lancet (London, England)* 364 (9440): 1167-69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1).

Chatterjee, Sudipta, Patrick Chi-Leung Hui, et Chi-Wai Kan. 2018. « Thermoresponsive Hydrogels and Their Biomedical Applications: Special Insight into Their Applications in Textile Based Transdermal Therapy ». *Polymers* 10 (5). <https://doi.org/10.3390/polym10050480>.

Chen, Fa-Ming, et Xiaohua Liu. 2016. « Advancing Biomaterials of Human Origin for Tissue Engineering ». *Progress in Polymer Science* 53 (février): 86-168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.

Chen, Fa-Ming, Min Zhang, et Zhi-Fen Wu. 2010. « Toward Delivery of Multiple Growth Factors in Tissue Engineering ». *Biomaterials* 31 (24): 6279-6308. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.053>.

Chen, Guoping, Takashi Ushida, et Tetsuya Tateishi. 2001. « Development of biodegradable porous

- scaffolds for tissue engineering ». *SPECIAL ISSUE: Containing Papers from the Bionic Design Workshop 2000, Tsukuba, Japan, November 16-17, 2000* 17 (1): 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(01\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(01)00338-1).
- Chen, Jiekai, He Liu, Jing Liu, Jing Qi, Bei Wei, Jiaqi Yang, Hanquan Liang, et al. 2013. « H3K9 Methylation Is a Barrier during Somatic Cell Reprogramming into iPSCs ». *Nature Genetics* 45 (1): 34-42. <https://doi.org/10.1038/ng.2491>.
- Chen, Weiming, Yong Xu, Yanqun Liu, Zongxin Wang, Yaqiang Li, Gening Jiang, Xiumei Mo, et Guangdong Zhou. 2019. « Three-dimensional printed electrospun fiber-based scaffold for cartilage regeneration ». *Materials & Design* 179 (octobre): 107886. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.107886>.
- Chen, Yu-Chih, Maria E. Gonzalez, Boris Burman, Xintao Zhao, Talha Anwar, Mai Tran, Natasha Medhora, et al. 2019. « Mesenchymal Stem/Stromal Cell Engulfment Reveals Metastatic Advantage in Breast Cancer ». *Cell Reports* 27 (13): 3916-3926.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.084>.
- Choi, Jiho, Soohyun Lee, William Mallard, Kendell Clement, Guidantonio Malagoli Tagliazucchi, Hotae Lim, In Young Choi, et al. 2015. « A Comparison of Genetically Matched Cell Lines Reveals the Equivalence of Human iPSCs and ESCs ». *Nature Biotechnology* 33 (11): 1173-81. <https://doi.org/10.1038/nbt.3388>.
- Chung, Kwanghun, Jenelle Wallace, Sung-Yon Kim, Sandhiya Kalyanasundaram, Aaron S. Andalman, Thomas J. Davidson, Julie J. Mirzabekov, et al. 2013. « Structural and molecular interrogation of intact biological systems ». *Nature* 497 (7449): 332-37. <https://doi.org/10.1038/nature12107>.
- Colombo, Federica, Gianluca Sampogna, Giovanni Coccozza, Salman Yousuf Guraya, et Antonello Forgione. 2017. « Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives ». *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 5 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.05.002>.
- Commission européenne. 2012. « Proposition pour un règlement du parlement européen et du conseil sur les essais cliniques de produits de santé à usage humain et remplaçant la directive 2001/20/CE ». 2012. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/clinicaltrials/2012_07/proposal/2012_07_proposal_en.pdf. *Committee for medicinal products for human use*. s. d. 1 vol. Consulté le 18 novembre 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/minutes/minutes-chmp-meeting-20-23-july-2020_en.pdf.
- Constantin, Gabriela, Silvia Marconi, Barbara Rossi, Stefano Angiari, Laura Calderan, Elena Anghileri, Beatrice Gini, et al. 2009. « Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (10): 2624-35. <https://doi.org/10.1002/stem.194>.
- Conti, Luciano, et Elena Cattaneo. 2010. « Neural Stem Cell Systems: Physiological Players or in Vitro Entities? ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (3): 176-87. <https://doi.org/10.1038/nrn2761>.
- Coulombel, L. 2007. « [Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future] ». *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité* 35 (9): 806-10. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2007.07.022>.
- Cui, X., Y. Hartanto, et H. Zhang. 2017. « Advances in Multicellular Spheroids Formation ». *Journal of the Royal Society, Interface* 14 (127). <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
- Curtis, Maurice A., Monica Kam, Ulf Nannmark, Michelle F. Anderson, Mathilda Zetterstrom Axell, Carsten Wikkelso, Stig Holtås, et al. 2007. « Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension ». *Science (New York, N.Y.)* 315 (5816): 1243-49. <https://doi.org/10.1126/science.1136281>.

D

- Dankers, Patricia Y. W., Marja J. A. van Luyn, Ali Huizinga-van der Vlag, Gaby M. L. van Gemert, Arjen H. Petersen, E. W. Meijer, Henk M. Janssen, Anton W. Bosman, et Eliane R. Popa. 2012. « Development and In-Vivo Characterization of Supramolecular Hydrogels for Intrarenal Drug Delivery ». *Biomaterials* 33 (20): 5144-55. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.052>.
- Daughtry, Brittany, et Shoukhrat Mitalipov. 2014. « Concise Review: Parthenote Stem Cells for Regenerative Medicine: Genetic, Epigenetic, and Developmental Features ». *Stem Cells Translational Medicine* 3 (3): 290-98. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0127>.
- De Coppi, Paolo, et Anthony Atala. 2019. « Stem Cells From the Amnion ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 133-48. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00009-6>.
- De Vos, J. 2015. « iPS de grade clinique et applications ». *Résumés congrès de la SFTS septembre 2015 - n°4* 22 (4): 190. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2015.06.219>.
- De Witte, Tinke-Marie, Lidy E. Fratila-Apachitei, Amir A. Zadpoor, et Nicholas A. Peppas. 2018. « Bone Tissue Engineering via Growth Factor Delivery: From Scaffolds to Complex Matrices ». *Regenerative Biomaterials* 5 (4): 197-211. <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>.
- Delorme, Bruno, Jochen Ringe, Charalampos Pontikoglou, Julien Gaillard, Alain Langonné, Luc Sensebé, Danièle Noël, Christian Jorgensen, Thomas Häupl, et Pierre Charbord. 2009. « Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (5): 1142-51. <https://doi.org/10.1002/stem.34>.
- Desgres, Manon, et Philippe Menasché. 2019. « [Pluripotent stem cells for the treatment of heart failure: current status, persisting issues and perspectives] ». *Medecine Sciences: M/S* 35 (10): 771-78. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019155>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, et Em Horwitz. 2006. « Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement ». *Cytotherapy* 8 (4): 315-17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Domogatskaya, Anna, Sergey Rodin, Ariel Boutaud, et Karl Tryggvason. 2008. « Laminin-511 but Not -332, -111, or -411 Enables Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal In Vitro ». *STEM CELLS* 26 (11): 2800-2809. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0389>.
- Dosquet, Christine. 2010. « Mythe ou réalité : médecine régénérative ou thérapie cellulaire ? » In *Traité de bioéthique*, 480-92. Espace éthique - Poche. Toulouse: ERES. <https://doi.org/10.3917/eres.hirsc.2010.02.0480>.
- Du, Yiqin, Eric C. Carlson, Martha L. Funderburgh, David E. Birk, Eric Pearlman, Naxin Guo, Winston W.-Y. Kao, et James L. Funderburgh. 2009. « Stem Cell Therapy Restores Transparency to Defective Murine Corneas ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (7): 1635-42. <https://doi.org/10.1002/stem.91>.
- Duijvestein, Marjolijn, Anne Christine W. Vos, Helene Roelofs, Manon E. Wildenberg, Barbara B. Wendrich, Henricus W. Verspaget, Engelina M. C. Kooy-Winkelaar, et al. 2010. « Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Treatment for Refractory Luminal Crohn's Disease: Results of a Phase I Study ». *Gut* 59 (12): 1662-69. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215152>.

E

Ehrenreich, M., et Z. Ruszczak. 2006. « Update on Tissue-Engineered Biological Dressings ». *Tissue Engineering* 12 (9): 2407-24. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2407>.

Elliott, Martin J., Paolo De Coppi, Simone Speggorin, Derek Roebuck, Colin R. Butler, Edward Samuel, Claire Crowley, et al. 2012. « Stem-Cell-Based, Tissue Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 2-Year Follow-up Study ». *Lancet (London, England)* 380 (9846): 994-1000. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60737-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60737-5).

Elsanhoury, Ahmed, Ralf Sanzenbacher, Petra Reinke, et Mohamed Abou-El-Enein. 2017. « Accelerating Patients' Access to Advanced Therapies in the EU ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 7 (décembre): 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.08.005>.

English, Karen, Frank P. Barry, et Bernard P. Mahon. 2008. « Murine Mesenchymal Stem Cells Suppress Dendritic Cell Migration, Maturation and Antigen Presentation ». *Immunology Letters* 115 (1): 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.10.002>.

Escacena, Natalia, Elena Quesada-Hernández, Vivian Capilla-Gonzalez, Bernat Soria, et Abdelkrim Hmadcha. 2015. « Bottlenecks in the Efficient Use of Advanced Therapy Medicinal Products Based on Mesenchymal Stromal Cells ». *Stem Cells International* 2015: 895714. <https://doi.org/10.1155/2015/895714>.

European Medicines Agency. 2017. « CHMP assessment report Spherox Common name: spheroids of human autologous matrix-associated chondrocytes ». Institutional Procedure No. EMEA/H/C/002736/0000. EMA.

F

Fahy, Gregory M., Brian Wowk, et Jun Wu. 2006. « Cryopreservation of Complex Systems: The Missing Link in the Regenerative Medicine Supply Chain ». *Rejuvenation Research* 9 (2): 279-91. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.9.279>.

Fakunle, Eyitayo S., et Jeanne F. Loring. 2012. « Ethnically Diverse Pluripotent Stem Cells for Drug Development ». *Trends in Molecular Medicine* 18 (12): 709-16. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.10.007>.

Farahani, Rouhollah D., Martine Dubé, et Daniel Therriault. 2016. « Three-Dimensional Printing of Multifunctional Nanocomposites: Manufacturing Techniques and Applications ». *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 28 (28): 5794-5821. <https://doi.org/10.1002/adma.201506215>.

Fathi, Ezzatollah, Zohreh Sanaat, et Raheleh Farahzadi. 2019. « Mesenchymal Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia: A Focus on Mechanisms Involved and Therapeutic Concepts ». *Blood Research* 54 (3): 165-74. <https://doi.org/10.5045/br.2019.54.3.165>.

Feng, Nianhua, Qin Han, Jing Li, Shihua Wang, Hongling Li, Xinglei Yao, et Robert Chunhua Zhao. 2014. « Generation of Highly Purified Neural Stem Cells from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Sox1 Activation ». *Stem Cells and Development* 23 (5): 515-29. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0263>.

Ferreira, Joana R., Graciosa Q. Teixeira, Susana G. Santos, Mário A. Barbosa, Graça Almeida-Porada, et Raquel M. Gonçalves. 2018. « Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-Conditioning ». *Frontiers in Immunology* 9: 2837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>.

Fissell, William H., D. Brad Dyke, William F. Weitzel, Deborah A. Buffington, Angela J. Westover, Sherrill

M. MacKay, Jorge M. Gutierrez, et H. David Humes. 2002. « Bioartificial Kidney Alters Cytokine Response and Hemodynamics in Endotoxin-Challenged Uremic Animals ». *Blood Purification* 20 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1159/000046986>.

Fissell, William H., Liandi Lou, Simin Abrishami, Deborah A. Buffington, et H. David Humes. 2003. « Bioartificial Kidney Ameliorates Gram-Negative Bacteria-Induced Septic Shock in Uremic Animals ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (2): 454-61. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000045046.94575.96>.

Fomin, A. S., S. M. Barinov, V. M. Ievlev, V. V. Smirnov, B. P. Mikhailov, E. K. Belonogov, et N. A. Drozdova. 2008. « Nanocrystalline Hydroxyapatite Ceramics Produced by Low-Temperature Sintering after High-Pressure Treatment ». *Doklady Chemistry* 418 (1): 22-25. <https://doi.org/10.1134/S0012500808010084>.

Fortune Business Insights. 2019. « Regenerative Medicine Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook ». Business FBI100970. Global. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/regenerative-medicine-market-100970>.

France Rein. s. d. « Les maladies rénales ». francerein.org. Consulté le 18 novembre 2020. <https://www.francerein.org/articles/les-fonctions-du-rein>.

FRIEDENSTEIN, ALEXANDER JAKOVLEVICH, KLARA VASILJEVNA PETRAKOVA, ALEXANDRA IVANOVNA KUROLESOVA, et GALINA PETROVNA FROLOVA. 1968. « HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW ». *Transplantation* 6 (2). https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/1968/03000/HETEROTOPIC_TRANSPLANTS_OF_BONE_MARROW.9.aspx.

G

G, Radha, Balakumar S, Balaji Venkatesan, et Elangovan Vellaichamy. 2017. « A novel nano-hydroxyapatite — PMMA hybrid scaffolds adopted by conjugated thermal induced phase separation (TIPS) and wet-chemical approach: Analysis of its mechanical and biological properties ». *Materials Science and Engineering: C* 75 (juin): 221-28. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.133>.

Galipeau, Jacques. 2013. « The Mesenchymal Stromal Cells Dilemma--Does a Negative Phase III Trial of Random Donor Mesenchymal Stromal Cells in Steroid-Resistant Graft-versus-Host Disease Represent a Death Knell or a Bump in the Road? ». *Cytotherapy* 15 (1): 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.002>.

Galipeau, Jacques, et Luc Sensébé. 2018. « Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities ». *Cell Stem Cell* 22 (6): 824-33. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>.

Garitaonandia, Ibon, Hadar Amir, Francesca Sesillo Boscolo, Gerald K. Wambua, Heather L. Schultheisz, Karen Sabatini, Robert Morey, et al. 2015. « Increased Risk of Genetic and Epigenetic Instability in Human Embryonic Stem Cells Associated with Specific Culture Conditions ». *PloS One* 10 (2): e0118307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118307>.

George, Sunil K., Mehran Abolbashari, John D. Jackson, Tamer Aboushwareb, Anthony Atala, et James J. Yoo. 2016. « Potential Use of Autologous Renal Cells from Diseased Kidneys for the Treatment of Renal Failure ». *PloS One* 11 (10): e0164997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164997>.

Gigant, C., V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, P. Feugier, P. Bordigoni, et J. F. Stoltz. 2001. « [Quantitative expression of the adhesion receptors VLA-4, VLA-5, L-selectin, MAC-1, and ICAM-1 on the surface of CD34+ cells] ». *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine* 8 (6): 453-59. [https://doi.org/10.1016/s1246-7820\(01\)00198-7](https://doi.org/10.1016/s1246-7820(01)00198-7).

Giritharan, Gnanaratnam, Dusko Ilic, Matthew Gormley, et Ana Krtolica. 2011. « Human Embryonic Stem Cells Derived from Embryos at Different Stages of Development Share Similar Transcription Profiles ». *PloS One* 6 (10): e26570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026570>.

Gonfiotti, Alessandro, Massimo O. Jaus, Daniel Barale, Silvia Baiguera, Camilla Comin, Federico Lavorini, Giovanni Fontana, et al. 2014. « The First Tissue-Engineered Airway Transplantation: 5-Year Follow-up Results ». *Lancet (London, England)* 383 (9913): 238-44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62033-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62033-4).

Goonoo, Newsheen, et Archana Bhaw-Luximon. 2019. « Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair ». *RSC Advances* 9 (32): 18124-46. <https://doi.org/10.1039/C9RA02765C>.

Grégoire, Céline, Caroline Ritacco, Muriel Hannon, Laurence Seidel, Loïc Delens, Ludovic Belle, Sophie Dubois, et al. 2019. « Comparison of Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-Disease in a Humanized Mouse Model ». *Frontiers in Immunology* 10: 619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00619>.

Grundke, K., K. Pöschel, A. Synytska, R. Frenzel, A. Drechsler, M. Nitschke, A. L. Cordeiro, P. Uhlmann, et P. B. Welzel. 2015. « Experimental Studies of Contact Angle Hysteresis Phenomena on Polymer Surfaces – Toward the Understanding and Control of Wettability for Different Applications ». *Advances in Colloid and Interface Science* 222 (août): 350-76. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.012>.

Guasch, Géraldine, Markus Schober, H. Amalia Pasolli, Emily Belmont Conn, Lisa Polak, et Elaine Fuchs. 2007. « Loss of TGF β Signaling Destabilizes Homeostasis and Promotes Squamous Cell Carcinomas in Stratified Epithelia ». *Cancer Cell* 12 (4): 313-27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.020>.

Gunatillake, P. A., et R. Adhikari. 2003. « Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering ». *European Cells & Materials* 5 (mai): 1-16; discussion 16. <https://doi.org/10.22203/ecm.v005a01>.

Guo, Baolin, Anna Finne-Wistrand, et Ann-Christine Albertsson. 2011. « Universal Two-Step Approach to Degradable and Electroactive Block Copolymers and Networks from Combined Ring-Opening Polymerization and Post-Functionalization via Oxidative Coupling Reactions ». *Macromolecules* 44 (13): 5227-36. <https://doi.org/10.1021/ma2009595>.

H

Haddrick, Malcolm, et Peter B. Simpson. 2019. « Organ-on-a-Chip Technology: Turning Its Potential for Clinical Benefit into Reality ». *Drug Discovery Today* 24 (5): 1217-23. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.011>.

Halabian, Raheleh, Mehryar Habibi Roudkenar, Ali Jahanian-Najafabadi, Kamran Mousavi Hosseini, et Hossein Abdul Tehrani. 2015. « Co-Culture of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Lipocalin 2 with HK-2 and HEK293 Cells Protects the Kidney Cells against Cisplatin-Induced Injury ». *Cell Biology International* 39 (2): 152-63. <https://doi.org/10.1002/cbin.10344>.

Hanna, Jacob, Krishanu Saha, Bernardo Pando, Jeroen van Zon, Christopher J. Lengner, Menno P. Creyghton, Alexander van Oudenaarden, et Rudolf Jaenisch. 2009. « Direct Cell Reprogramming Is a Stochastic Process Amenable to Acceleration ». *Nature* 462 (7273): 595-601. <https://doi.org/10.1038/nature08592>.

Haraguchi, Yuji, Tatsuya Shimizu, Tadashi Sasagawa, Hidekazu Sekine, Katsuhisa Sakaguchi, Tetsutaro Kikuchi, Waki Sekine, et al. 2012. « Fabrication of Functional Three-Dimensional Tissues by Stacking Cell Sheets in Vitro ». *Nature Protocols* 7 (5): 850-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.027>.

Haute Autorité de Santé. 2016. « HOLOCLAR (cellules souches limbiques autologues amplifiées), cellules souches pour transplantation autologue ». 2016. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2661389/fr/holoclar-cellules-souches-limbiques-autologues-amplifiees-cellules-souches-pour-transplantation-autologue.
———. 2020. « Transplantation d'îlots pancréatiques ». Institutionnel. <https://www.has-sante.fr>. juillet 2020.

Hawkins, Kate E, Tyson V Sharp, et Tristan R McKay. 2013. « The Role of Hypoxia in Stem Cell Potency and Differentiation ». *Regenerative Medicine* 8 (6): 771-82. <https://doi.org/10.2217/rme.13.71>.

« Hematopoietic Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers ». s. d. R&D Systems. Consulté le 18 novembre 2020. <https://www.rndsystems.com/pathways/hematopoietic-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>.

Hennessy, Kristin M., Beth E. Pollot, William C. Clem, Matthew C. Phipps, Amber A. Sawyer, Bonnie K. Culpepper, et Susan L. Bellis. 2009. « The Effect of Collagen I Mimetic Peptides on Mesenchymal Stem Cell Adhesion and Differentiation, and on Bone Formation at Hydroxyapatite Surfaces ». *Biomaterials* 30 (10): 1898-1909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.053>.

Herberts, Carla A., Marcel S. G. Kwa, et Harm P. H. Hermsen. 2011. « Risk Factors in the Development of Stem Cell Therapy ». *Journal of Translational Medicine* 9 (mars): 29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-29>.

Highley, Christopher B., Christopher B. Rodell, et Jason A. Burdick. 2015. « Direct 3D Printing of Shear-Thinning Hydrogels into Self-Healing Hydrogels ». *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 27 (34): 5075-79. <https://doi.org/10.1002/adma.201501234>.

Hirvonen, Tia. 2014. « Glycan Binding Proteins in Therapeutic Mesenchymal Stem Cell Research. » Helsinki.

Hmadcha, Abdelkrim, Alejandro Martin-Montalvo, Benoit R. Gauthier, Bernat Soria, et Vivian Capilla-Gonzalez. 2020. « Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>.

Hoffman, Lisa M., et Melissa K. Carpenter. 2005. « Characterization and Culture of Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 23 (6): 699-708. <https://doi.org/10.1038/nbt1102>.

Hosoyama, Katsuhiko, Caitlin Lazurko, Marcelo Muñoz, Christopher D. McTiernan, et Emilio I. Alarcon. 2019. « Peptide-Based Functional Biomaterials for Soft-Tissue Repair ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7: 205. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00205>.

Hu, Xingbin, Mayra Garcia, Lihong Weng, Xiaoman Jung, Jodi L. Murakami, Bijender Kumar, Charles D. Warden, Ivan Todorov, et Ching-Cheng Chen. 2016. « Identification of a common mesenchymal stromal progenitor for the adult haematopoietic niche ». *Nature Communications* 7 (1): 13095. <https://doi.org/10.1038/ncomms13095>.

Hügler, Thomas, et Jacob M. van Laar. 2010. « Allogeneic Stem Cell Transplantation for Rheumatic Autoimmune Diseases ». *F1000 Medicine Reports* 2 (mars). <https://doi.org/10.3410/M2-22>.

Huh, Dongeun, Geraldine A. Hamilton, et Donald E. Ingber. 2011. « From 3D Cell Culture to Organs-on-Chips ». *Trends in Cell Biology* 21 (12): 745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.

Humes, H. D., D. A. Buffington, S. M. MacKay, A. J. Funke, et W. F. Weitzel. 1999. « Replacement of Renal Function in Uremic Animals with a Tissue-Engineered Kidney ». *Nature Biotechnology* 17 (5): 451-55. <https://doi.org/10.1038/8626>.

Humes, H. D., J. C. Krauss, D. A. Cieslinski, et A. J. Funke. 1996. « Tubulogenesis from Isolated Single

Cells of Adult Mammalian Kidney: Clonal Analysis with a Recombinant Retrovirus ». *The American Journal of Physiology* 271 (1 Pt 2): F42-49. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.1.F42>.

Humes, H. David, William H. Fissell, William F. Weitzel, Deborah A. Buffington, Angela J. Westover, Sherrill M. MacKay, et Jorge M. Gutierrez. 2002. « Metabolic Replacement of Kidney Function in Uremic Animals with a Bioartificial Kidney Containing Human Cells ». *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 39 (5): 1078-87. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.32792>.

Humes, H. David, Sherrill M. Mackay, Angela J. Funke, et Deborah A. Buffington. 1999. « Tissue engineering of a bioartificial renal tubule assist device: In vitro transport and metabolic characteristics ». *Kidney International* 55 (6): 2502-14. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00486.x>.

Humes, H. David, William F. Weitzel, Robert H. Bartlett, Fresca C. Swaniker, et Emil P. Paganini. 2003. « Renal Cell Therapy Is Associated with Dynamic and Individualized Responses in Patients with Acute Renal Failure ». *Blood Purification* 21 (1): 64-71. <https://doi.org/10.1159/000067864>.

Humes, H. David, William F. Weitzel, Robert H. Bartlett, Fresca C. Swaniker, Emil P. Paganini, Jack R. Luderer, et Joseph Sobota. 2004. « Initial Clinical Results of the Bioartificial Kidney Containing Human Cells in ICU Patients with Acute Renal Failure ». *Kidney International* 66 (4): 1578-88. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00923.x>.

Hunt, Geoffrey C., Purva Singh, et Jean E. Schwarzbauer. 2012. « Endogenous Production of Fibronectin Is Required for Self-Renewal of Cultured Mouse Embryonic Stem Cells ». *Experimental Cell Research* 318 (15): 1820-31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.06.009>.

Hussein, Samer M. I., et Andras A. Nagy. 2012. « Progress Made in the Reprogramming Field: New Factors, New Strategies and a New Outlook ». *Current Opinion in Genetics & Development* 22 (5): 435-43. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.08.007>.

I

Ieda, Masaki, Ji-Dong Fu, Paul Delgado-Olguin, Vasanth Vedantham, Yohei Hayashi, Benoit G. Bruneau, et Deepak Srivastava. 2010. « Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors ». *Cell* 142 (3): 375-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002>.

Ikada, Yoshito. 2006. *Tissue engineering: fundamentals and applications*. 1st ed. Interface science and technology, v. 8. Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier.

J

Jan, Edward, et Nicholas A. Kotov. 2007. « Successful Differentiation of Mouse Neural Stem Cells on Layer-by-Layer Assembled Single-Walled Carbon Nanotube Composite ». *Nano Letters* 7 (5): 1123-28. <https://doi.org/10.1021/nl0620132>.

Jang, Jinah, Hun-Jun Park, Seok-Won Kim, Heejin Kim, Ju Young Park, Soo Jin Na, Hyeon Ji Kim, et al. 2017. « 3D Printed Complex Tissue Construct Using Stem Cell-Laden Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for Cardiac Repair ». *Biomaterials* 112: 264-74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.026>.

Jayo, Manuel J., Deepak Jain, John W. Ludlow, Richard Payne, Belinda J. Wagner, Gordon McLorie, et Timothy A. Bertram. 2008. « Long-Term Durability, Tissue Regeneration and Neo-Organ Growth during Skeletal Maturation with a Neo-Bladder Augmentation Construct ». *Regenerative Medicine* 3 (5): 671-82. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.5.671>.

Jenkins, Thomas Lee, et Dianne Little. 2019. « Synthetic Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering: Cellular Responses to Fiber Parameters ». *NPJ Regenerative Medicine* 4: 15. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0076-5>.

Ji, Shen, et Murat Guvendiren. 2017. « Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5: 23. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00023>.

Jia, Weitao, P. Selcan Gungor-Ozkerim, Yu Shrike Zhang, Kan Yue, Kai Zhu, Wanjun Liu, Qingment Pi, et al. 2016. « Direct 3D Bioprinting of Perfusable Vascular Constructs Using a Blend Bioink ». *Biomaterials* 106: 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038>.

Johnston, Kimberly A., Angela J. Westover, Alvaro Rojas-Pena, Deborah A. Buffington, Christopher J. Pino, Peter L. Smith, et H. David Humes. 2017. « Development of a Wearable Bioartificial Kidney Using the Bioartificial Renal Epithelial Cell System (BRECS) ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11 (11): 3048-55. <https://doi.org/10.1002/term.2206>.

Joseph, David B., Joseph G. Borer, Roger E. De Filippo, Steve J. Hodges, et Gordon A. McLorie. 2014. « Autologous Cell Seeded Biodegradable Scaffold for Augmentation Cystoplasty: Phase II Study in Children and Adolescents with Spina Bifida ». *The Journal of Urology* 191 (5): 1389-95. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.10.103>.

Jungst, Tomasz, Willi Smolan, Kristin Schacht, Thomas Scheibel, et Jürgen Groll. 2016. « Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels ». *Chemical Reviews* 116 (3): 1496-1539. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00303>.

K

Kalimuthu, Senthilkumar, Ji Min Oh, Prakash Gangadaran, Liya Zhu, Ho Won Lee, Ramya Lakshmi Rajendran, Se Hwan Baek, et al. 2017. « In Vivo Tracking of Chemokine Receptor CXCR4-Engineered Mesenchymal Stem Cell Migration by Optical Molecular Imaging ». *Stem Cells International* 2017: 8085637. <https://doi.org/10.1155/2017/8085637>.

Kang, Hyun-Wook, Sang Jin Lee, In Kap Ko, Carlos Kengla, James J. Yoo, et Anthony Atala. 2016. « A 3D Bioprinting System to Produce Human-Scale Tissue Constructs with Structural Integrity ». *Nature Biotechnology* 34 (3): 312-19. <https://doi.org/10.1038/nbt.3413>.

Kao, W. J., et D. Lee. 2001. « In Vivo Modulation of Host Response and Macrophage Behavior by Polymer Networks Grafted with Fibronectin-Derived Biomimetic Oligopeptides: The Role of RGD and PHSRN Domains ». *Biomaterials* 22 (21): 2901-9. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00037-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00037-0).

Keselowsky, Benjamin G., David M. Collard, et Andrés J. García. 2003. « Surface Chemistry Modulates Fibronectin Conformation and Directs Integrin Binding and Specificity to Control Cell Adhesion ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 66 (2): 247-59. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10537>.

———. 2005. « Integrin Binding Specificity Regulates Biomaterial Surface Chemistry Effects on Cell Differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 5953-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407356102>.

Kielar, Mariusz L., D. Rohan Jeyarajah, et Christopher Y. Lu. 2002. « The Regulation of Ischemic Acute Renal Failure by Extrarenal Organs ». *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 11 (4): 451-57. <https://doi.org/10.1097/00041552-200207000-00013>.

Kim, Hyung Keun, Ji Hyun Kim, Dae Sung Park, Kyung Soon Park, Seong Soo Kang, Jun Sik Lee, Myung Ho Jeong, et Taek Rim Yoon. 2012. « Osteogenesis Induced by a Bone Forming Peptide from the

Prodomain Region of BMP-7 ». *Biomaterials* 33 (29): 7057-63.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.036>.

Kim, In Gul, Mintai P. Hwang, Ping Du, Jaehoon Ko, Chul-won Ha, Sun Hee Do, et Kwideok Park. 2015. « Bioactive Cell-Derived Matrices Combined with Polymer Mesh Scaffold for Osteogenesis and Bone Healing ». *Biomaterials* 50 (mai): 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.054>.

Kim, Janghwan, Jem A. Efe, Saiyong Zhu, Maria Talantova, Xu Yuan, Shufen Wang, Stuart A. Lipton, Kang Zhang, et Sheng Ding. 2011. « Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Neural Progenitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (19): 7838-43.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103113108>.

Kim, Jong-Hoon, Jonathan M. Auerbach, José A. Rodríguez-Gómez, Iván Velasco, Denise Gavin, Nadya Lumelsky, Sang-Hun Lee, et al. 2002. « Dopamine Neurons Derived from Embryonic Stem Cells Function in an Animal Model of Parkinson's Disease ». *Nature* 418 (6893): 50-56.
<https://doi.org/10.1038/nature00900>.

Kim, Kyungsook, Rie Utoh, Kazuo Ohashi, Tetsutaro Kikuchi, et Teruo Okano. 2017. « Fabrication of Functional 3D Hepatic Tissues with Polarized Hepatocytes by Stacking Endothelial Cell Sheets in Vitro ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11 (7): 2071-80.
<https://doi.org/10.1002/term.2102>.

Kim, Sang-Soo, Heung Jae Park, Joungho Han, Cha Yong Choi, et Byung-Soo Kim. 2003. « Renal Tissue Reconstitution by the Implantation of Renal Segments on Biodegradable Polymer Scaffolds ». *Biotechnology Letters* 25 (18): 1505-8. <https://doi.org/10.1023/a:1025490718221>.

Kim, Yu Seon, Marjan Majid, Anthony J. Melchiorri, et Antonios G. Mikos. 2019. « Applications of Decellularized Extracellular Matrix in Bone and Cartilage Tissue Engineering ». *Bioengineering & Translational Medicine* 4 (1): 83-95. <https://doi.org/10.1002/btm2.10110>.

Kitahara, Hiroto, Hiroshi Yagi, Kazuki Tajima, Kazuma Okamoto, Akihiro Yoshitake, Ryo Aeba, Mikihiro Kudo, et al. 2016. « Heterotopic Transplantation of a Decellularized and Recellularized Whole Porcine Heart ». *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 22 (5): 571-79.
<https://doi.org/10.1093/icvts/ivw022>.

Klimanskaya, Irina. 2019. « Embryonic Stem Cells: Derivation, Properties, and Challenges ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 113-23. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00007-2>.

Klimek, Katarzyna, et Grazyna Ginalska. 2020. « Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications-A Review ». *Polymers* 12 (4).
<https://doi.org/10.3390/polym12040844>.

Ko, In Kap, Li Peng, Andrea Peloso, Charesa J. Smith, Abritee Dhal, Daniel B. Deegan, Cindy Zimmerman, et al. 2015. « Bioengineered Transplantable Porcine Livers with Re-Endothelialized Vasculature ». *Biomaterials* 40 (février): 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.027>.

Ko, In Kap, James J. Yoo, et Anthony Atala. 2019. « Regenerative Medicine Approaches for the Kidney ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 1165-77. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00066-7>.

Kolesky, David B., Kimberly A. Homan, Mark A. Skylar-Scott, et Jennifer A. Lewis. 2016. « Three-Dimensional Bioprinting of Thick Vascularized Tissues ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America 113 (12): 3179-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521342113>.

Krishna, Ohm D., et Kristi L. Kiick. 2010. « Protein- and Peptide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials ». *Biopolymers* 94 (1): 32-48. <https://doi.org/10.1002/bip.21333>.

Ku, Sherman, Elisabetta Soragni, Erica Campau, Elizabeth A. Thomas, Gulsah Altun, Louise C. Laurent, Jeanne F. Loring, Marek Napierala, et Joel M. Gottesfeld. 2010. « Friedreich's Ataxia Induced Pluripotent Stem Cells Model Intergenerational GAA·TTC Triplet Repeat Instability ». *Cell Stem Cell* 7 (5): 631-37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.09.014>.

Kurobe, Hirotugu, Mark W. Maxfield, Christopher K. Breuer, et Toshiharu Shinoka. 2012. « Concise Review: Tissue-Engineered Vascular Grafts for Cardiac Surgery: Past, Present, and Future ». *Stem Cells Translational Medicine* 1 (7): 566-71. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0044>.

Kurobe, Hirotugu, Mark W. Maxfield, Shuhei Tara, Kevin A. Rocco, Paul S. Bagi, Tai Yi, Brooks Udelsman, et al. 2015. « Development of Small Diameter Nanofiber Tissue Engineered Arterial Grafts ». *PloS One* 10 (4): e0120328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120328>.

Kuroda, Yutaka, Toshiyuki Kawai, Koji Goto, et Shuichi Matsuda. 2019. « Clinical Application of Injectable Growth Factor for Bone Regeneration: A Systematic Review ». *Inflammation and Regeneration* 39: 20. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0109-x>.

Kwon, Tae Gyun, James J. Yoo, et Anthony Atala. 2008. « Local and Systemic Effects of a Tissue Engineered Neobladder in a Canine Cystoplasty Model ». *The Journal of Urology* 179 (5): 2035-41. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.01.005>.

L

Lalu, Manoj M., Lauralyn McIntyre, Christina Pugliese, Dean Fergusson, Brent W. Winston, John C. Marshall, John Granton, Duncan J. Stewart, et Canadian Critical Care Trials Group. 2012. « Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials ». *PloS One* 7 (10): e47559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559>.

Lan, Ying-Wei, Kong-Bung Choo, Chuan-Mu Chen, Tsai-Hsien Hung, Young-Bin Chen, Chung-Hsing Hsieh, Han-Pin Kuo, et Kowit-Yu Chong. 2015. « Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Attenuate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *Stem Cell Research & Therapy* 6 (mai): 97. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0081-6>.

LeBleu, Valerie S., Yingqi Teng, Joyce T. O'Connell, David Charytan, Gerhard A. Müller, Claudia A. Müller, Hikaru Sugimoto, et Raghu Kalluri. 2013. « Identification of Human Epididymis Protein-4 as a Fibroblast-Derived Mediator of Fibrosis ». *Nature Medicine* 19 (2): 227-31. <https://doi.org/10.1038/nm.2989>.

Lechanteur, Chantal, Alexandra Briquet, Olivier Giet, Olivier Delloye, Etienne Baudoux, et Yves Beguin. 2016. « Clinical-Scale Expansion of Mesenchymal Stromal Cells: A Large Banking Experience ». *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 145. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0892-y>.

Lee, Audra, Jessica D. Kessler, Tracy-Ann Read, Constanze Kaiser, Denis Corbeil, Wieland B. Huttner, Jane E. Johnson, et Robert J. Wechsler-Reya. 2005. « Isolation of Neural Stem Cells from the Postnatal Cerebellum ». *Nature Neuroscience* 8 (6): 723-29. <https://doi.org/10.1038/nn1473>.

Lee, Chang Hun, Ho Joon Shin, In Hee Cho, Young-Mi Kang, In Ae Kim, Ki-Dong Park, et Jung-Woog Shin. 2005. « Nanofiber Alignment and Direction of Mechanical Strain Affect the ECM Production of Human ACL Fibroblast ». *Biomaterials* 26 (11): 1261-70.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.037>.

Lee, Mark H., David A. Brass, Ronit Morris, Russell J. Composto, et Paul Ducheyne. 2005. « The Effect of Non-Specific Interactions on Cellular Adhesion Using Model Surfaces ». *Biomaterials* 26 (14): 1721-30. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.026>.

Lee, Tong Ihn, Richard G. Jenner, Laurie A. Boyer, Matthew G. Guenther, Stuart S. Levine, Roshan M. Kumar, Brett Chevalier, et al. 2006. « Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125 (2): 301-13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>.

Lemmens, Robin, et Gary K. Steinberg. 2013. « Stem Cell Therapy for Acute Cerebral Injury: What Do We Know and What Will the Future Bring? » *Current Opinion in Neurology* 26 (6): 617-25. <https://doi.org/10.1097/WCO.000000000000023>.

Les entreprises du médicament. 2010. « Etude thérapie cellulaire “ des cellules pour la santé” ». édition 2010. <https://www.leem.org/sites/default/files/1473.pdf>.

Li, Ning, et Gilberto K. K. Leung. 2015. « Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update ». *BioMed Research International* 2015: 1-20. <https://doi.org/10.1155/2015/235195>.

Li, Wenlin, Woong Sun, Yu Zhang, Wanguo Wei, Rajesh Ambasudhan, Peng Xia, Maria Talantova, et al. 2011. « Rapid Induction and Long-Term Self-Renewal of Primitive Neural Precursors from Human Embryonic Stem Cells by Small Molecule Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (20): 8299-8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014041108>.

Li, Xiaoming, Xi Liu, Jin Huang, Yubo Fan, et Fu-zhai Cui. 2011. « Biomedical Investigation of CNT Based Coatings ». *Surface and Coatings Technology* 206 (4): 759-66. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.02.063>.

Li, Xue-Jun, Xiaoqing Zhang, M. Austin Johnson, Zhi-Bo Wang, Timothy Lavaute, et Su-Chun Zhang. 2009. « Coordination of Sonic Hedgehog and Wnt Signaling Determines Ventral and Dorsal Telencephalic Neuron Types from Human Embryonic Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 136 (23): 4055-63. <https://doi.org/10.1242/dev.036624>.

Liang, Dehai, Benjamin S. Hsiao, et Benjamin Chu. 2007. « Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (14): 1392-1412. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.021>.

Liao, Susan, Bojun Li, Zuwei Ma, He Wei, Casey Chan, et Seeram Ramakrishna. 2006. « Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration ». *Biomedical Materials* 1 (3): R45-53. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/3/r01>.

Liem, K. F., G. Tremml, H. Roelink, et T. M. Jessell. 1995. « Dorsal Differentiation of Neural Plate Cells Induced by BMP-Mediated Signals from Epidermal Ectoderm ». *Cell* 82 (6): 969-79. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90276-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90276-7).

Lin, Fangming, Ashley Moran, et Peter Igarashi. 2005. « Intrarenal Cells, Not Bone Marrow-Derived Cells, Are the Major Source for Regeneration in Postischemic Kidney ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (7): 1756-64. <https://doi.org/10.1172/JCI23015>.

Lin, Y.-D., C.-Y. Luo, Y.-N. Hu, M.-L. Yeh, Y.-C. Hsueh, M.-Y. Chang, D.-C. Tsai, et al. 2012. « Instructive Nanofiber Scaffolds with VEGF Create a Microenvironment for Arteriogenesis and Cardiac Repair ». *Science Translational Medicine* 4 (146): 146ra109-146ra109. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003841>.

- Lin, Zhen-Yu, Zhi-Xia Duan, Xiao-Dong Guo, Jing-Feng Li, Hong-Wei Lu, Qi-Xin Zheng, Da-Ping Quan, et Shu-Hua Yang. 2010. « Bone Induction by Biomimetic PLGA-(PEG-ASP)_n Copolymer Loaded with a Novel Synthetic BMP-2-Related Peptide in Vitro and in Vivo ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 144 (2): 190-95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.016>.
- Lind, Johan U., Travis A. Busbee, Alexander D. Valentine, Francesco S. Pasqualini, Hongyan Yuan, Moran Yadid, Sung-Jin Park, et al. 2017. « Instrumented Cardiac Microphysiological Devices via Multimaterial Three-Dimensional Printing ». *Nature Materials* 16 (3): 303-8. <https://doi.org/10.1038/nmat4782>.
- Lindgren, David, Anna-Karin Boström, Kristina Nilsson, Jennifer Hansson, Jonas Sjölund, Christina Möller, Karin Jirstrom, et al. 2011. « Isolation and Characterization of Progenitor-like Cells from Human Renal Proximal Tubules ». *The American Journal of Pathology* 178 (2): 828-37. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.026>.
- Linero, Itali, et Orlando Chaparro. 2014. « Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration ». *PloS One* 9 (9): e107001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107001>.
- Liu, Mei, Xin Zeng, Chao Ma, Huan Yi, Zeeshan Ali, Xianbo Mou, Song Li, Yan Deng, et Nongyue He. 2017. « Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering ». *Bone Research* 5: 17014. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>.
- Liu, Wanjun, Yu Shrike Zhang, Marcel A. Heinrich, Fabio De Ferrari, Hae Lin Jang, Syeda Mahwish Bakht, Mario Moisés Alvarez, et al. 2017. « Rapid Continuous Multimaterial Extrusion Bioprinting ». *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 29 (3). <https://doi.org/10.1002/adma.201604630>.
- Lobo, Anderson Oliveira, Samson Afewerki, Mirian Michele Machado de Paula, Paria Ghannadian, Fernanda Roberta Marciano, Yu Shrike Zhang, Thomas Jay Webster, et Ali Khademhosseini. 2018. « Electrospun Nanofiber Blend with Improved Mechanical and Biological Performance ». *International Journal of Nanomedicine* 13: 7891-7903. <https://doi.org/10.2147/IJN.S175619>.
- Loh, Qiu Li, et Cleo Choong. 2013. « Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size ». *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 19 (6): 485-502. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0437>.
- Loo, Yihua, Anupama Lakshmanan, Ming Ni, Lai Ling Toh, Shi Wang, et Charlotte A. E. Hauser. 2015. « Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures ». *Nano Letters* 15 (10): 6919-25. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02859>.
- Lorson, Thomas, Sebastian Jaksch, Michael M. Lübtow, Tomasz Jüngst, Jürgen Groll, Tessa Lühmann, et Robert Luxenhofer. 2017. « A Thermogelling Supramolecular Hydrogel with Sponge-Like Morphology as a Cytocompatible Bioink ». *Biomacromolecules* 18 (7): 2161-71. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00481>.
- Loscertales, Ignacio G., Antonio Barrero, Manuel Márquez, Rubén Spretz, Raffet Velarde-Ortiz, et Gustavo Larsen. 2004. « Electrically Forced Coaxial Nanojets for One-Step Hollow Nanofiber Design ». *Journal of the American Chemical Society* 126 (17): 5376-77. <https://doi.org/10.1021/ja049443j>.
- Lu, Li, Guohu Chen, Jingjing Yang, Zhanjun Ma, Yang Yang, Yan Hu, Yubao Lu, Zhangqi Cao, Yan Wang, et Xuexi Wang. 2019. « Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Growth and Promote the Apoptosis of Glioma U251 Cells through Downregulation of the PI3K/AKT Signaling Pathway ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 112 (avril): 108625. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108625>.

Lü, Shuang Hong, Qiuxia Lin, Yu Na Liu, Qun Gao, Tong Hao, Yan Wang, Jin Zhou, et al. 2012. « Self-Assembly of Renal Cells into Engineered Renal Tissues in Collagen/Matrigel Scaffold in Vitro ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6 (10): 786-92. <https://doi.org/10.1002/term.484>.

Lücker, Petra B., Sahar Javaherian, John P. Soleas, Duncan Halverson, Peter W. Zandstra, et Alison P. McGuigan. 2014. « A Microgroove Patterned Multiwell Cell Culture Plate for High-Throughput Studies of Cell Alignment ». *Biotechnology and Bioengineering* 111 (12): 2537-48. <https://doi.org/10.1002/bit.25298>.

Lui, Kathy O, Paul J Fairchild, et Herman Waldmann. 2010. « Prospects for ensuring acceptance of ES cell-derived tissues ». europepmc.org. 30 septembre 2010.
<https://europepmc.org/books/n/stembook/prospectsforensuringacceptanceofescell/?extid=20614594&src=med#prospectsforensuringacceptanceofescell.fn1>.

M

Ma, P. X., et R. Langer. 1999. « Fabrication of Biodegradable Polymer Foams for Cell Transplantation and Tissue Engineering ». *Methods in Molecular Medicine* 18: 47-56. <https://doi.org/10.1385/0-89603-516-6:47>.

Ma, Peter X. 2008. « Biomimetic Materials for Tissue Engineering ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2): 184-98. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041>.

Ma, Tuo, Kai Gong, Qiang Ao, Yufang Yan, Bo Song, Hongyun Huang, Xiufang Zhang, et Yandao Gong. 2013. « Intracerebral Transplantation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alternatively Activates Microglia and Ameliorates Neuropathological Deficits in Alzheimer's Disease Mice ». *Cell Transplantation* 22 Suppl 1: S113-126. <https://doi.org/10.3727/096368913X672181>.

Maccario, Rita, Marina Podestà, Antonia Moretta, Angela Cometa, Patrizia Comoli, Daniela Montagna, Liane Daudt, et al. 2005. « Interaction of Human Mesenchymal Stem Cells with Cells Involved in Alloantigen-Specific Immune Response Favors the Differentiation of CD4+ T-Cell Subsets Expressing a Regulatory/Suppressive Phenotype ». *Haematologica* 90 (4): 516-25.

Maeda, Shuitsu, Jun Nishida, Takashi Sato, Yoshio Inomata, Tadashi Shimamura, et Saburo Horiuchi. 2005. « Changes in microstructure and gene expression of articular chondrocytes cultured in a tube under mechanical stress ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (2): 154-61. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.10.019>.

Magalon, Jeremy, Pauline François, Mélanie Velier, Fanny Grimaud, Julie Veran, Boris Calmels, et Florence Sabatier. 2018. « Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018 ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2018 (507): 34-43. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30355-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30355-1).

Maghsoudi, K., R. Jafari, G. Momen, et M. Farzaneh. 2017. « Micro-nanostructured polymer surfaces using injection molding: A review ». *Materials Today Communications* 13 (décembre): 126-43. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.09.013>.

Mandai, Michiko, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hiram, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, Masashi Fujihara, et al. 2017. « Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration ». *The New England Journal of Medicine* 376 (11): 1038-46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>.

Mandal, Biman B., et Subhas C. Kundu. 2008. « Non-Bioengineered Silk Gland Fibroin Protein: Characterization and Evaluation of Matrices for Potential Tissue Engineering Applications ». *Biotechnology and Bioengineering* 100 (6): 1237-50. <https://doi.org/10.1002/bit.21835>.

Mandrycky, Christian, Zongjie Wang, Keekyoung Kim, et Deok-Ho Kim. 2016. « 3D bioprinting for engineering complex tissues ». *Biotechnology Advances* 34 (4): 422-34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>.

- Mano, J. F., G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, et al. 2007. « Natural Origin Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Present Status and Some Moving Trends ». *Journal of the Royal Society, Interface* 4 (17): 999-1030. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220>.
- Maquet, V., et R. Jerome. 1997. « Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation ». *Materials Science Forum* 250: 15-42. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.250.15>.
- Marchant, Arnaud, Catherine Bruyns, Peter Vandenabeele, Martine Ducarme, Catherine Gérard, Anne Delvaux, Donat De Groot, Daniel Abramowicz, Thierry Velu, et Michel Goldman. 1994. « Interleukin-10 Controls Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor Production during Experimental Endotoxemia ». *European Journal of Immunology* 24 (5): 1167-71. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240524>.
- Mariani, Jessica, Maria Vittoria Simonini, Dean Palejev, Livia Tomasini, Gianfilippo Coppola, Anna M. Szekely, Tamas L. Horvath, et Flora M. Vaccarino. 2012. « Modeling Human Cortical Development in Vitro Using Induced Pluripotent Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12770-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202944109>.
- Maroszyńska, I., et P. Fiedor. 2000. « Leukocytes and Endothelium Interaction as Rate Limiting Step in the Inflammatory Response and a Key Factor in the Ischemia-Reperfusion Injury ». *Annals of Transplantation* 5 (4): 5-11.
- Martinaud, Christophe, Cédric Thepenier, Marina Trouillas, Juliette Peltzer, Georges Uzan, Marie-Caroline Le Bousse Kerdilès, Marie Prat, et Jean-Jacques Lataillade. 2010. « Les cellules souches mésenchymateuses : des cellules pour la médecine régénérative du futur ? » *Immuno-hématologie: Les cellules souches dans tous leurs états* 2010 (427): 47-59. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70732-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70732-2).
- Masgutov, Ruslan, Galina Masgutova, Adelya Mullakhmetova, Margarita Zhuravleva, Anna Shulman, Alexander Rogozhin, Valeriya Syromiatnikova, et al. 2019. « Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Applied in Fibrin Glue Stimulate Peripheral Nerve Regeneration ». *Frontiers in Medicine* 6: 68. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00068>.
- Master, Viraj A., Guanghui Wei, Wenhui Liu, et Laurence S. Baskin. 2003. « Urothelium Facilitates the Recruitment and Trans-Differentiation of Fibroblasts into Smooth Muscle in Acellular Matrix ». *The Journal of Urology* 170 (4 Pt 2): 1628-32. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000084407.24615.f8>.
- Mastrullo, Valeria, William Cathery, Eirini Velliou, Paolo Madeddu, et Paola Campagnolo. 2020. « Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? » *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 188. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00188>.
- Matsumoto, T., K. Tateda, S. Miyazaki, N. Furuya, A. Ohno, Y. Ishii, Y. Hirakata, et K. Yamaguchi. 1998. « Effect of Interleukin-10 on Gut-Derived Sepsis Caused by Pseudomonas Aeruginosa in Mice ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (11): 2853-57. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.2853>.
- Matsumura, Goki, Sachiko Miyagawa-Tomita, Toshiharu Shin'oka, Yoshito Ikada, et Hiromi Kurosawa. 2003. « First Evidence That Bone Marrow Cells Contribute to the Construction of Tissue-Engineered Vascular Autografts in Vivo ». *Circulation* 108 (14): 1729-34. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092165.32213.61>.
- Matsushima, Rie, Kwangwoo Nam, Yukiko Shimatsu, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, et Akio Kishida. 2014. « Decellularized dermis-polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces ». *Materials Science and Engineering: C* 35 (février): 354-62. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.007>.

- Mertens, Jerome, Apuã C. M. Paquola, Manching Ku, Emily Hatch, Lena Böhnke, Shauheen Ladjevardi, Sean McGrath, et al. 2015. « Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects ». *Cell Stem Cell* 17 (6): 705-18. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.001>.
- « Mesenchymal Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers ». 2014. R&D Systems. 2014. <https://www.rndsystems.com/pathways/mesenchymal-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>.
- Mestres, Gemma, Clemence Le Van, et Maria-Pau Ginebra. 2012. « Silicon-Stabilized α -Tricalcium Phosphate and Its Use in a Calcium Phosphate Cement: Characterization and Cell Response ». *Acta Biomaterialia* 8 (3): 1169-79. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.021>.
- Mintz, Benjamin R., et James A. Cooper. 2014. « Hybrid Hyaluronic Acid Hydrogel/Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffold Provides Mechanically Favorable Platform for Cartilage Tissue Engineering Studies ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 102 (9): 2918-26. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34957>.
- Monsour, M. J., R. Mohammed, S. D. Gorham, D. A. French, et R. Scott. 1987. « An Assessment of a Collagen/Vicryl Composite Membrane to Repair Defects of the Urinary Bladder in Rabbits ». *Urological Research* 15 (4): 235-38. <https://doi.org/10.1007/BF00262106>.
- Montgomery, Miles, Samad Ahadian, Locke Davenport Huyer, Mauro Lo Rito, Robert A. Civitarese, Rachel D. Vanderlaan, Jun Wu, et al. 2017. « Flexible Shape-Memory Scaffold for Minimally Invasive Delivery of Functional Tissues ». *Nature Materials* 16 (10): 1038-46. <https://doi.org/10.1038/nmat4956>.
- Mooney, D., L. Hansen, J. Vacanti, R. Langer, S. Farmer, et D. Ingber. 1992. « Switching from Differentiation to Growth in Hepatocytes: Control by Extracellular Matrix ». *Journal of Cellular Physiology* 151 (3): 497-505. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041510308>.
- Mooney, D. J., C. L. Mazzoni, C. Breuer, K. McNamara, D. Hern, J. P. Vacanti, et R. Langer. 1996. « Stabilized Polyglycolic Acid Fibre-Based Tubes for Tissue Engineering ». *Biomaterials* 17 (2): 115-24. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85756-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85756-5).
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, et D. van der Kooy. 1994. « Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Forebrain: A Relatively Quiescent Subpopulation of Subependymal Cells ». *Neuron* 13 (5): 1071-82. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90046-9).
- Mousavi, Saba, Ali Baradar Khoshfetrat, Neda Khatami, Mehri Ahmadian, et Reza Rahbarghazi. 2019. « Comparative Study of Collagen and Gelatin in Chitosan-Based Hydrogels for Effective Wound Dressing: Physical Properties and Fibroblastic Cell Behavior ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 518 (4): 625-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.102>.
- Müller, Franz-Josef, Bernhard M. Schuldt, Roy Williams, Dylan Mason, Gulsah Altun, Eirini P. Papapetrou, Sandra Danner, et al. 2011. « A Bioinformatic Assay for Pluripotency in Human Cells ». *Nature Methods* 8 (4): 315-17. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1580>.
- Murphy, J. Mary, Kenneth Dixon, Stephen Beck, Dennis Fabian, Andrew Feldman, et Frank Barry. 2002. « Reduced Chondrogenic and Adipogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Advanced Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 46 (3): 704-13. <https://doi.org/10.1002/art.10118>.

Nakatomi, Hirofumi, Toshihiko Kuriu, Shigeo Okabe, Shin-ichi Yamamoto, Osamu Hatano, Nobutaka Kawahara, Akira Tamura, Takaaki Kirino, et Masato Nakafuku. 2002. « Regeneration of Hippocampal Pyramidal Neurons after Ischemic Brain Injury by Recruitment of Endogenous Neural Progenitors ». *Cell* 110 (4): 429-41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00862-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00862-0).

NASDAQ MARKET NEWS. 2020. « The global cell therapy technologies market ». PM360. 4 novembre 2020. <https://www.pm360online.com/the-global-cell-therapy-technologies-market-is-projected-to-reach-usd-5-6-billion-by-2025-from-usd-2-8-billion-in-2020-at-a-cagr-of-14-4-from-2020-to-2025/>.

Nazor, Kristopher L., Gulsah Altun, Candace Lynch, Ha Tran, Julie V. Harness, Ileana Slavin, Ibon Garitaonandia, et al. 2012. « Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Derivatives ». *Cell Stem Cell* 10 (5): 620-34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.013>.

Németh, Krisztián, Asada Leelahavanichkul, Peter S. T. Yuen, Balázs Mayer, Alissa Parmelee, Kent Doi, Pamela G. Robey, et al. 2009. « Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Sepsis via Prostaglandin E(2)-Dependent Reprogramming of Host Macrophages to Increase Their Interleukin-10 Production ». *Nature Medicine* 15 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>.

« Neural Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers ». s. d. R&D systems. Consulté le 18 novembre 2020. <https://www.rndsystems.com/pathways/neural-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>.

Nguyen, Thuy-Uyen, Chris A. Bashur, et Vipuil Kishore. 2016. « Impact of Elastin Incorporation into Electrochemically Aligned Collagen Fibers on Mechanical Properties and Smooth Muscle Cell Phenotype ». *Biomedical Materials (Bristol, England)* 11 (2): 025008. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/2/025008>.

Nieponice, Alejandro, Timothy M. Maul, Joy M. Cumer, Lorenzo Soletti, et David A. Vorp. 2007. « Mechanical Stimulation Induces Morphological and Phenotypic Changes in Bone Marrow-Derived Progenitor Cells within a Three-Dimensional Fibrin Matrix ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 81 (3): 523-30. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31041>.

Nikolova, Maria P., et Murthy S. Chavali. 2019. « Recent Advances in Biomaterials for 3D Scaffolds: A Review ». *Bioactive Materials* 4 (décembre): 271-92. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>.

Nikolovski, J., E. Gulari, et H. D. Humes. 1999. « Design Engineering of a Bioartificial Renal Tubule Cell Therapy Device ». *Cell Transplantation* 8 (4): 351-64. <https://doi.org/10.1177/096368979900800403>.

Nishida, Kohji, Masayuki Yamato, Yasutaka Hayashida, Katsuhiko Watanabe, Kazuaki Yamamoto, Eijiro Adachi, Shigeru Nagai, et al. 2004. « Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium ». *The New England Journal of Medicine* 351 (12): 1187-96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040455>.

Niu, Guoguang, Jin-San Choi, Zhan Wang, Aleksander Skardal, Matthew Giegengack, et Shay Soker. 2014. « Heparin-Modified Gelatin Scaffolds for Human Corneal Endothelial Cell Transplantation ». *Biomaterials* 35 (13): 4005-14. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.033>.

Niwa, H., J. Miyazaki, et A. G. Smith. 2000. « Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells ». *Nature Genetics* 24 (4): 372-76. <https://doi.org/10.1038/74199>.

Nostro, Maria Cristina, et Gordon Keller. 2012. « Generation of Beta Cells from Human Pluripotent Stem

Cells: Potential for Regenerative Medicine ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23 (6): 701-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.06.010>.

O

Oliver, Juan A., Omar Maarouf, Faisal H. Cheema, Timothy P. Martens, et Qais Al-Awqati. 2004. « The Renal Papilla Is a Niche for Adult Kidney Stem Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (6): 795-804. <https://doi.org/10.1172/JCI20921>.

Orlando, Giuseppe, Christopher Booth, Zhan Wang, Giorgia Totonelli, Christina L. Ross, Emma Moran, Marcus Salvatori, et al. 2013. « Discarded Human Kidneys as a Source of ECM Scaffold for Kidney Regeneration Technologies ». *Biomaterials* 34 (24): 5915-25. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.033>.

Oura, T., A. B. Cosimi, et T. Kawai. 2017. « Chimerism-Based Tolerance in Organ Transplantation: Preclinical and Clinical Studies ». *Clinical and Experimental Immunology* 189 (2): 190-96. <https://doi.org/10.1111/cei.12969>.

P

Page, Henry, Peter Flood, et Emmanuel G. Reynaud. 2013. « Three-Dimensional Tissue Cultures: Current Trends and Beyond ». *Cell and Tissue Research* 352 (1): 123-31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1441-5>.

Pardis, Saeedi, Halabian Raheleh, Ali Abbas, et Fooladi Imani. 2019. « A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies ». *Stem Cell Investigation* 6: 34. <https://dx.doi.org/10.21037%2Fsci.2019.08.11>.

Parhi, Rabinarayan. 2017. « Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review ». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 7 (4): 515-30. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.064>.

Park, S. Y., S. Y. Park, S. Namgung, B. Kim, J. Im, J. Y. Kim, K. Sun, et al. 2007. « Carbon Nanotube Monolayer Patterns for Directed Growth of Mesenchymal Stem Cells ». *Advanced Materials* 19 (18): 2530-34. <https://doi.org/10.1002/adma.200600875>.

Partyka, Paul P., George A. Godsey, John R. Galie, Mary C. Kosciuk, Nimish K. Acharya, Robert G. Nagele, et Peter A. Galie. 2017. « Mechanical Stress Regulates Transport in a Compliant 3D Model of the Blood-Brain Barrier ». *Biomaterials* 115: 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.012>.

Paşca, Sergiu P., Thomas Portmann, Irina Voineagu, Masayuki Yazawa, Aleksandr Shcheglovitov, Anca M. Paşca, Branden Cord, et al. 2011. « Using iPSC-Derived Neurons to Uncover Cellular Phenotypes Associated with Timothy Syndrome ». *Nature Medicine* 17 (12): 1657-62. <https://doi.org/10.1038/nm.2576>.

Pasirayi, Godfrey, Vincent Auger, Simon M. Scott, Pattanathu K.S.M. Rahman, Meez Islam, Liam O'Hare, et Zulfiqur Ali. 2011. « Microfluidic Bioreactors for Cell Culturing: A Review ». *Micro and Nanosystemse* 3 (2): 137-60. <https://doi.org/10.2174/1876402911103020137>.

Pati, Falguni, Jinah Jang, Dong-Heon Ha, Sung Won Kim, Jong-Won Rhie, Jin-Hyung Shim, Deok-Ho Kim, et Dong-Woo Cho. 2014. « Printing Three-Dimensional Tissue Analogues with Decellularized Extracellular Matrix Bioink ». *Nature Communications* 5 (juin): 3935. <https://doi.org/10.1038/ncomms4935>.

Paull, Daniel, Ana Sevilla, Hongyan Zhou, Aana Kim Hahn, Hesed Kim, Christopher Napolitano, Alexander Tsankov, et al. 2015. « Automated, High-Throughput Derivation, Characterization and Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Methods* 12 (9): 885-92.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3507>.

Pérez, Laura M., Beatriz de Lucas, et Beatriz G. Gálvez. 2018. « Unhealthy Stem Cells: When Health Conditions Upset Stem Cell Properties ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 46 (5): 1999-2016. <https://doi.org/10.1159/000489440>.

Perico, Norberto, Federica Casiraghi, Martino Introna, Eliana Gotti, Marta Todeschini, Regiane Aparecida Cavinato, Chiara Capelli, et al. 2011. « Autologous Mesenchymal Stromal Cells and Kidney Transplantation: A Pilot Study of Safety and Clinical Feasibility ». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 6 (2): 412-22. <https://doi.org/10.2215/CJN.04950610>.

Phinney, Donald G., et Darwin J. Prockop. 2007. « Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (11): 2896-2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>.

Phipps, Matthew C., William C. Clem, Jessica M. Grunda, Gregory A. Clines, et Susan L. Bellis. 2012. « Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration ». *Biomaterials* 33 (2): 524-34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.080>.

Pina, S., R. F. Canadas, G. Jiménez, M. Perán, J. A. Marchal, R. L. Reis, et J. M. Oliveira. 2017. « Biofunctional Ionic-Doped Calcium Phosphates: Silk Fibroin Composites for Bone Tissue Engineering Scaffolding ». *Cells, Tissues, Organs* 204 (3-4): 150-63. <https://doi.org/10.1159/000469703>.

Pina, Sandra, et José M.F. Ferreira. 2010. « Brushite-Forming Mg-, Zn- and Sr-Substituted Bone Cements for Clinical Applications ». *Materials* 3 (1): 519-35. <https://doi.org/10.3390/ma3010519>.

Pino, Christopher J., et H. David Humes. 2019. « Extracorporeal Renal Replacement ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 1149-63. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00065-5>.

Pino, Christopher J., Angela J. Westover, Deborah A. Buffington, et H. David Humes. 2017. « Bioengineered Renal Cell Therapy Device for Clinical Translation ». *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)* 63 (3): 305-15. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000485>.

Pittenger, Mark F. 2008. « Mesenchymal Stem Cells from Adult Bone Marrow ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 449: 27-44. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_2.

Pittenger, Mark F., Dennis E. Discher, Bruno M. Péault, Donald G. Phinney, Joshua M. Hare, et Arnold I. Caplan. 2019. « Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress ». *Npj Regenerative Medicine* 4 (1): 22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.

Planat-Bénard, V., C. Menard, M. André, M. Puceat, A. Perez, J.-M. Garcia-Verdugo, L. Pénicaud, et L. Casteilla. 2004. « Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Adipose Tissue Stroma Cells ». *Circulation Research* 94 (2): 223-29. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109792.43271.47>.

Polchert, David, Justin Sobinsky, Gw Douglas, Martha Kidd, Ada Moadsiri, Eduardo Reina, Kristyn Genrich, et al. 2008. « IFN-Gamma Activation of Mesenchymal Stem Cells for Treatment and Prevention of Graft versus Host Disease ». *European Journal of Immunology* 38 (6): 1745-55. <https://doi.org/10.1002/eji.200738129>.

Poll, D. van, B. Parekkadan, I. H. M. Borel Rinkes, A. W. Tilles, et M. L. Yarmush. 2008. « Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs ». *Cellular and Molecular*

Bioengineering 1 (1): 42-50. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0001-2>.

Polo, Jose M., Susanna Liu, Maria Eugenia Figueroa, Warakorn Kulalert, Sarah Eminli, Kah Yong Tan, Effie Apostolou, et al. 2010. « Cell Type of Origin Influences the Molecular and Functional Properties of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 28 (8): 848-55. <https://doi.org/10.1038/nbt.1667>.

Prado-Prone, Gina, Masoomeh Bazzar, Maria Letizia Focarete, Jorge A. García-Macedo, Javier Perez-Orive, Clemente Ibarra, Cristina Velasquillo, et Phaedra Silva-Bermudez. 2020. « Single-Step, Acid-Based Fabrication of Homogeneous Gelatin-Polycaprolactone Fibrillar Scaffolds Intended for Skin Tissue Engineering ». *Biomedical Materials (Bristol, England)* 15 (3): 035001. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab673b>.

Prasertsung, Isarawut, Sorada Kanokpanont, Tanom Bunaprasert, Voranuch Thanakit, et Siriporn Damrongsakkul. 2008. « Development of Acellular Dermis from Porcine Skin Using Periodic Pressurized Technique ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 85 (1): 210-19. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30938>.

Primavera, Rosita, Bhavesh D. Kevadiya, Ganesh Swaminathan, Rudilyn Joyce Wilson, Angelo De Pascale, Paolo Decuzzi, et Avnesh S. Thakor. 2020. « Emerging Nano- and Micro-Technologies Used in the Treatment of Type-1 Diabetes ». *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/nano10040789>.

Prockop, Darwin J. 2009. « Repair of Tissues by Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs): Controversies, Myths, and Changing Paradigms ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (6): 939-46. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>.

R

Rafei, Mouthih, Jeremy Hsieh, Simon Fortier, Mengyang Li, Shala Yuan, Elena Birman, Kathy Forner, et al. 2008. « Mesenchymal Stromal Cell-Derived CCL2 Suppresses Plasma Cell Immunoglobulin Production via STAT3 Inactivation and PAX5 Induction ». *Blood* 112 (13): 4991-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166892>.

Rani, Sweta, Aideen E. Ryan, Matthew D. Griffin, et Thomas Ritter. 2015. « Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-Free Therapeutic Applications ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (5): 812-23. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44>.

Rastegar, Farbod, Deana Shenaq, Jiayi Huang, Wenli Zhang, Bing-Qiang Zhang, Bai-Cheng He, Liang Chen, et al. 2010. « Mesenchymal Stem Cells: Molecular Characteristics and Clinical Applications ». *World Journal of Stem Cells* 2 (4): 67-80. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i4.67>.

Revazova, E. S., N. A. Turovets, O. D. Kochetkova, L. B. Kindarova, L. N. Kuzmichev, J. D. Janus, et M. V. Pryzhkova. 2007. « Patient-Specific Stem Cell Lines Derived from Human Parthenogenetic Blastocysts ». *Cloning and Stem Cells* 9 (3): 432-49. <https://doi.org/10.1089/clo.2007.0033>.

Richards, Mark, Chui-Yee Fong, Woon-Khiong Chan, Peng-Cheang Wong, et Ariff Bongso. 2002. « Human Feeders Support Prolonged Undifferentiated Growth of Human Inner Cell Masses and Embryonic Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 20 (9): 933-36. <https://doi.org/10.1038/nbt726>.

Richman, C. M., R. S. Weiner, et R. A. Yankee. 1976. « Increase in Circulating Stem Cells Following Chemotherapy in Man ». *Blood* 47 (6): 1031-39.

Ringden, Olle, Arjang Baygan, Mats Remberger, Britt Gustafsson, Jacek Winiarski, Bitu Khoein, Guido

- Moll, Lena Klingspor, Magnus Westgren, et Behnam Sadeghi. 2018. « Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Treatment of Severe Acute Graft-Versus-Host Disease ». *Stem Cells Translational Medicine* 7 (4): 325-31. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0167>.
- Rivera, Francisco J., Alerie G. de la Fuente, Chao Zhao, Maria E. Silva, Ginez A. Gonzalez, Roman Wodnar, Martina Feichtner, et al. 2019. « Aging Restricts the Ability of Mesenchymal Stem Cells to Promote the Generation of Oligodendrocytes during Remyelination ». *Glia* 67 (8): 1510-25. <https://doi.org/10.1002/glia.23624>.
- Rizwan, Muhammad, John W. Tse, Aparna Nori, Kam W. Leong, et Evelyn K.F. Yim. 2019. « Cell-Substrate Interactions ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 437-68. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00027-8>.
- Rnjak-Kovacina, Jelena, Steven G. Wise, Zhe Li, Peter K.M. Maitz, Cara J. Young, Yiwei Wang, et Anthony S. Weiss. 2011. « Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering ». *Biomaterials* 32 (28): 6729-36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.065>.
- Robertson, Matthew J., Jessica L. Dries-Devlin, Stefan M. Kren, Jana S. Burchfield, et Doris A. Taylor. 2014. « Optimizing Recellularization of Whole Decellularized Heart Extracellular Matrix ». *PloS One* 9 (2): e90406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090406>.
- Rodin, Sergey, Anna Domogatskaya, Susanne Ström, Emil M. Hansson, Kenneth R. Chien, José Inzunza, Outi Hovatta, et Karl Tryggvason. 2010. « Long-Term Self-Renewal of Human Pluripotent Stem Cells on Human Recombinant Laminin-511 ». *Nature Biotechnology* 28 (6): 611-15. <https://doi.org/10.1038/nbt.1620>.
- Romanov, Yuri A., Veronika A. Svintsitskaya, et Vladimir N. Smirnov. 2003. « Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-like Cells from Umbilical Cord ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 21 (1): 105-10. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-105>.
- Ronconi, Elisa, Costanza Sagrinati, Maria Lucia Angelotti, Elena Lazzeri, Benedetta Mazzinghi, Lara Ballerini, Eliana Parente, et al. 2009. « Regeneration of Glomerular Podocytes by Human Renal Progenitors ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20 (2): 322-32. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070709>.
- Rosines, Eran, Kohei Johkura, Xing Zhang, Heidi J. Schmidt, Marvalyn Decambre, Kevin T. Bush, et Sanjay K. Nigam. 2010. « Constructing Kidney-like Tissues from Cells Based on Programs for Organ Development: Toward a Method of in Vitro Tissue Engineering of the Kidney ». *Tissue Engineering. Part A* 16 (8): 2441-55. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0548>.
- Rossignol, Julien, Kyle Fink, Kendra Davis, Steven Clerc, Andrew Crane, Jessica Matchynski, Steven Lowrance, et al. 2014. « Transplants of Adult Mesenchymal and Neural Stem Cells Provide Neuroprotection and Behavioral Sparing in a Transgenic Rat Model of Huntington's Disease ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (2): 500-509. <https://doi.org/10.1002/stem.1508>.
- Rowlands, Andrew S., et Justin J. Cooper-White. 2008. « Directing Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells Using Electrically Stimulated Conducting Polymer ». *Biomaterials* 29 (34): 4510-20. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.052>.
- Russell, Athena L., Rebecca Lefavor, Nisha Durand, Loren Glover, et Abba C. Zubair. 2018. « Modifiers of Mesenchymal Stem Cell Quantity and Quality ». *Transfusion* 58 (6): 1434-40. <https://doi.org/10.1111/trf.14597>.

Ryoo, Soo-Ryoon, Young-Kwan Kim, Mi-Hee Kim, et Dal-Hee Min. 2010. « Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies ». *ACS Nano* 4 (11): 6587-98. <https://doi.org/10.1021/nm1018279>.

S

Sacchetti, Benedetto, Alessia Funari, Stefano Michienzi, Silvia Di Cesare, Stefania Piersanti, Isabella Saggio, Enrico Tagliafico, et al. 2007. « Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment ». *Cell* 131 (2): 324-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>.

Sagrinati, Costanza, Giuseppe Stefano Netti, Benedetta Mazzinghi, Elena Lazzeri, Francesco Liotta, Francesca Frosali, Elisa Ronconi, et al. 2006. « Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (9): 2443-56. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010089>.

Sánchez-Pozos, Katy, Felipe Lee-Montiel, Rosalba Pérez-Villalva, Norma Uribe, Gerardo Gamba, Blanca Bazan-Perkins, et Norma A. Bobadilla. 2010. « Polymerized type I collagen reduces chronic cyclosporine nephrotoxicity ». *Nephrology Dialysis Transplantation* 25 (7): 2150-58. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq020>.

Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, et al. 2000. « Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro ». *Experimental Neurology* 164 (2): 247-56. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7389>.

Schacht, Kristin, Tomasz Jüngst, Matthias Schweinlin, Andrea Ewald, Jürgen Groll, et Thomas Scheibel. 2015. « Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (9): 2816-20. <https://doi.org/10.1002/anie.201409846>.

Schmidt, C. E., V. R. Shastri, J. P. Vacanti, et R. Langer. 1997. « Stimulation of Neurite Outgrowth Using an Electrically Conducting Polymer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (17): 8948-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.8948>.

Schwartz, Ketty. 2011. « Séminaire Ketty Schwartz 2011 : Biothérapies », 2011. <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/10017>.

Schwartz, Steven D., Carl D. Regillo, Byron L. Lam, Dean Elliott, Philip J. Rosenfeld, Ninel Z. Gregori, Jean-Pierre Hubschman, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Patients with Age-Related Macular Degeneration and Stargardt's Macular Dystrophy: Follow-up of Two Open-Label Phase 1/2 Studies ». *Lancet (London, England)* 385 (9967): 509-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3).

Schweizer, Michael T., Hao Wang, Trinity J. Bivalacqua, Alan W. Partin, Su Jin Lim, Carolyn Chapman, Rehab Abdallah, et al. 2019. « A Phase I Study to Assess the Safety and Cancer-Homing Ability of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Men with Localized Prostate Cancer ». *Stem Cells Translational Medicine* 8 (5): 441-49. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0230>.

Seiler, Andrea, Anke Visan, Roland Buesen, Elke Genschow, et Horst Spielmann. 2004. « Improvement of an in Vitro Stem Cell Assay for Developmental Toxicity: The Use of Molecular Endpoints in the Embryonic Stem Cell Test ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 18 (2): 231-40. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.015>.

Sekine, Hidekazu, Tatsuya Shimizu, Katsuhisa Sakaguchi, Izumi Dobashi, Masanori Wada, Masayuki Yamato, Eiji Kobayashi, Mitsuo Umezu, et Teruo Okano. 2013. « In Vitro Fabrication of Functional Three-

Dimensional Tissues with Perfusable Blood Vessels ». *Nature Communications* 4: 1399. <https://doi.org/10.1038/ncomms2406>.

Selman, K., et F. C. Kafatos. 1974. « Transdifferentiation in the Labial Gland of Silk Moths: Is DNA Required for Cellular Metamorphosis? » *Cell Differentiation* 3 (2): 81-94. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(74\)90030-x](https://doi.org/10.1016/0045-6039(74)90030-x).

Sensenig, Richard, Yulia Sapir, Cristin MacDonald, Smadar Cohen, et Boris Polyak. 2012. « Magnetic Nanoparticle-Based Approaches to Locally Target Therapy and Enhance Tissue Regeneration in Vivo ». *Nanomedicine (London, England)* 7 (9): 1425-42. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.109>.

Serakinci, Nedime, et Huseyin Cagsin. 2019. « Turning Stem Cells Homing Potential into Cancer Specific Drug Delivery Machines ». *Annals of Translational Medicine* 7 (Suppl 3): S148. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.06.30>.

Shafiee, Ashkan, et Anthony Atala. 2016. « Printing Technologies for Medical Applications ». *Trends in Molecular Medicine* 22 (3): 254-65. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.003>.

Shahbazi, Ebrahim, Sharif Moradi, Shiva Nemati, Leila Satarian, Mohsen Basiri, Hamid Gourabi, Narges Zare Mehrjardi, et al. 2016. « Conversion of Human Fibroblasts to Stably Self-Renewing Neural Stem Cells with a Single Zinc-Finger Transcription Factor ». *Stem Cell Reports* 6 (4): 539-51. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.02.013>.

Shammaa, Riam, Abed El-Hakim El-Kadiry, Jamilah Abusarah, et Moutih Rafei. 2020. « Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00072>.

Shen, Wei, Kechun Zhang, Julia A. Kornfield, et David A. Tirrell. 2006. « Tuning the Erosion Rate of Artificial Protein Hydrogels through Control of Network Topology ». *Nature Materials* 5 (2): 153-58. <https://doi.org/10.1038/nmat1573>.

Sheng, Guojun. 2015. « The Developmental Basis of Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) ». *BMC Developmental Biology* 15 (novembre): 44. <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0094-5>.

Sheridan, Steven D., Kraig M. Theriault, Surya A. Reis, Fen Zhou, Jon M. Madison, Laurence Daheron, Jeanne F. Loring, et Stephen J. Haggarty. 2011. « Epigenetic Characterization of the FMR1 Gene and Aberrant Neurodevelopment in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models of Fragile X Syndrome ». *PloS One* 6 (10): e26203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026203>.

Shin, Su Ryon, Sung Mi Jung, Momen Zalabany, Keekyoung Kim, Pinar Zorlutuna, Sang Bok Kim, Mehdi Nikkhah, et al. 2013. « Carbon-Nanotube-Embedded Hydrogel Sheets for Engineering Cardiac Constructs and Bioactuators ». *ACS Nano* 7 (3): 2369-80. <https://doi.org/10.1021/nn305559j>.

Shin'oka, T., Y. Imai, et Y. Ikada. 2001. « Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery ». *The New England Journal of Medicine* 344 (7): 532-33. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440717>.

Shizuru, Judith A., Robert S. Negrin, et Irving L. Weissman. 2005. « Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Clinical and Preclinical Regeneration of the Hematolymphoid System ». *Annual Review of Medicine* 56: 509-38. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152334>.

Siegel, Georg, Torsten Kluba, Ursula Hermanutz-Klein, Karen Bieback, Hinnak Northoff, et Richard Schäfer. 2013. « Phenotype, Donor Age and Gender Affect Function of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells ». *BMC Medicine* 11 (juin): 146. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-146>.

Sierra-Parraga, Jesus M., Ana Merino, Marco Eijken, Henri Leuvenink, Rutger Ploeg, Bjarne K. Møller, Bente Jespersen, Carla C. Baan, et Martin J. Hoogduijn. 2020. « Reparative Effect of Mesenchymal Stromal Cells on Endothelial Cells after Hypoxic and Inflammatory Injury ». *Stem Cell Research & Therapy* 11 (1): 352. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01869-3>.

Simpson, Fiona, Emilio I. Alarcon, Jöns Hilborn, Isabelle Brunette, et May Griffith. 2019. « Regenerative Medicine in the Cornea ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et Robert Nerem, 1115-29. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00063-1>.

Sinden, John D., Caroline Hicks, Paul Stroemer, Indira Vishnubhatla, et Randolph Corteling. 2017. « Human Neural Stem Cell Therapy for Chronic Ischemic Stroke: Charting Progress from Laboratory to Patients ». *Stem Cells and Development* 26 (13): 933-47. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0009>.

Sloff, Marije, Vasileios Simaioforidis, Rob de Vries, Egbert Oosterwijk, et Wout Feitz. 2014. « Tissue Engineering of the Bladder--Reality or Myth? A Systematic Review ». *The Journal of Urology* 192 (4): 1035-42. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.03.116>.

Smith, Laura A., Jonathan A. Beck, et Peter X. Ma. 2007. « Nanofibrous Scaffolds and Their Biological Effects ». In *Nanotechnologies for the Life Sciences*, édité par Challa S. S. R. Kumar, ntl0098. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527610419.ntl0098>.

Soffer, Leah, Xianyan Wang, Xiaohui Zhang, Jonathan Kluge, Luis Dorfmann, David L. Kaplan, et Gary Leisk. 2008. « Silk-Based Electrospun Tubular Scaffolds for Tissue-Engineered Vascular Grafts ». *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 19 (5): 653-64. <https://doi.org/10.1163/156856208784089607>.

Song, Jeremy J., Jacques P. Guyette, Sarah E. Gilpin, Gabriel Gonzalez, Joseph P. Vacanti, et Harald C. Ott. 2013. « Regeneration and Experimental Orthotopic Transplantation of a Bioengineered Kidney ». *Nature Medicine* 19 (5): 646-51. <https://doi.org/10.1038/nm.3154>.

Song, Ji-Young, Hyo Jeong Kang, Hyun Min Ju, Arum Park, Hyojung Park, Joon Seok Hong, Chong Jai Kim, Jae-Yoon Shim, Jinho Yu, et Jene Choi. 2019. « Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Extracts Ameliorate Atopic Dermatitis in Mice by Reducing the T Cell Responses ». *Scientific Reports* 9 (1): 6623. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42964-7>.

Song, Lei, Qiang Zhou, Ping Duan, Ping Guo, Dianwei Li, Yuan Xu, Songtao Li, Fei Luo, et Zehua Zhang. 2012. « Successful Development of Small Diameter Tissue-Engineering Vascular Vessels by Our Novel Integrally Designed Pulsatile Perfusion-Based Bioreactor ». *PloS One* 7 (8): e42569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042569>.

Song, Min Jae, et Kapil Bharti. 2016. « Looking into the Future: Using Induced Pluripotent Stem Cells to Build Two and Three Dimensional Ocular Tissue for Cell Therapy and Disease Modeling ». *Brain Research* 1638 (Pt A): 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.011>.

Sotiropoulou, Panagiota A., Sonia A. Perez, Angelos D. Gritzapis, Constantin N. Baxevanis, et Michael Papamichail. 2006. « Interactions between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (1): 74-85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359>.

Spaggiari, Grazia Maria, Heba Abdelrazik, Flavio Becchetti, et Lorenzo Moretta. 2009. « MSCs Inhibit Monocyte-Derived DC Maturation and Function by Selectively Interfering with the Generation of Immature DCs: Central Role of MSC-Derived Prostaglandin E2 ». *Blood* 113 (26): 6576-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203943>.

Spano, F., A. Quarta, C. Martelli, L. Ottobri, R. M. Rossi, G. Gigli, et L. Blasi. 2016. « Fibrous Scaffolds

Fabricated by Emulsion Electrospinning: From Hosting Capacity to in Vivo Biocompatibility ». *Nanoscale* 8 (17): 9293-9303. <https://doi.org/10.1039/c6nr00782a>.

Stadtfeld, Matthias, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, et Konrad Hochedlinger. 2008. « Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903): 945-49. <https://doi.org/10.1126/science.1162494>.

« Stem Cell Research ». s. d. Novus biologicals. Consulté le 18 novembre 2020. <https://www.novusbio.com/research-areas/stem-cells>.

Strelchenko, Nick, Oleg Verlinsky, Valeri Kukharenko, et Yury Verlinsky. 2004. « Morula-Derived Human Embryonic Stem Cells ». *Reproductive Biomedicine Online* 9 (6): 623-29. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61772-5](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61772-5).

Sugimoto, Hikaru, Valerie S. LeBleu, Dattatreyamurty Bosukonda, Peter Keck, Gangadhar Taduri, Wibke Bechtel, Hirokazu Okada, et al. 2012. « Activin-like Kinase 3 Is Important for Kidney Regeneration and Reversal of Fibrosis ». *Nature Medicine* 18 (3): 396-404. <https://doi.org/10.1038/nm.2629>.

Sullivan, David C., Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Daniel B. Deegan, Pedro M. Baptista, Tamer Aboushwareb, Anthony Atala, et James J. Yoo. 2012. « Decellularization Methods of Porcine Kidneys for Whole Organ Engineering Using a High-Throughput System ». *Biomaterials* 33 (31): 7756-64. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.023>.

Sutherland, H. J., P. M. Lansdorp, D. H. Henkelman, A. C. Eaves, et C. J. Eaves. 1990. « Functional Characterization of Individual Human Hematopoietic Stem Cells Cultured at Limiting Dilution on Supportive Marrow Stromal Layers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (9): 3584-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3584>.

T

Taapken, Seth M., Benjamin S. Nisler, Michael A. Newton, Tori L. Sampsel-Barron, Kimberly A. Leonhard, Erik M. McIntire, et Karen D. Montgomery. 2011. « Karyotypic Abnormalities in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 29 (4): 313-14. <https://doi.org/10.1038/nbt.1835>.

Takahashi, Hironobu, Masamichi Nakayama, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, et Teruo Okano. 2011. « Anisotropic Cell Sheets for Constructing Three-Dimensional Tissue with Well-Organized Cell Orientation ». *Biomaterials* 32 (34): 8830-38. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.006>.

Takahashi, Hironobu, Tatsuya Shimizu, et Teruo Okano. 2019. « Intelligent Surfaces for Cell Sheet Engineering ». In *Principles of Regenerative Medicine*, 469-84. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00028-X>.

Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.

Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

Tang, Yuewen, Pei Yu, et Lin Cheng. 2017. « Current Progress in the Derivation and Therapeutic Application of Neural Stem Cells ». *Cell Death & Disease* 8 (10): e3108. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.504>.

Taylor, Craig J., Sarah Peacock, Afzal N. Chaudhry, J. Andrew Bradley, et Eleanor M. Bolton. 2012. « Generating an iPSC Bank for HLA-Matched Tissue Transplantation Based on Known Donor and Recipient HLA Types ». *Cell Stem Cell* 11 (2): 147-52. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.014>.

The Ministry of Health, Labour and Welfare. s. d. « Strategy of SAKIGAKE ». The Ministry of Health, Labour and Welfare. Consulté le 18 novembre 2020. <https://www.mhlw.go.jp/english/policy/health-medical/pharmaceuticals/dl/140729-01-02.pdf>.

Theise, Neil D. 2005. « On experimental design and discourse in plasticity research ». *Stem Cell Reviews* 1 (1): 9-13. <https://doi.org/10.1385/SCR:1:1:009>.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et J. M. Jones. 1998. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1145-47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.

Thomson, R. C., M. C. Wake, M. J. Yaszemski, et A. G. Mikos. 1995. « Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs ». In *Biopolymers II*, édité par Nicholas A. Peppas et Robert S. Langer, 122:245-74. *Advances in Polymer Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3540587888_18.

Thoppey, Nagarajan Muthuraman, Jason R. Bochinski, Laura I. Clarke, et Russell E. Gorga. 2010. « Unconfined fluid electrospun into high quality nanofibers from a plate edge ». *Polymer* 51 (21): 4928-36. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.07.046>.

Tonsomboon, Khaow, et Michelle L. Oyen. 2013. « Composite Electrospun Gelatin Fiber-Alginate Gel Scaffolds for Mechanically Robust Tissue Engineered Cornea ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 21 (mai): 185-94. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.03.001>.

Tran, Richard T., Paul Thevenot, Yi Zhang, Dipendra Gyawali, Liping Tang, et Jian Yang. 2010. « Scaffold Sheet Design Strategy for Soft Tissue Engineering ». *Nature Materials* 3 (2): 1375-89. <https://doi.org/10.3390/ma3021375>.

Tresoldi, Claudia, Elena Bianchi, Alessandro Filippo Pellegata, Gabriele Dubini, et Sara Mantero. 2017. « Estimation of the Physiological Mechanical Conditioning in Vascular Tissue Engineering by a Predictive Fluid-Structure Interaction Approach ». *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 20 (10): 1077-88. <https://doi.org/10.1080/10255842.2017.1332192>.

Tsou, Yung-Hao, Joe Khoneisser, Ping-Chun Huang, et Xiaoyang Xu. 2016. « Hydrogel as a Bioactive Material to Regulate Stem Cell Fate ». *Bioactive Materials* 1 (1): 39-55. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.05.001>.

Turnbull, Gareth, Jon Clarke, Frédéric Picard, Philip Riches, Luanluan Jia, Fengxuan Han, Bin Li, et Wenmiao Shu. 2018. « 3D Bioactive Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering ». *Bioactive Materials* 3 (3): 278-314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>.

Tzezana, Roey, Eyal Zussman, et Shulamit Levenberg. 2008. « A Layered Ultra-Porous Scaffold for Tissue Engineering, Created via a Hydrospinning Method ». *Tissue Engineering. Part C, Methods* 14 (4): 281-88. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0201>.

U

- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, et Vito Pistoia. 2008. « Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (9): 726-36. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- Ullah, Imran, Raghavendra Baregundi Subbarao, et Gyu Jin Rho. 2015. « Human Mesenchymal Stem Cells - Current Trends and Future Prospective ». *Bioscience Reports* 35 (2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>.

V

- Van der Hauwaert, Cynthia, Grégoire Savary, Viviane Gnemmi, François Glowacki, Nicolas Pottier, Audrey Bouillez, Patrice Maboudou, et al. 2013. « Isolation and Characterization of a Primary Proximal Tubular Epithelial Cell Model from Human Kidney by CD10/CD13 Double Labeling ». *PloS One* 8 (6): e66750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066750>.

W

- Wainger, Brian J., Evangelos Kiskinis, Cassidy Mellin, Ole Wiskow, Steve S. W. Han, Jackson Sandoe, Numa P. Perez, et al. 2014. « Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons ». *Cell Reports* 7 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.019>.
- Walser, Jochen, Kathryn S Stok, Marco D Caversaccio, et Stephen J Ferguson. 2016. « Direct electrospinning of 3D auricle-shaped scaffolds for tissue engineering applications ». *Biofabrication* 8 (2): 025007. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/025007>.
- Wang, Pi-Chao, et Toshiaki Takezawa. 2005. « Reconstruction of Renal Glomerular Tissue Using Collagen Vitrigel Scaffold ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (6): 529-40. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.529>.
- Wang, Xiaocheng, Jiang Chang, et Chengtie Wu. 2018. « Bioactive Inorganic/Organic Nanocomposites for Wound Healing ». *Applied Materials Today* 11 (juin): 308-19. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.03.001>.
- Wang, Zongliang, Li Chen, Yu Wang, Xuesi Chen, et Peibiao Zhang. 2016. « Improved Cell Adhesion and Osteogenesis of Op-HA/PLGA Composite by Poly(Dopamine)-Assisted Immobilization of Collagen Mimetic Peptide and Osteogenic Growth Peptide ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (40): 26559-69. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b08733>.
- Wannemuehler, Todd J., Mariuxi C. Manukyan, Benjamin D. Brewster, Joshua Rouch, Jeffrey A. Poynter, Yue Wang, et Daniel R. Meldrum. 2012. « Advances in Mesenchymal Stem Cell Research in Sepsis ». *The Journal of Surgical Research* 173 (1): 113-26. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.053>.
- Ward, Heather H., Elsa Romero, Angela Welford, Gavin Pickett, Robert Bacallao, Vincent H. Gattone, Scott A. Ness, Angela Wandinger-Ness, et Tamara Roitbak. 2011. « Adult Human CD133/1(+) Kidney Cells Isolated from Papilla Integrate into Developing Kidney Tubules ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1812 (10): 1344-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.01.010>.
- Waterman, Ruth S., Suzanne L. Tomchuck, Sarah L. Henkle, et Aline M. Betancourt. 2010. « A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype ». *PloS One* 5 (4): e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>.
- Wei, Xin, Xue Yang, Zhi-peng Han, Fang-fang Qu, Li Shao, et Yu-fang Shi. 2013. « Mesenchymal Stem Cells: A New Trend for Cell Therapy ». *Acta Pharmacologica Sinica* 34 (6): 747-54.

<https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>.

Wen, Qingyun, Suzanne M. Mithieux, et Anthony S. Weiss. 2020. « Elastin Biomaterials in Dermal Repair ». *Trends in Biotechnology* 38 (3): 280-91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.

Westover, Angela J., Deborah A. Buffington, et H. D. Humes. 2012. « Enhanced Propagation of Adult Human Renal Epithelial Progenitor Cells to Improve Cell Sourcing for Tissue-Engineered Therapeutic Devices for Renal Diseases ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6 (8): 589-97. <https://doi.org/10.1002/term.471>.

Wognum, Albertus W., Allen C. Eaves, et Terry E. Thomas. 2003. « Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells ». *Archives of Medical Research* 34 (6): 461-75. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.09.008>.

Woodfield, T. B. F., M. Guggenheim, B. von Rechenberg, J. Riesle, C. A. van Blitterswijk, et V. Wedler. 2009. « Rapid Prototyping of Anatomically Shaped, Tissue-Engineered Implants for Restoring Congruent Articulating Surfaces in Small Joints ». *Cell Proliferation* 42 (4): 485-97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00608.x>.

X

Xing, Hao, Hudson Lee, Lijing Luo, et Themis R. Kyriakides. 2020. « Extracellular Matrix-Derived Biomaterials in Engineering Cell Function ». *Biotechnology Advances* 42 (octobre): 107421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>.

Y

Yamada, Mitsutoshi, Bjarki Johannesson, Ido Sagi, Lisa Cole Burnett, Daniel H. Kort, Robert W. Prosser, Daniel Paull, et al. 2014. « Human Oocytes Reprogram Adult Somatic Nuclei of a Type 1 Diabetic to Diploid Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 510 (7506): 533-36. <https://doi.org/10.1038/nature13287>.

Yamaleyeva, Liliya M., Nadia K. Guimaraes-Souza, Louis S. Krane, Sigrid Agcaoili, Kenneth Gyabaah, Anthony Atala, Tamer Aboushwareb, et James J. Yoo. 2012. « Cell Therapy with Human Renal Cell Cultures Containing Erythropoietin-Positive Cells Improves Chronic Kidney Injury ». *STEM CELLS Translational Medicine* 1 (5): 373-83. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0048>.

Yao, Lin, Zhan-rong Li, Wen-ru Su, Yong-ping Li, Miao-li Lin, Wen-xin Zhang, Yi Liu, Qian Wan, et Dan Liang. 2012. « Role of Mesenchymal Stem Cells on Cornea Wound Healing Induced by Acute Alkali Burn ». *PloS One* 7 (2): e30842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030842>.

Yoo, J. J., J. Meng, F. Oberpenning, et A. Atala. 1998. « Bladder Augmentation Using Allogenic Bladder Submucosa Seeded with Cells ». *Urology* 51 (2): 221-25. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(97\)00644-4](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(97)00644-4).

Yoo, James J., S. Ashkar, et A. Atala. 1996. « Creation Of Functional Kidney Structures With Excretion Of Urine-like Fluid In Vivo ». *Pediatrics* 98.

Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1917-20. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>.

Yuan, Haichao, Yue Zhuang, Ju Xiong, Wei Zhi, Liangren Liu, Qiang Wei, et Ping Han. 2013. « Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells-Seeded Bladder Acellular Matrix Grafts for Reconstruction of Bladder Defects in a Canine Model ». *PloS One* 8 (11): e80959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080959>.

Yuan, Hebao, et Yukiko M. Yamashita. 2010. « Germline Stem Cells: Stems of the next Generation ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (6): 730-36. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.013>.

Yuan, Xuegang, Timothy M. Logan, et Teng Ma. 2019. « Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy? » *Frontiers in Immunology* 10 (mai): 977. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00977>.

Z

Zagris, N. 2001. « Extracellular Matrix in Development of the Early Embryo ». *Micron (Oxford, England: 1993)* 32 (4): 427-38. [https://doi.org/10.1016/s0968-4328\(00\)00011-1](https://doi.org/10.1016/s0968-4328(00)00011-1).

Zander, Nicole E., Joshua A. Orlicki, Adam M. Rawlett, et Thomas P. Beebe. 2013. « Electrospun Polycaprolactone Scaffolds with Tailored Porosity Using Two Approaches for Enhanced Cellular Infiltration ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24 (1): 179-87. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4771-7>.

Zandstra, Jurjen, Marike M. van Beuge, Johan Zuidema, Arjen H. Petersen, Mark Staal, Luisa F. Duque, Sergio Rodriguez, et al. 2015. « Microsphere-Based Rapamycin Delivery, Systemic Versus Local Administration in a Rat Model of Renal Ischemia/Reperfusion Injury ». *Pharmaceutical Research* 32 (10): 3238-47. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1700-8>.

Zarei, Farshad, et Maryam Soleimanejad. 2018. « Role of Growth Factors and Biomaterials in Wound Healing ». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46 (sup1): 906-11. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1439836>.

Zeisberg, Michael, Jun-ichi Hanai, Hikaru Sugimoto, Tadanori Mammoto, David Charytan, Frank Strutz, et Raghu Kalluri. 2003. « BMP-7 Counteracts TGF-Beta1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Reverses Chronic Renal Injury ». *Nature Medicine* 9 (7): 964-68. <https://doi.org/10.1038/nm888>.

Zelikin, Alexander N., David M. Lynn, Jian Farhadi, Ivan Martin, Venkatram Shastri, et Robert Langer. 2002. « Erodible Conducting Polymers for Potential Biomedical Applications ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 41 (1): 141-44. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020104\)41:1<141::aid-anie141>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020104)41:1<141::aid-anie141>3.0.co;2-v).

Zhang, Shuguang. 2003. « Fabrication of Novel Biomaterials through Molecular Self-Assembly ». *Nature Biotechnology* 21 (10): 1171-78. <https://doi.org/10.1038/nbt874>.

Zhang, Wei, Yuexin Wang, Jiahui Kong, Meng Dong, Hongtao Duan, et Song Chen. 2017. « Therapeutic Efficacy of Neural Stem Cells Originating from Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Diabetic Retinopathy ». *Scientific Reports* 7 (1): 408. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00298-2>.

Zhang, Weixiang, Yun Zhu, Jia Li, Quanyi Guo, Jiang Peng, Shichen Liu, Jianhua Yang, et Yu Wang. 2016. « Cell-Derived Extracellular Matrix: Basic Characteristics and Current Applications in Orthopedic Tissue Engineering ». *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 22 (3): 193-207. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2015.0290>.

Zhang, Xue, Wen-Guang Guo, Helen Cui, Huan-Ye Liu, Yang Zhang, Werner E. G. Müller, et Fu-Zhai Cui. 2016. « In Vitro and in Vivo Enhancement of Osteogenic Capacity in a Synthetic BMP-2 Derived Peptide-Coated Mineralized Collagen Composite ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10 (2): 99-107. <https://doi.org/10.1002/term.1705>.

Zhang, Yuanyuan, et Anthony Atala. 2019. « Regenerative Medicine of the Bladder ». In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, édité par Anthony Atala, Robert Lanza, Antonios G. Mikos, et

- Robert Nerem, 1263-79. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00072-2>.
- Zhao, Tongbiao, Zhen-Ning Zhang, Zhili Rong, et Yang Xu. 2011. « Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 474 (7350): 212-15. <https://doi.org/10.1038/nature10135>.
- Zhao, Tongbiao, Zhen-ning Zhang, Peter D. Westenskow, Dilyana Todorova, Zheng Hu, Tongxiang Lin, Zhili Rong, et al. 2015. « Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 17 (3): 353-59. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.021>.
- Zhu, Xiang-Yang, Victor Urbieto-Caceres, James D. Krier, Stephen C. Textor, Amir Lerman, et Lilach O. Lerman. 2013. « Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Decrease Renal Injury in Experimental Swine Renal Artery Stenosis through Different Mechanisms ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (1): 117-25. <https://doi.org/10.1002/stem.1263>.
- Zouboulis, Christos C., James Adjaye, Hirohiko Akamatsu, Gerd Moe-Behrens, et Catherin Niemann. 2008. « Human Skin Stem Cells and the Ageing Process ». *Experimental Gerontology* 43 (11): 986-97. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.09.001>.
- Zuk, Patricia A., Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Prosper Benhaim, et Marc H. Hedrick. 2002. « Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4279-95. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>.
-

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

