



HAL
open science

Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire

Léa Pourchet

► **To cite this version:**

Léa Pourchet. Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire. Biotechnologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1232 . tel-02065562

HAL Id: tel-02065562

<https://theses.hal.science/tel-02065562v1>

Submitted on 12 Mar 2019

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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1232

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° accréditation
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biotechnologie

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2018, par :

Léa POURCHET

Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire

Devant le jury composé de :

Amédée, Joëlle
Blum, Loïc
Layrolle, Pierre
Letourneur, Didier
Marquette, Christophe
Taly, Valérie

Directrice de Recherche INSERM
Professeur des Universités, UCBL
Directeur de Recherche INSERM
Directeur de Recherche INSERM
Directeur de Recherche CNRS
Directrice de Recherche CNRS

Rapporteuse
Président
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Examinatrice

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Cette thèse a été un travail de longue haleine qui a été rendu possible grâce à toutes les personnes qui se sont investies directement dans ce projet. Je tenais à donc à faire une liste de remerciements (non-exhaustive) des personnes qui ont croisées mon chemin pendant ces années académiques. Alors merci...

À Christophe, d'avoir été le directeur de thèse rêvé

À mes rapporteurs le Dr Joëlle Amédée et le Dr Pierre Layrolle pour avoir acceptés de juger mon travail, ainsi que le Dr Valérie Taly et Le Dr Didier Letourneur pour avoir acceptés de participer à mon jury de thèse

À l'ensemble des membres de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de ces années : Agnès D, Agnès GE, Béa, Bastien, Marjorie, Fred, Meriem, Ophélie, Juju et Lolo, ainsi qu'au Pr Loïc Blum pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire

À toute l'équipe de 3d.FAB qui ne cesse de s'agrandir ! Mes remerciements les plus profonds :

- À Céline avec qui j'ai partagé bien plus qu'un bureau,
- À Edwin-Joeffrey pour tes explications des plus pédagogiques pour toute la partie rhéologie,
- À Emma pour avoir partagé des journées de manip' inoubliables avec une question qui restera pour toujours : est-ce que c'est conta ???
- À Célia qui a partagé mon bureau dans mes heures les plus sombres de la rédaction et qui a su garder un discours toujours bienveillant et encourageant,
- À tous les doctorants et stagiaires qui se sont succédés : Chloé (la petite), Nicolas, Alizée, Arthur, Olivier, Coralie

À toutes les personnes qui ont collaborées sur ce projet, un grand merci :

- À Amélie Thépot, CEO de LabSkin Creations qui a vu le potentiel de la technologie dès les premiers instants de notre rencontre,
- À toute l'équipe de LabSkin et du laboratoire des substituts cutanés pour le travail sur la peau,
- À Adrien Grelet de chez Tobeca®, de nous avoir fabriqué le premier prototype de bioprinter,
- À Astrid et Christel de IMoPa à Nancy pour tout le travail sur le cartilage,
- À Eric Olmos et Céline Loubière pour le travail sur la CFD,
- À Naïma pour toutes les coupes/marquages histologiques,
- À Nathalie Picollet-D'hahan et Emeline Groult pour leurs remarques pertinentes lors de mes CST

À mes anciennes tutrices de stages Catherine et Alexandra qui m'ont donné le goût de la recherche académique

À mes co-thésards, Dr Aymard, Dr Arhab et Dr Garcia qui ont été indispensables au maintien de ma santé mentale et qui ont toujours été présents dans les moments difficiles

comme dans les moments de joie. Sachez que nos discussions enflammées à la MDH font parties de mes meilleurs souvenirs de ces années académiques

À tous mes formidables amis, et je choisis de n'en citer aucun (surtout par peur d'en oublier). Mais vous saurez vous reconnaître et je vous suis éternellement reconnaissante d'exister

À Lydie (a.k.a Dond') d'avoir été un soutien sans faille et surtout d'avoir accepté la correction orthographique de cet ouvrage

À ma famille, belle-famille, petits et grands, de m'avoir entourée, questionnée, et écoutée

À mes parents, pour m'avoir toujours dit que c'était possible

À Simon (a.k.a George) mon frère préféré

À Maxence, pour tout.



Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. LA BIOIMPRESSION 3D	17
I.1 LE PROCEDE DE BIOIMPRESSION 3D	17
I.2 LES TECHNIQUES DE BIOIMPRESSION 3D	18
I.2.1 <i>Le jet d'encre</i>	18
I.2.1.1 Jet d'encre thermique	19
I.2.1.2 Jet d'encre piézoélectrique.....	20
I.2.2 <i>La bioextrusion</i>	21
I.2.3 <i>Dépôt de sphéroïdes pour la bioimpression 3D de structures tubulaires</i>	24
II. LES BIOMATERIAUX COMPOSANTS DE LA BIO-ENCRE	25
II.1 L'ALGINATE	25
II.1.1 <i>Description</i>	25
II.1.2 <i>Utilisation de l'alginate dans la bioimpression</i>	26
II.2 LA GELATINE	28
II.2.1 <i>Description</i>	28
II.2.2 <i>Utilisation de la gélatine dans la bioimpression</i>	28
II.3 LE FIBRINOGENE ET LA FIBRINE.....	30
II.3.1 <i>Description</i>	30
II.3.2 <i>Utilisation du fibrinogène dans la bioimpression 3D</i>	32
II.4 LE COLLAGENE.....	32
II.4.1 <i>Description</i>	32
II.4.2 <i>Utilisation du collagène dans la bioimpression</i>	33
II.5 L'ACIDE HYALURONIQUE	34
II.5.1 <i>Description</i>	34
II.5.2 <i>Utilisation de l'acide hyaluronique dans la bioimpression</i>	34
II.6 INFLUENCE DE LA CONTRAINTE DE CISAILLEMENT	35
II.7 SUPPORT CELLULAIRE POUR LA MATURATION TISSULAIRE	36
III. LA BIOIMPRESSION 3D DE TISSUS	37
III.1 LA PEAU	38
III.1.1 <i>Physiologie de la peau</i>	38
III.1.1.1 L'épiderme.....	38

III.1.1.2	La jonction dermo-épidermique.....	40
III.1.1.3	Le derme.....	40
III.1.1.3.1	Les cellules du derme	41
III.1.1.3.2	La matrice extracellulaire du derme	41
III.1.2	<i>Etude de la reconstruction de la peau in vitro par ingénierie tissulaire classique</i>	42
III.1.3	<i>La bioimpression 3D de peau</i>	44
III.2	LE CARTILAGE	50
III.2.1	<i>Physiologie du cartilage</i>	50
III.2.1.1	Les cellules du cartilage articulaire	50
III.2.1.2	La matrice extracellulaire du cartilage	51
III.2.2	<i>La reconstruction in vitro de cartilage par ingénierie tissulaire classique</i>	52
III.2.3	<i>La bioimpression de cartilage</i>	53
III.3	LE TISSU VASCULAIRE	59
III.3.1	<i>Physiologie de l'endothélium vasculaire</i>	59
III.3.1.1	Organisation générale	59
III.3.1.2	Les cellules endothéliales.....	60
III.3.2	<i>La reconstruction in vitro de vaisseaux par ingénierie tissulaire classique</i>	61
III.3.3	<i>La bioimpression 3D de vaisseaux</i>	62
III.3.3.1	Stratégies de vascularisation des tissus bioimprimés	62
III.3.3.1.1	Approche directe par extrusion basée sur un échafaudage	62
III.3.3.1.2	Approche indirecte par extrusion basée sur un échafaudage	64
III.4	AUTRES TISSUS BIOIMPRIMES HAUTEMENT SPECIFIQUES	69
III.4.1	<i>Le tissu cardiaque</i>	69
III.4.2	<i>Le tissu rénal</i>	71
IV.	METHODES DE CULTURE POUR LA MATURATION DES TISSUS : DU STATIQUE AU DYNAMIQUE.....	73
IV.1	CULTURE STATIQUE.....	73
IV.2	LES BIOREACTEURS POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE	74
IV.2.1	<i>Systèmes de bioréacteurs avec une contrainte de flux</i>	75
IV.2.2	<i>Systèmes de bioréacteurs pour une stimulation physique</i>	76
V.	CONCLUSIONS.....	78
	CHAPITRE 2 : PROTOCOLES.....	79
I.	TABLEAU DES REACTIFS.....	81
II.	PREPARATION DE LA BIO-ENCRE	82
II.1	PREPARATION DES SOLUTIONS MERES.....	82
II.2	SOURCES CELLULAIRES UTILISEES ET CONDITION DE CULTURE 2D	82
II.2.1	<i>NIH 3T3 eGFP</i>	82
II.2.2	<i>Fibroblastes</i>	83

II.2.3	HDMEC	83
II.2.4	HUVEC	83
II.2.5	CSM	84
III.	IMPRESSION	84
III.1	PREPARATION DE LA SERINGUE	84
III.2	UTILISATION DU LOGICIEL REPETIER	85
III.3	L'ETAPE DE POLYMERISATION	87
III.4	GESTION DE LA TEMPERATURE	88
IV.	SUIVI POST-IMPRESSION	89
IV.1	CUBES TEST	89
IV.2	GROS OBJETS	89
V.	METHODES DE CARACTERISATION	90
V.1	MICROSCOPIE OPTIQUE ET SUIVI DE LA GFP	90
V.2	METHODE DESTRUCTRICE	90
V.2.1	<i>Rhéologie</i>	90
V.2.2	<i>Histologie et immunohistochimie</i>	91
V.2.2.1	Les colorations de routine : histologie	91
V.2.2.2	Les différents marquages utilisés : immunohistochimie	92
V.2.2.2.1	Peau	92
V.2.2.2.2	Cartilage	92
V.2.2.2.3	Endothélium vasculaire	93
V.2.3	<i>Microscopie Electronique à Transmission</i>	93
V.2.4	<i>Suivi de croissance cellulaire</i>	94
V.3	METHODES NON-INVASIVE : DOSAGES ENZYMATIQUES	94
V.3.1	<i>Glucose</i>	95
V.3.2	<i>Lactate</i>	96
CHAPITRE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA FORMULATION D'UNE BIO-ENCRE		97
I.	EVOLUTION DE LA STRATEGIE DE BIOIMPRESSION 3D	99
I.1	FILS D'ALGINATE	99
I.2	FILS D'ALGINATE/GELATINE	99
I.3	PROGRESSION DU PROTOCOLE	100
I.4	AJOUT DE MOTIFS D'ADHESION CELLULAIRE	101
I.4.1	<i>Fibronectine</i>	101
I.4.2	<i>Alginate RGD</i>	102
I.4.3	<i>Fibrinogène</i>	103
I.5	INFLUENCE DU TEMPS DE POLYMERISATION	104

II.	UTILISATION D'UN INHIBITEUR DE THROMBINE.....	105
II.1	CINETIQUE D'INHIBITION.....	106
II.1.1	<i>Test colorimétrique en présence d'un substrat chromogénique</i>	<i>106</i>
II.1.2	<i>Test de turbidité en présence de fibrinogène.....</i>	<i>108</i>
II.2	ESSAI AVEC LA BIO-ENCRE.....	110
III.	ETUDE RHEOLOGIQUE : RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES D'IMPRESSION	113
III.1	IMPRIMABILITE, DEPOT ET MAINTIEN DE L'OBJET BIOIMPRIME	113
III.2	IMPRIMABILITE AU REGARD DE LA SURVIE CELLULAIRE : UTILISATION DU LOGICIEL FLOWTIPS	115
IV.	SUIVI DE VIABILITE ET MATURATION CELLULAIRE	118
IV.1	VIABILITE CELLULAIRE	119
IV.2	RETRACTATION	120
IV.3	COURBE DE CROISSANCE	121
IV.4	DOSAGE ENZYMATIQUE PAR SPECTROPHOTOMETRIE.....	123
IV.4.1	<i>Suivi de la consommation du glucose.....</i>	<i>123</i>
IV.4.2	<i>Suivi de la production de lactate.....</i>	<i>124</i>
V.	CONCLUSION.....	126
CHAPITRE 4 : ELABORATION D'UNE BIOIMPRIMANTE		127
I.	TRANSFORMATION D'UNE IMPRIMANTE FDM PLASTIQUE EN UNE BIOIMPRIMANTE V1	129
I.1	CONSTRUCTION 3D D'UN POUSSE-SERINGUE	131
I.2	CONSTRUCTION D'UN DOUBLE EXTRUDEUR.....	135
I.3	CARACTERISTIQUES DE LA BIOIMPRIMANTE V1	136
I.4	LIMITATIONS ET SOLUTIONS	136
II.	EVOLUTION DU CAHIER DES CHARGES ET PROTOTYPE V2RECHERCHE.	137
II.1	CARACTERISTIQUES DE LA MACHINE V2RECHERCHE	138
II.2	EXTRUSION PAR PUSSEE PNEUMATIQUE	139
II.3	LIMITATIONS ET SOLUTIONS	140
III.	PROTOTYPE V3PROD.....	142
IV.	LE BAB : BIOASSEMBLYBOT®	143
V.	CONCLUSION.....	145
CHAPITRE 5 : LA BIOFABRICATION <i>IN VITRO</i> DE TISSUS COMPLEXES ET FONCTIONNELS		147
I.	LA BIOIMPRESSION DE DERME.....	149
I.1	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	149
I.2	RESULTATS	150

1.2.1	<i>HPS</i>	150
1.2.1.1	Contrôle négatif sans cellule	150
1.2.1.2	Après 12 jours de maturation	151
1.2.1.3	Ensemencement des kératinocytes.....	152
1.2.1.4	Après 38 jours de maturation	153
1.2.2	<i>Trichrome de Masson</i>	154
1.2.2.1	Contrôle négatif sans cellule	154
1.2.2.2	Après 12 jours de maturation	155
1.2.2.3	Après 38 jours de maturation	156
1.2.3	<i>Immunofluorescence</i>	157
1.2.3.1	Immunofluorescence des marqueurs de l'épiderme.....	157
1.2.3.2	Immunofluorescence des marqueurs de la jonction dermo-épidermique (JDE).....	158
1.2.3.3	Immunofluorescence des marqueurs dermiques.....	159
1.2.4	<i>Microscope électronique à transmission</i>	161
1.3	CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE LA BIOIMPRESSION D'UNE PEAU TOTALE	162
II.	DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE STRATEGIE DE TRAITEMENT DES LESIONS FOCALES	
	CARTILAGINEUSES GRACE A LA BIOIMPRESSION	164
II.1	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	164
II.2	RESULTATS HISTOLOGIQUES.....	164
II.2.1	<i>Comparaison des densités cellulaires d'ensemencement</i>	165
II.2.2	<i>Effet du temps de culture</i>	166
II.2.3	<i>Effet des facteurs de croissance</i>	167
II.2.4	<i>Effet de l'hypoxie</i>	169
II.3	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	170
III.	BIOIMPRESSION DE TISSUS MICROVASCULARISES	171
III.1	CONTEXTE ET OBJECTIFS	171
III.2	MICROVASCULARISATION DES OBJETS IMPRIMES.....	172
III.2.1	<i>Co-impression de cubes tests</i>	172
III.2.1.1	HDMEC-GFP	172
III.2.1.1.1	Colorations histologiques	173
III.2.1.1.2	Fluorescence GFP des cellules endothéliales	174
III.2.1.1.3	Marqueurs endothéliaux	176
III.2.2	<i>Ensemencement des HDMEC-GFP</i>	178
III.2.3	<i>HUVEC</i>	179
III.3	MATURATION DANS UN ENVIRONNEMENT DYNAMIQUE : UTILISATION D'UN BIOREACTEUR	182
III.3.1	<i>Cube Statique</i>	183
III.3.2	<i>Evolution du système de bioréacteur</i>	184
III.3.2.1	Utilisation d'un système commercial.....	184

III.3.2.2	Elaboration par impression 3D d'un système de bioréacteur personnalisable.....	186
III.3.3	<i>Mécanique des fluides numérique (computational fluid dynamics = CFD)</i>	189
III.3.4	<i>Caractérisations des tissus avec une maturation en environnement dynamique</i>	193
III.3.5	<i>Comparaison de la culture statique et de la culture dynamique.....</i>	194
III.3.6	<i>Conclusion.....</i>	195
IV.	CONCLUSION.....	196
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	197
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	203
	PUBLICATIONS	221
	COMMUNICATIONS.....	227

LISTE DES ABREVIATIONS

2D/3D	Deux dimensions/trois dimensions
ADSC	Adipose Derived Stromal Cell
AM	AcéthoxyMéthyle
BMP	Bone Morphogenic Protein
CAO	Conception assistée par Ordinateur
CD 31	Cluster de différenciation 31
CMS	Cellules Souches Mésoenchymateuses
DICOM	Digital Imaging and Communication in Medicine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DGA	Direction Générale des Armées
EDTA	EthylèneDiamineTétréaAcétique
EGM	Endothelial cell Growth Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
FDM	Fused Deposition Modeling
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FRESH	Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels
GCode	Programmation de commande numérique
GelMA	Gelatin-methacryloyl
GFP	Green Fluorescent Protein
GAG	GlycosAminoGlycane
hCMPC	Human CardioMyocytes Progenitor Cells
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HE	Hématoxyline-Eosine
HPS	Hématoxyline Phloxine Safran
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IF	ImmunoFluorescence

IT	Inhibiteur de Thrombine
ITS	Insuline-Transferrine-Sélénium
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JDE	Jonction Dermo-Epidermique
LAP	Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate
MESH	Maillage tridimensionnel
NFC	NanoFibrillated Cellulose
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCL	PolyCaproLactone
PEG	PolyEthylèneGlycol
PFA	ParaFormAldéhyde
PGA	PolyGlycolique Acid
PID	Proportionnel Intégral Dérivé
PVP	PolyVinylPyrrolidone
RGD	Motif d'adhérence Arginine-Glycine-Aspartate
STL	Standard Tessellation Language
TGF	Transforming Growth Factor
UV	UltraViolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VWF	Von Willebrand Factor

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Chaque année des millions de patients souffrent de la perte ou d'un dysfonctionnement d'un organe ou d'un tissu, à la suite de maladie ou d'accidents. A différentes échelles, tous les êtres vivants sont capables de régénération lors d'une atteinte à leur intégrité physique mais la capacité de régénération des tissus humains est limitée lorsqu'il s'agit de la restauration des fonctions initiales¹. A la place d'un organe endommagé, du tissu cicatriciel est présent afin de combler le manque morphologique. Quand les dommages sont trop importants pour être régénérés (de manière interne) ou réparés (de manière exogène, à l'aide d'une chirurgie) la transplantation peut être envisagée. Cependant, elle est extrêmement limitée par la pénurie de donneur. Le nombre de greffes pratiquées en France augmentent constamment, entre 2012 et 2016, la progression était de 17%. Malgré cela, en 2016, plus de 22 000 patients étaient encore en attente de greffes².

Une autre alternative est possible grâce à l'émergence, il y a une cinquantaine d'année, d'un nouveau champ de la médecine : la médecine régénérative qui englobe le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ce dernier se retrouve au croisement de plusieurs disciplines scientifiques comme la biologie cellulaire, la chimie des matériaux et des polymères et l'environnement biomécanique. L'ingénierie tissulaire peut donc se définir comme l'ensemble des techniques qui s'inspirent des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques pouvant restaurer ou maintenir les fonctions d'un tissu spécifique³.

L'objectif de cette approche est de recréer *in vitro* un organe ou un tissu sur demande afin de rétablir une fonction physiologique. Même si des avancées considérables ont été réalisées dans ce domaine, la maîtrise de ces techniques n'est pas encore suffisante pour aboutir à des applications cliniques systématiques.

Les méthodes de mises en œuvre pour recréer des tissus *in vitro* se basent sur plusieurs approches. Certaines se concentrent sur l'ingénierie de l'architecture utilisant les organes décellularisés⁴, les feuillets cellulaires⁵ et la bioimpression que l'on développera ultérieurement. D'autres approches se focalisent sur la programmation du devenir des cellules grâce aux cellules souches associées aux thérapies cellulaires⁶⁻⁸.

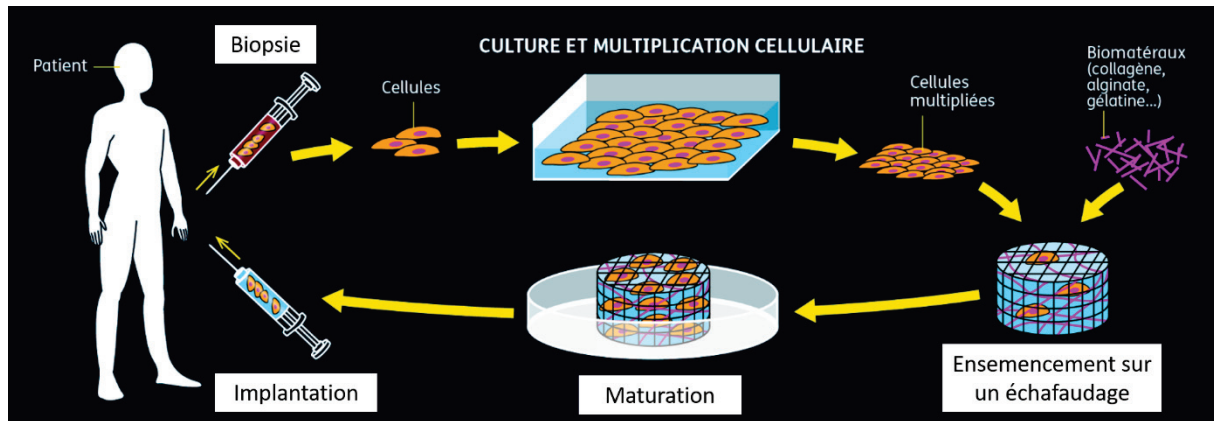


Figure 1. Représentation schématique des étapes classiques en ingénierie tissulaire^{3,9}.

Historiquement, la principale méthode d'obtention de tissus par ingénierie tissulaire classique utilise la croissance *in vitro* de cellules associées à un échafaudage biodégradable (= un scaffold). Les étapes schématisées sur la Figure 1 partent d'une biopsie chez un patient. Une fois les cellules cibles prélevées, leur culture et leur multiplication en 2D est nécessaire afin d'en obtenir un nombre suffisant dans le but de les exploiter. Ensuite, la phase d'ensemencement sur un échafaudage permet aux cellules de pénétrer grâce à la gravité au sein de la structure, d'y adhérer et de se multiplier, dans un environnement 3D. L'étape critique de la maturation voit le développement des cellules en un tissu grâce à leur propre sécrétion de matrice extracellulaire, témoin de la création d'un tissu dit mature mais rarement fonctionnel. Dans les cas idéaux, on peut alors procéder à la réimplantation chez le patient de ce tissu nouvellement formé, qui va pouvoir interagir avec son environnement originel³.

Il est important de rappeler que l'ingénierie tissulaire a été introduite comme une procédure de survie pour les patients brûlés¹⁰. La prise de greffe réussie de feuilletts épidermiques autologues a été la première preuve de concept de la puissante technologie que nous connaissons aujourd'hui¹¹. Cependant, cette approche initiale très intéressante est tombée dans une certaine déconsidération en raison des inconvénients et limitations perçues¹². Effectivement, malgré de nombreux premiers succès, il existe encore peu de produits tissulaires disponibles et utilisables en clinique. Des défis majeurs demeurent, concernant l'adaptation des technologies d'ingénierie tissulaire à une utilisation clinique.

L'adaptation depuis une décennie (Figure 2) de la technologie de fabrication additive à ces problématiques de l'ingénierie tissulaire a créé un nouveau champ disciplinaire : la bioimpression.

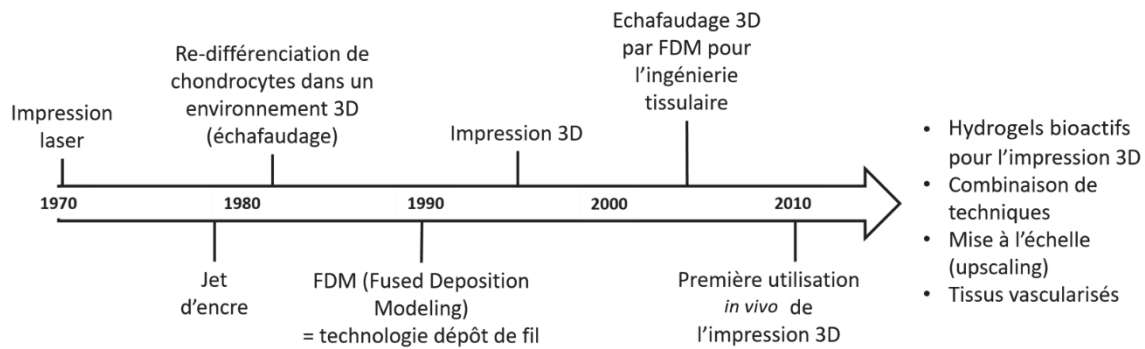


Figure 2. Histoire de la fabrication additive et de son application dans l'ingénierie tissulaire; l'introduction de technologies et de résultats scientifiques majeurs. Adapté de¹³

Les objectifs de ces travaux de thèse sont les suivants :

- Développer et caractériser un procédé de bioimpression 3D,
- Bioimprimer plusieurs tissus modèles tels que la peau, le cartilage et le tissu vasculaire.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs thèmes seront abordés en commençant par une étude bibliographique permettant de contextualiser ce projet en introduisant les différentes technologies de bioimpression, les biomatériaux utilisés et les tissus déjà obtenus grâce à la bioimpression. Ensuite, nous verrons dans un deuxième chapitre la méthodologie employée afin d'arriver aux résultats obtenus. Ces derniers sont articulés autour de trois chapitres comprenant premièrement l'étude et la caractérisation d'une bio-encre utilisable par bioextrusion, deuxièmement la modification d'une imprimante 3D en bioimprimante puis la création d'un appareillage dédié à nos problématiques. Et troisièmement, seront abordés les tissus obtenus grâce à la combinaison des deux premiers chapitres en se concentrant sur la peau, le cartilage et le tissu vasculaire. Un bilan des résultats obtenus au cours de cette thèse clôturera ce manuscrit et les perspectives offertes par ces travaux de recherche seront exposées.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce premier chapitre d'étude bibliographique, nous allons passer en revue les techniques de bioimpression 3D. Il en existe deux principales que nous développerons, la technologie de jet d'encre et la technologie de bioextrusion. Ces deux technologies servent à imprimer des biomatériaux, cellularisés ou non. Ces technologies de bioimpression 3D combinées aux biomatériaux et aux connaissances actuelles en ingénierie tissulaire permettent désormais la bioimpression de tissus. Seront développés dans cette partie la bioimpression de peau avec une partie descriptive de la physiologie de ce tissu pour mieux comprendre les enjeux de sa reconstruction, suivit de plusieurs études de cas afin de faire l'état de l'art de la bioimpression de peau. Le tissu cartilagineux et vasculaire sera traité de la même manière. Puis succinctement, nous présenterons la bioimpression de tissus hautement spécifiques tels que le tissu cardiaque et rénal. Tous ces tissus demandent une maturation spécifique et pour conclure ce chapitre, nous développerons la thématique des bioréacteurs qui permettent une maturation dynamique des tissus.

I. La bioimpression 3D

L'impression 3D, comme la bioimpression 3D possède un certain nombre d'étapes communes qu'il est important de bien maîtriser afin d'obtenir un objet en 3D cellularisé. L'impression 3D est une technique de fabrication additive où l'ajout couche par couche de matière permet de réaliser un objet en trois dimensions à partir d'un fichier informatique et d'une imprimante. La bioimpression 3D est une technique de fabrication, basée sur cette approche de l'impression 3D conventionnelle, qui permet le dépôt couche par couche de biomatériaux et de cellules pour fabriquer des tissus¹⁴. Il faut distinguer la bioimpression de la bioimpression 3D. La bioimpression, représentée par la technique laser, reste limitée par les hauteurs finales des objets, ne pouvant pas excéder $100\ \mu\text{m}$ ¹⁵, ainsi que par l'incapacité à réaliser des objets morphologiquement complexes. On se concentrera ici sur les techniques de bioimpression 3D, le jet d'encre et l'extrusion.

I.1 Le procédé de bioimpression 3D

Le procédé de fabrication d'un tissu biologique par bioimpression 3D se décompose en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'étape de conceptualisation, c'est-à-dire la conception assistée par ordinateur (CAO) de l'architecture du tissu biologique, au cours de laquelle l'organisation spatiale de l'ensemble des constituants des tissus est définie. C'est également au cours de cette étape que la programmation des paramètres d'impression des bio-encres s'effectue. Plusieurs logiciels entrent en jeu pour passer d'une image médicale, obtenue par IRM ou scanner, à un fichier pris en charge par l'imprimante (Figure 3).

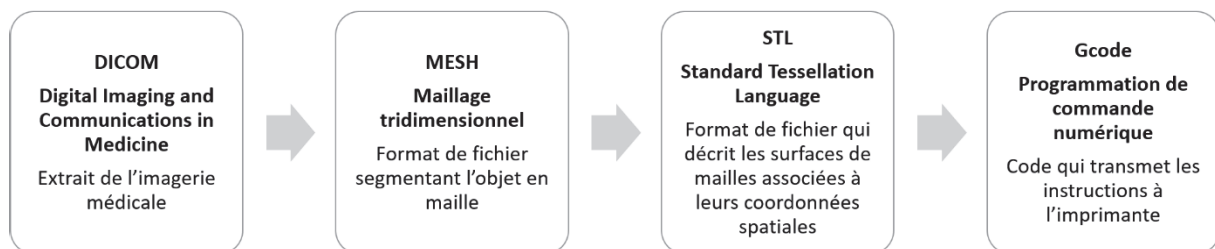


Figure 3. Représentation schématique des différentes étapes de préparations des fichiers avant l'étape d'impression 3D.

Le GCode transmet les instructions (de mouvement) à l'imprimante 3D, c'est donc à cette étape qu'il faut déterminer quels sont les paramètres d'impression en fonction de la bio-encre utilisée. On retrouve par exemple la hauteur des couches, la vitesse d'impression, ou encore

le mode de remplissage de l'objet. Vient ensuite l'étape d'impression à l'aide de la machine, la bioimprimante, qui reproduit les motifs conçus par ordinateur en déposant l'encre biologique.

1.2 Les techniques de bioimpression 3D

Il existe deux techniques principales pouvant convenir à la bioimpression 3D d'encre cellularisée. La principale différence entre celles-ci s'observe au moment du dépôt de la bio-encre sur le plateau d'impression. Comme nous allons le voir, nous retrouvons deux cas, le premier qui repose sur l'éjection de matière sous forme de gouttes par jet d'encre, et le second avec le dépôt de matière en continu grâce à une buse d'extrusion, la bioextrusion.

1.2.1 Le jet d'encre

La technique du jet d'encre¹⁶ est grandement inspirée de l'impression 2D papier. Elle consiste à projeter des gouttes de bio-encre sur le plateau d'impression. L'éjection de la goutte se produit soit grâce à la formation d'une microbulle (liée à l'élévation rapide et locale de la chaleur), soit grâce à un mécanisme utilisant un quartz piézoélectrique (liée à sa déformation sous l'effet d'une tension électrique). Le volume d'éjection à travers les microbuses est extrêmement précis, de l'ordre du picolitre. Les bioimprimantes à jet d'encre peuvent dispenser des biomatériaux avec des viscosités faibles comprises entre 3,5 et 12 mPa.s¹⁷ (pour information la viscosité de l'eau est de 1 mPa.s).

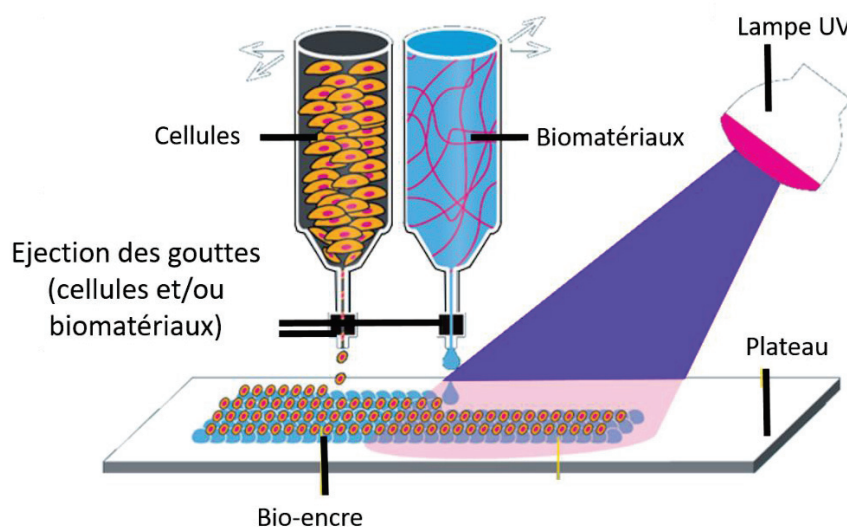


Figure 4. Représentation schématique de la technique de bioimpression par jet d'encre couplée à une photopolymérisation UV et une configuration avec deux seringues, l'une pour les cellules en suspension et l'autre pour les biomatériaux⁹.

La technique de jet d'encre fait partie d'une technique plus large que l'on peut traduire par la bioimpression à base de gouttes. Elle comprend deux autres techniques (éjection de gouttes par acoustique et par jet électrodynamique) que nous ne développerons pas ici¹⁸. La technologie de bioimpression jet d'encre manipule physiquement une solution de bio-encre pour générer des gouttes, en s'appuyant sur des phénomènes physiques de mécanique des fluides pour les éjecter sur le plateau d'impression. La bio-encre est chargée dans une seringue où elle est maintenue en place par la tension de surface au niveau de l'orifice de la buse¹⁹. Ensuite, un actuateur thermique, piézoélectrique ou électrostatique provoque une impulsion qui va éjecter une gouttelette lorsque la tension de surface est rompue.

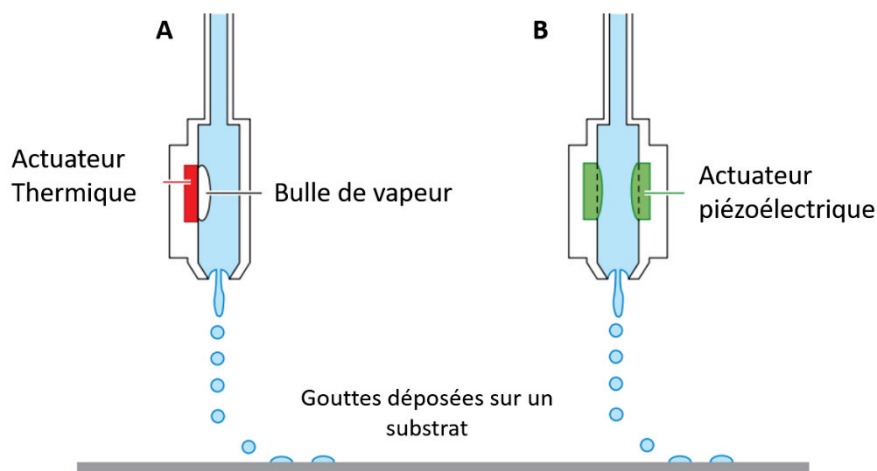


Figure 5. Représentation schématique montrant le fonctionnement d'un système d'impression à jet d'encre par pression générée dans la chambre de la bio-encre par A) un actuateur thermique, B) un actuateur piézoélectrique. Traduit à partir de¹⁷

1.2.1.1 Jet d'encre thermique

Le chauffage très local va former une bulle de vapeur (Figure 5-A) qui se dilate rapidement et explose, ce qui va générer une impulsion de pression à l'intérieur de la chambre de la bio-encre. La conséquence directe est l'augmentation de tension de surface à l'orifice de la buse, concomitante à l'éjection d'une goutte. Les études de bioimpression utilisant cette technique sont limitées à l'évaluation de son impact sur la viabilité des cellules bioimprimées²⁰. Par exemple, des neurones bioimprimés par jet d'encre thermique présentent un phénotype neuronal et des fonctions électrophysiologiques. Plusieurs autres types cellulaires ont été bioimprimés avec cette technologie : cellules cardiaques²¹, endothéliales²² et cartilage²³.

I.2.1.2 Jet d'encre piézoélectrique

L'actuateur piézoélectrique (Figure 5-B) se déforme ponctuellement sous l'effet d'une différence de potentiel. Cette déformation, comme avec la technique précédente, engendre une modification du volume de la chambre de la bio-encre et augmente la tension de surface à l'orifice de la buse pour provoquer l'éjection d'une goutte²⁴.

D'autres études ont tenté de contrôler le nombre de cellules encapsulées dans des gouttes éjectées pour des applications potentielles dans les domaines du diagnostic, de la thérapeutique et de la biologie cellulaire^{25,26}.

Les biomatériaux utilisés et les exemples d'utilisations de cette technologie pour la bioimpression sont nombreux, nous les présenterons par la suite dans ce chapitre (partie II et III).

Pour résumer (Tableau 1), les avantages de cette technique se concentrent sur une facilité de mise en place du système avec une certaine versatilité comme la possibilité d'utiliser plusieurs cartouches à la fois, tout en gardant un contrôle précis du volume du dépôt. Ce contrôle accru permet de déposer des volumes extrêmement précis ce qui facilite les constructions multicellulaires par le positionnement précis des cellules. Néanmoins, les diamètres des buses étant compris entre 35 et 75 μm , les phénomènes de buses bouchées peuvent poser problème lors de l'utilisation de matériaux trop visqueux (supérieur à 10 mPa.s) ou de concentration cellulaire trop importante (supérieure à 1.10^6 cellules/mL). De plus, l'éjection de ces gouttes qui entraîne (dans l'air) pour certaines, leur gélification, doit être bien caractérisée afin d'éviter une gélification précoce qui empêcherait l'assemblage des gouttes¹⁸.

1.2.2 La bioextrusion

La bioextrusion²⁷ repose sur l'utilisation d'une buse de dimension et de géométrie contrôlable, à travers laquelle est extrudé un jonc de matière. Celui-ci se dépose sur un support solide (le plus souvent thermostaté). Le principe reste assez proche de l'impression FDM (Fused Deposit Modelling), où le fil thermoplastique passe à travers l'extrudeur chauffant à la température de fusion de ce thermoplastique (souvent entre 210 et 230 °C) et va se déposer sur le plateau d'impression. Dans le cas de la bioextrusion, à la place d'un fil plastique, une seringue est utilisée. Cette dernière contient un mélange de biomatériaux et de cellules (= la bio-encre) qui se dépose de la même manière (que le fil plastique), formant, couche après couche, un objet en trois dimensions. Il est possible d'intégrer plusieurs seringues afin d'imprimer plusieurs matériaux dans un seul et même objet et/ou plusieurs types cellulaires. Ces matériaux peuvent être photopolymérisables ou non, l'usage de la lampe UV n'est donc pas systématique (Figure 6).

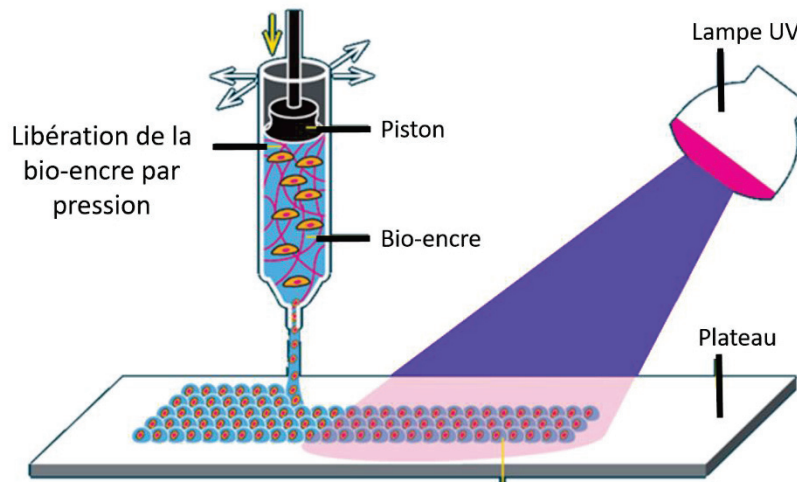


Figure 6. Représentation schématique de la technique de bioimpression par extrusion couplée à une photopolymérisation UV et une seringue chargée d'une bio-encre elle aussi photopolymérisable⁹.

C'est la technique la plus utilisée en bioimpression, du fait de sa grande versatilité dans la gamme des biomatériaux imprimables et de viscosités supportées de 30 à $6 \cdot 10^7$ mPa.s²⁸. Cette gamme étendue permet d'utiliser des matériaux présentant une contrainte seuil afin de permettre d'augmenter les épaisseurs (jusqu'à plusieurs centimètres) des constructions. La valeur d'une contrainte seuil dans un fluide est déterminée par la force à appliquer à celui-ci pour qu'il s'écoule. La connaissance de cette valeur permet de connaître la force minimale à appliquer pour extruder la bio-encre, mais aussi la hauteur limite des constructions bioimprimées avant que ces dernières ne s'effondrent²⁹.

Les autres avantages concernent (Tableau 1) :

- La possibilité d'intégrer des concentrations cellulaires élevées (plusieurs millions de cellules/mL)²⁷,
- La rapidité d'impression (en moyenne 10 mm³/min),
- La viabilité cellulaire de l'ordre de 90% (dépendante de la viscosité des bio-encres)³⁰.

Cependant, cette approche fournit une résolution assez faible qui dépend de la taille de la buse utilisée (souvent comprise entre 100 et 400 µm de diamètre) et ne permet pas le positionnement précis d'une cellule. La technique s'appuiera néanmoins sur l'auto-organisation des cellules en exploitant l'adhésion cellule-cellule et leurs capacités à développer leur propre matrice extracellulaire^{31,32,33}.

Il a souvent été démontré que l'utilisation de la bioextrusion était néfaste pour la survie cellulaire. Les chiffres de viabilité donnés sont, pour la plupart, compris entre 40 et 80 %¹⁴. Cette variabilité peut s'expliquer par les différentes géométries des buses d'impression utilisées. Comme nous le verrons par la suite, la géométrie du cône ou de l'aiguille, la pression exercée, et l'ajout d'agents de réticulation, vont être déterminants quant à la survie des cellules. Cependant, il faut noter que dans une étude de 2008³⁴, le pourcentage de 97% de survie cellulaire a été atteint avec un débit de 0,5 mm³/s, une concentration cellulaire de 10 millions de cellules/mL et une viscosité de l'hydrogel d'environ 80 Pa/s.

Les biomatériaux utilisés et les exemples d'utilisation de cette technologie pour la bioimpression sont nombreux, nous les présenterons par la suite dans ce chapitre, dans les parties II et III.

Tableau 1. Comparatif de ces deux technologies de bioimpression 3D.

Technologie	Jet d'encre	Extrusion
Principe	Dépôt de microgouttelettes de bio-encre, éjectées via une valve (piézo-électrique, thermique ou électrostatique) sur le plateau d'impression	Dépôt d'un filament de bio-encre extrudé d'une seringue sur le plateau d'impression grâce à une pression mécanique ou pneumatique
Classification du dépôt	Sans contact	Avec contact
Viscosité supportée	Gamme de biomatériaux peu visqueux 3,5 à 12 mPa.s	Gamme très étendue 30 à 6.10 ⁷ mPa.s
Viabilité cellulaire	80 %	90% ³⁰
Densité cellulaire	< 10 ⁶ cellules/mL	10 ⁶ > 20 ⁷ cellules/mL
Résolution du dépôt	1 > 300 pL	0,2 > 1 mm
Vitesse d'impression	1-10 000 gouttes/s	10 mm ³ /min
Avantages	Précision du dépôt	Dépôt rapide de grande quantité de matière et de cellules Incorporation directe des cellules dans la bio-encre
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Obligation de limiter la densité cellulaire pour éviter de boucher la tête d'impression. • Dommages thermiques et stress mécanique des cellules. • Nombre de biomatériaux imprimables limités 	<ul style="list-style-type: none"> • Peu de précision au niveau du placement cellulaire • Nécessite une maîtrise parfaite des conditions de polymérisation, gélification et réticulation pour conserver la structure 3D
Références	16,35,36	27,28,37-40

I.2.3 Dépôt de sphéroïdes pour la bioimpression 3D de structures tubulaires

Yanagi *et al.*⁴¹ ont récemment développé une méthode hybride de bioimpression 3D pour l'obtention de tissus : le dépôt de sphéroïdes sur des aiguilles (Figure 7). Les sphéroïdes sont des agrégats sphériques de cellules et il est possible de les utiliser comme brique de base pour la bioimpression⁴².

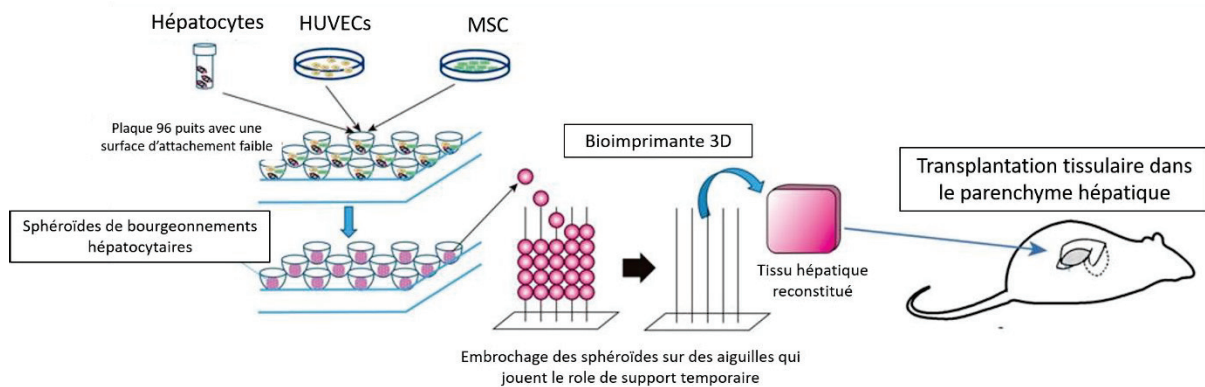


Figure 7. Représentation schématique de la stratégie de bioimpression 3D par dépôt de sphéroïdes pour l'obtention de tissu hépatique mûris *in vitro* et implantés chez la souris, traduit de⁴¹.

Tous les biomatériaux utilisés pour la production d'échafaudages doivent faire face à des problématiques telles que la cytocompatibilité, le comportement à la dégradation ou l'immunogénicité potentielle³¹. Dans cette étude, ils s'affranchissent de l'utilisation de biomatériaux en utilisant les sphéroïdes comme briques de base de la construction tissulaire.

Les étapes sont les suivantes :

- Assemblage des sphéroïdes (avec 3 types cellulaires) dans une plaque 96 puits.
- Collecte des sphéroïdes et embrosage de ceux-ci sur un porte-épingle (= needle array-system) en utilisant une bioimprimante sur-mesure (Regenova®, Cyfuse, Japon),
- Fusion des sphéroïdes au cours de la maturation,
- Extraction du tissu mûris et implantation chez la souris.

Leurs résultats ne montrent aucune obstruction vasculaire et une connexion directe entre le greffon et le tissu hépatique natif après transplantation (pendant 90 jours). Cette méthode de fabrication permet au milieu de culture de circuler immédiatement autour des sphéroïdes après l'étape de bioimpression et d'éviter l'ischémie des tissus puisque ces derniers sont maintenus par les aiguilles. Cependant, un inconvénient majeur apparaît avec la contrainte de forme imposée par le placement des aiguilles.

II. Les biomatériaux composants de la bio-encre

La bio-encre est composée d'au minimum deux parties essentielles : la matrice composée de matériaux et les cellules d'intérêt, sélectionnées en fonction des tissus ciblés. La composante matricielle sera formulée à partir de biomatériaux.

Les biomatériaux destinés à la bioimpression peuvent être divisés en deux catégories bien distinctes, les polymères synthétiques (type polycaprolactone) et les hydrogels. Ces derniers peuvent être d'origine synthétique ou naturelle⁴³.

Dans cette partie, nous allons étudier de manière plus détaillée la deuxième catégorie de biomatériaux en détaillant leur structure et leurs implications dans le procédé de bioimpression afin de comprendre leurs impacts sur la formulation de la bio-encre.

II.1 L'alginate

II.1.1 Description

L'alginate de sodium, issu des algues brunes par extraction basique, est un copolymère à bloc composé de deux monomères bien distincts : l'acide mannuronique (M) et guluronique (G). La liaison $\beta(1\rightarrow4)$ entre ces deux polysaccharides va donner une chaîne de polymère d'alginate. La proportion et la répartition entre M et G dépend de l'espèce et de la partie de l'algue dont est extrait l'acide alginique⁴⁴. Seuls les blocs d'acide guluronique sont responsables de la réticulation intermoléculaire avec des cations divalents et utilisés lors de la gélation⁴⁴.

Les hydrogels d'alginate s'agrègent par chélation de manière réversible grâce à un cation divalent, souvent le calcium. Ce dernier va interagir avec les fonctions acides carboxyliques chargées négativement tout au long de la chaîne au sein d'une cavité créée par une paire de séquences guluronates et ainsi former une structure de « boîte à œuf » (Figure 8). On obtient alors un assemblage de deux chaînes qui va ensuite s'associer à d'autres chaînes en multimères pour donner lieu à un réseau en 3D d'alginate réticulé⁴⁴.

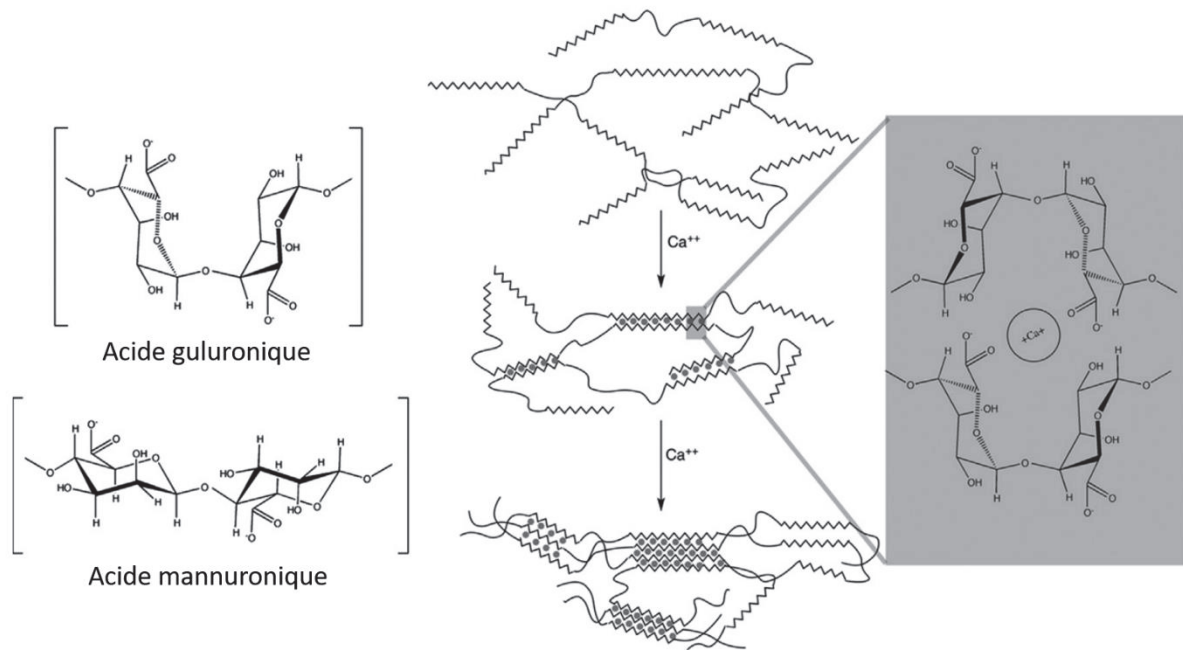


Figure 8. Représentation schématique des motifs de monomères de l'alginate (acide gulonique et mannuronique) et leur assemblage lors de la chélation par le calcium, traduit de⁴⁵.

Il possède d'excellentes propriétés biocompatibles et il est couramment utilisé dans le domaine biomédical⁴⁶ pour des applications d'encapsulation et de relargage contrôlé de cellules ou de facteurs de croissance par exemple⁴⁷.

II.1.2 Utilisation de l'alginate dans la bioimpression

L'utilisation de l'alginate dans la bioimpression 3D est très courante, et ne se limite pas à une technologie. Sa gamme large de viscosité (en fonction de sa concentration et de la longueur de chaîne) lui permet d'être bioimprimé seul grâce à la technologie par jet d'encre lorsque sa viscosité est inférieure à 10 mPa.s, et par extrusion quand sa viscosité est supérieure. Comme nous l'avons vu, sa méthode de polymérisation reposant sur sa chélation par le calcium est simple à mettre en place par immersion de l'objet bioimprimé dans une solution de calcium.

Certaines équipes utilisent la bioimpression coaxiale composée de deux seringues (une d'alginate avec les cellules et l'autre de calcium) et d'une seule buse. L'éjection simultanée des deux liquides permet la chélation instantanée de l'alginate lors du dépôt sur le plateau d'impression. Il est alors possible, comme présenté sur la Figure 9 d'obtenir des structures complexes de joncs par bioextrusion.

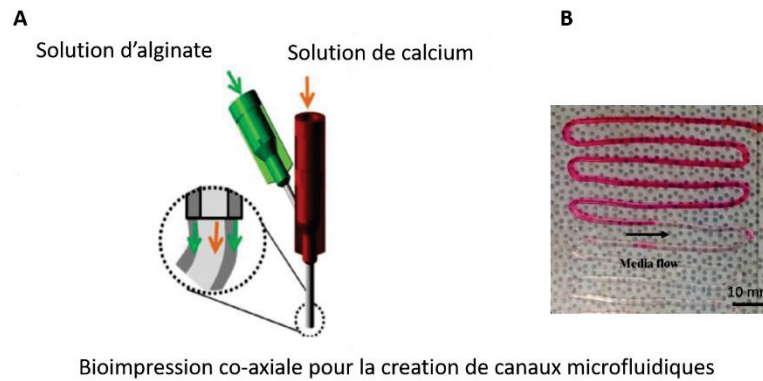


Figure 9. A) Design de la buse coaxiale pour la fabrication de canaux microfluidiques. B) Le tube cellularisé et chargé de milieu de culture afin de montrer l'intégrité de celui-ci. Adapté de⁴⁸

Son utilisation en bioimpression est extrêmement variée (Figure 10) :

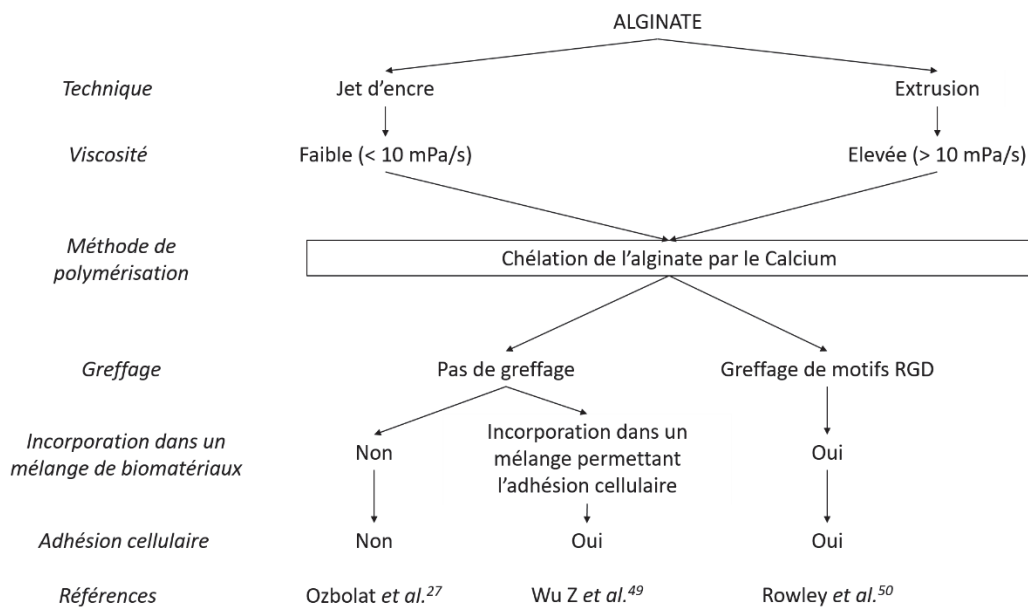


Figure 10. Description globale de l'utilisation de l'alginate dans le domaine de la bioimpression 3D par jet d'encre et par extrusion^{27,49,50}.

Il présente plusieurs avantages pour la bioimpression comme sa versatilité d'utilisation pour plusieurs techniques, liée à sa large gamme de viscosité. De plus sa gélification rapide en fait un bon candidat pour la création de structures 3D⁴³. Cependant formulé seul dans une bio-encre, son utilisation est plus compliquée, car malgré sa biocompatibilité, il ne présente pas de motifs d'attachement cellulaire ce qui ne permet donc pas aux cellules incorporées dans la bio-encre de se développer. C'est pourquoi, certaines équipes lui greffent ces motifs d'adhésion (motifs RGD par exemple)⁵⁰. Dans le domaine de la bioimpression, l'utilisation

d'alginate est souvent couplée à d'autres biomatériaux apportant pour certains une viscosité plus importante⁵¹, et pour d'autre des motifs d'adhésion cellulaire⁵².

II.2 La gélatine

II.2.1 Description

La gélatine est une protéine qui peut être produite de deux manières différentes : soit par l'hydrolyse acide partielle du collagène I ce qui donne la gélatine de type A, soit par traitement basique pour donner la gélatine de type B. Dans le domaine des biomatériaux, l'utilisation de la gélatine de type A prédomine. Malgré les traitements subit pour sa production, la gélatine conserve certaines séquences de signalisation comme le motif Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) qui favorise l'adhésion et la croissance cellulaire⁵³⁻⁵⁵. L'hydrogel de gélatine se forme grâce à une reconstruction partielle de sa triple hélice via des nœuds de réticulation quand sa température passe en-dessous de sa température de gélification (Figure 11). Cette température va varier selon les lots de gélatine et leur mode de préparation mais également en fonction de sa concentration. Les solutions de gélatine sont le plus souvent caractérisées par leur degré Bloom. Ce dernier correspond à la force à appliquer à un cylindre de 12,5 mm de diamètre pour qu'il s'enfonce, à température ambiante, de 4 mm dans une solution de gélatine d'une concentration à 6,67% m/v⁵⁶.

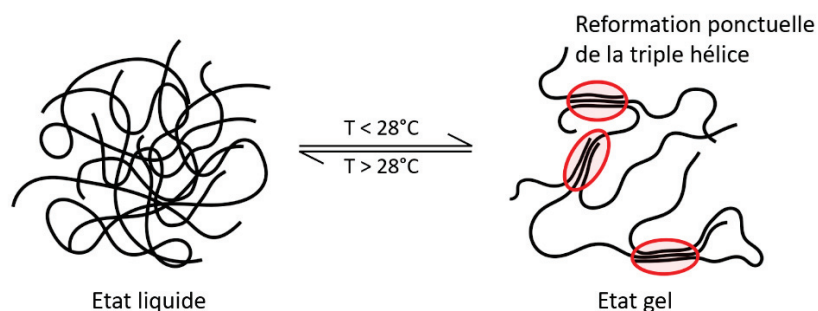


Figure 11. Représentation schématique de l'état des chaînes macromoléculaires de la gélatine à l'état liquide et à l'état de gel⁵⁷.

II.2.2 Utilisation de la gélatine dans la bioimpression

La gélatine se prépare par dissolution dans une solution aqueuse à pH neutre. Puis, une augmentation de température proche de son point de fusion (28°C) permet l'obtention d'une

solution visqueuse transparente. Elle peut être alors imprimée par jet d'encre ou par bioextrusion à température ambiante. Seule, elle est alors utilisable comme support fugitif⁵⁸. Cependant, cette utilisation n'est pas destinée à supporter une maturation tissulaire à 37°C⁴³.

Son utilisation en bioimpression est toujours couplée à l'ajout (Figure 12) :

- D'autres composants comme l'alginate par exemple qui après réticulation par le calcium donnera un hydrogel capable de conserver sa forme 3D pendant la maturation cellulaire⁵⁹.
- D'un agent réticulant comme la transglutaminase^{60,61}. La solution de transglutaminase diffuse dans l'objet bioimprimé et catalyse la formation de liaisons covalentes entre les groupes carbonyles des glutamines et les groupes amino- des lysines. Grâce à cette modification, la gélatine réticulée va pouvoir supporter la croissance cellulaire pendant la phase de maturation du tissu⁶².
- D'une modification chimique permettant sa réticulation : la gélatine méthacrylate (GELMA) qui permet sa photopolymérisation UV. La photopolymérisation est une réaction de polymérisation dont l'étape d'amorçage est déclenchée par un photoinitiateur sensible à une longueur d'onde qui lui est spécifique. En bioimpression, les photoinitiateurs les plus utilisés sont l'Irgacure 2959⁶³ et LAP⁶⁴ qui sont sensibles à la lumière UV et l'Irgacure 819⁶⁵ sensible à la lumière visible. L'action de la lumière va exciter le photoinitiateur en radical libre qui va permettre le clivage d'une double liaison carbone-carbone de l'un des monomères de GELMA qui va pouvoir polymériser et former un réseau insoluble. L'étape de propagation de la photopolymérisation permet la croissance de la chaîne moléculaire par addition de monomères ou de polymères déjà formés. Grâce à cette modification, la gélatine méthacrylate peut supporter une mise en forme 3D et permettre une maturation à 37°C⁶⁶.

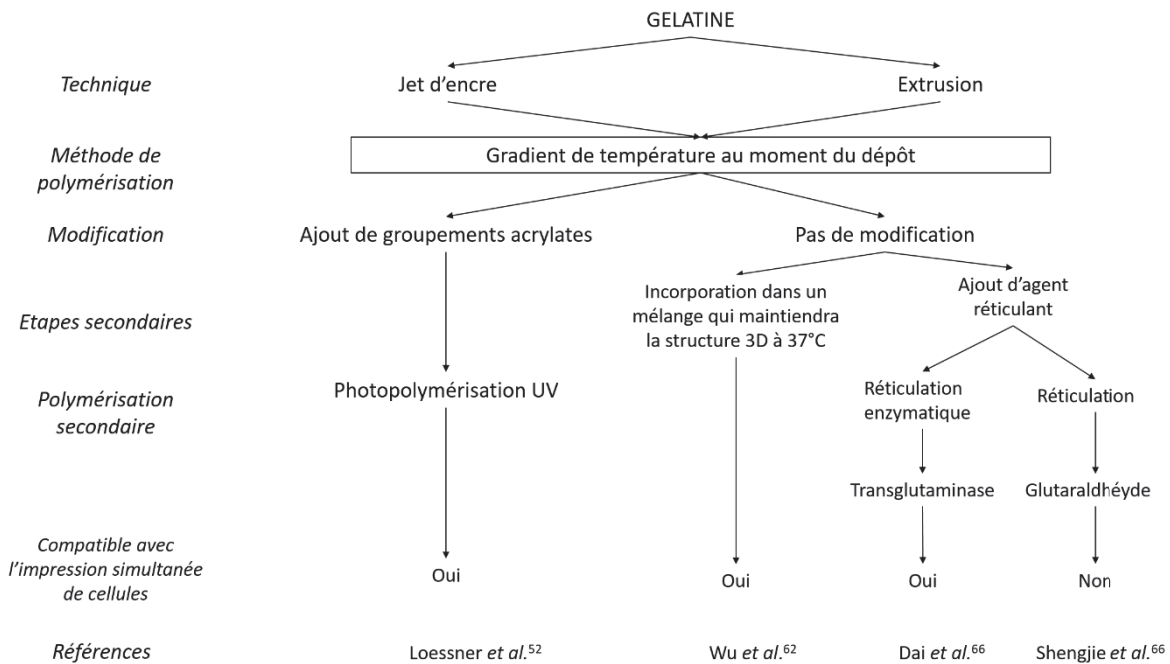


Figure 12. Description globale de l'utilisation de la gélatine dans le domaine de la bioimpression 3D par jet d'encre et par extrusion^{52,62,66}

II.3 Le fibrinogène et la fibrine

II.3.1 Description

Le fibrinogène est une protéine présente dans le sang à des concentrations de 1,4 à 4 mg/mL. Il est impliqué dans les cascades de coagulation permettant la formation d'un caillot lors d'une plaie ouverte. Le fibrinogène est une glycoprotéine fibrillaire de 340 kDa composée de trois paires de chaînes polypeptidiques liées ensemble par 29 liaisons dissulfures. Elle mesure 45 nm de longueur et possède deux domaines globulaires, les domaines D, et une partie centrale hélicoïdale, le domaine E. Les domaines D sont reliés au domaine central par deux super-hélices⁶⁷.

La molécule de fibrinogène possède un site de liaison au calcium qui permet la modulation de la polymérisation en améliorant l'agrégation latérale des chaînes afin d'obtenir des fibres plus larges. En partant d'une molécule de fibrinogène, le mécanisme d'auto-assemblage se fait en plusieurs étapes comme décrit dans la Figure 13⁶⁷ :

- A : le clivage des fibrinopeptides sous l'action de la thrombine,

- B : la formation de monomères de fibrine ainsi que des interactions « hole-knob » [Hole-knob interaction = (domaine D x 2) + domaine E]
- C : un allongement de ces monomères jusqu'à 600 nm, appelées les protofibrilles de fibrine,
- D : l'empilement de ces protofibrilles pour aboutir à un gel de fibrine insoluble. Cette étape est modulée par la présence de calcium⁶⁷.

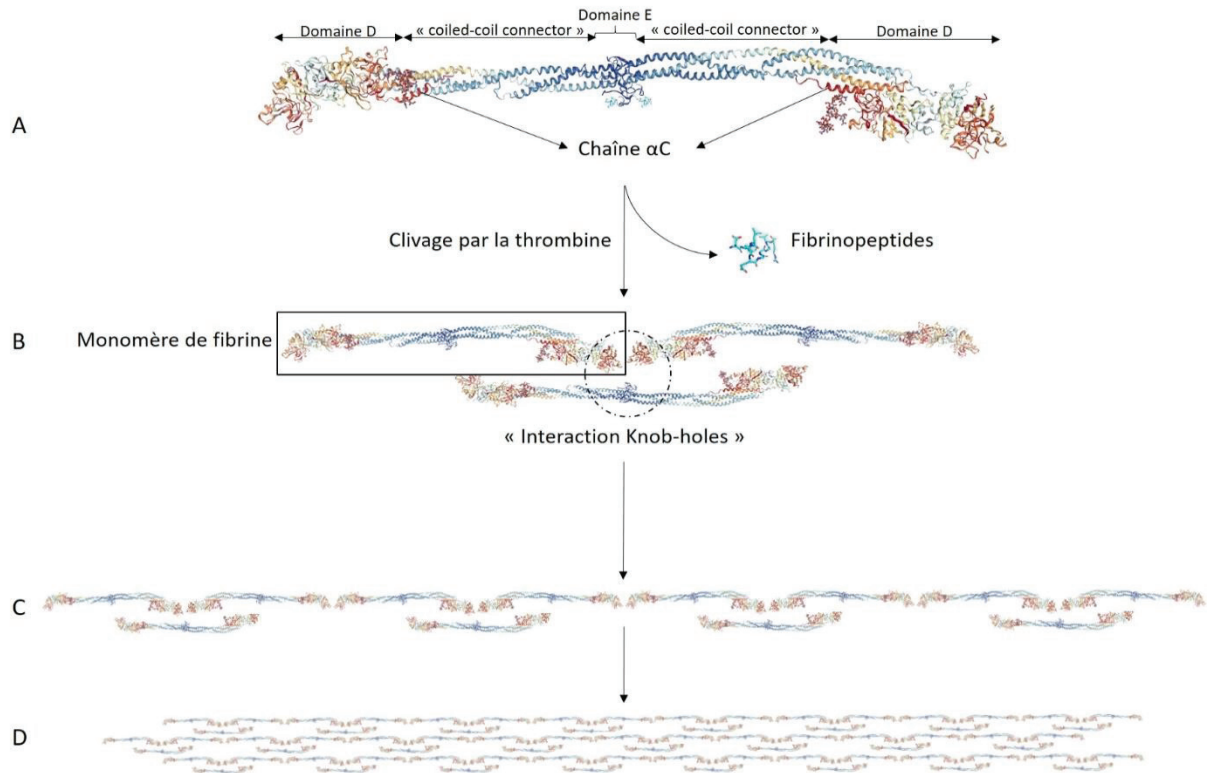


Figure 13. Mécanisme d'auto-assemblage du fibrinogène en fibrine. **A** : représentation de la molécule de fibrinogène humaine. **B** : Après clivage des fibrinopeptides par la thrombine, obtention de monomères de fibrine et attachement de ces monomères entre eux grâce aux interactions « Knob-holes ». **C** : élongation de ce motif de base en protofibrilles de fibrine. **D** : empilement des protofibrilles pour former une fibre de fibrine. Adapté librement de Weisel⁶⁷ (PDB : 1O.2210/pdb3GHG/pdb)

La thrombine (EC 3.4.21.5) est une enzyme de type protéase à sérine qui catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine lors de l'activation de la cascade de coagulation. Physiologiquement, elle n'est produite que très localement lorsque l'hémostase est rompue, par conversion de la prothrombine via deux mécanismes différents (intrinsèque ou extrinsèque). Il a été aussi décrit que la thrombine avait un rôle mitogène sur les fibroblastes et les cellules endothéliales, ce qui explique sa large utilisation en ingénierie tissulaire pour favoriser le développement de substituts dermiques⁶⁸.

II.3.2 Utilisation du fibrinogène dans la bioimpression 3D

Très utilisée en ingénierie tissulaire⁶⁹, son utilisation en bioimpression 3D est très souvent couplée à d'autres biomatériaux. Comme le fibrinogène en solution est très liquide, une équipe a développé une méthode permettant son impression directe dans un bain de gélatine/thrombine (méthode FRESH)⁷⁰.

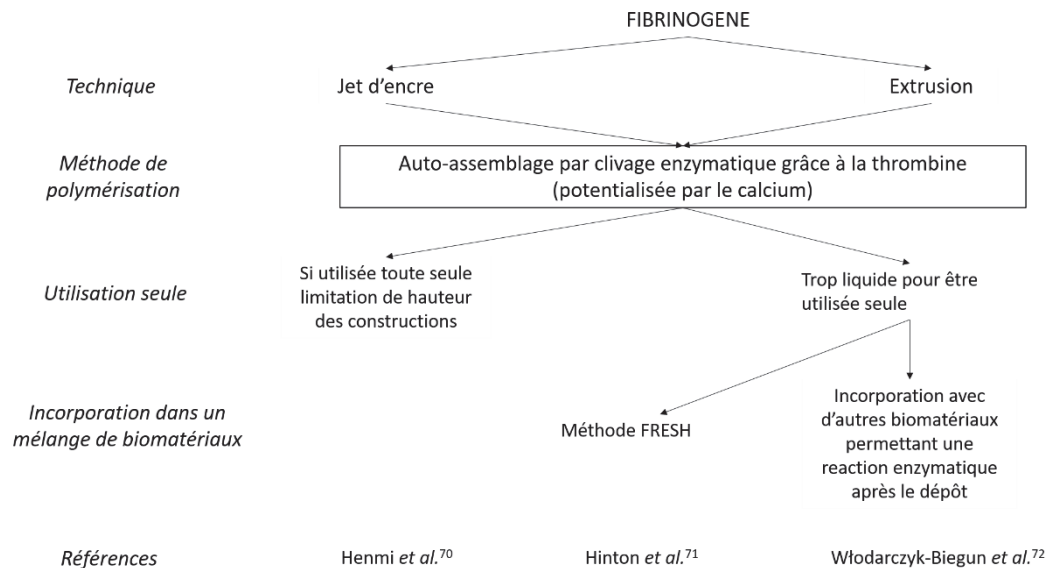


Figure 14. Description globale de l'utilisation du fibrinogène dans le domaine de la bioimpression 3D par jet d'encre et par extrusion⁷⁰⁻⁷²

Du fait de sa faible viscosité, le fibrinogène seul est principalement utilisé par la technique jet d'encre, comme substrat de dépôt de cellules ou comme fibrine (déjà auto-assemblée avant l'étape d'impression) cellularisée⁷¹.

La plupart du temps, on retrouve le fibrinogène comme un constituant de la bio-encre dans lequel il joue un rôle dans l'adhésion cellulaire. Après sa polymérisation (après impression), par immersion dans une solution de thrombine/calcium, il forme un réseau de fibrine insoluble supportant la structure 3D bioimprimée et permettant le développement cellulaire⁷².

II.4 Le collagène

II.4.1 Description

Le collagène est une famille de protéine fibrillaire qui représente une composante très abondante dans la plupart de la matrice extracellulaire des tissus⁷³. Chez les mammifères, on

retrouve 28 différents types de collagène qui contiennent tous au moins un domaine en triple hélice qui correspond à la répétition du triplet (Gly-X-Y)_n (X étant fréquemment la proline et Y l'hydroxyproline) dans la séquence d'acides aminés. Cette protéine joue un rôle fondamental dans la résistance à la traction des tissus. La synthèse du collagène commence par la sécrétion par les fibroblastes du procollagène. Une fois dans la matrice extracellulaire, l'association de trois chaînes polypeptidiques donne le tropocollagène. L'assemblage supramoléculaire de ce dernier permet la formation des fibrilles de collagène et plusieurs fibrilles associées engendrent la création d'une fibre de collagène mature (Figure 15)^{54,74}. Les fibres de collagène présentent de nombreuses séquences RGD (arginine-glycine-acide aspartique) essentielles à l'adhésion cellulaire (voir pages 36).

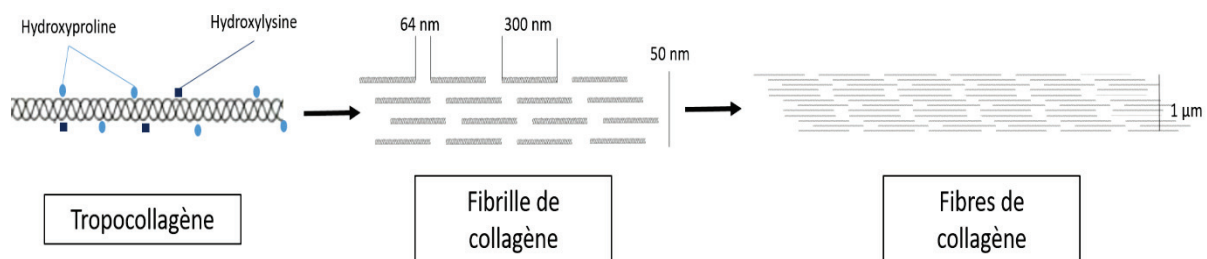


Figure 15. Représentation schématique (adapté de⁷⁵) de la formation du collagène mature à partir de la triple hélice du tropocollagène, puis de l'agencement en fibrilles de collagène pour donner une fibre de collagène mature.

II.4.2 Utilisation du collagène dans la bioimpression

Le collagène présente de nombreux avantages comme la biocompatibilité et la promotion de l'adhésion cellulaire. Son utilisation en ingénierie tissulaire est commune et bien décrite pour plusieurs tissus et principalement pour la peau⁷⁶. L'extraction de collagène des tissus vivants se fait par extraction acide (pH 2,5), le collagène à l'état de solution n'est alors pas compatible avec l'ajout de cellules. Pour son utilisation en bioimpression, il est nécessaire d'ajuster son pH par ajout de base jusqu'à obtenir un pH physiologique.

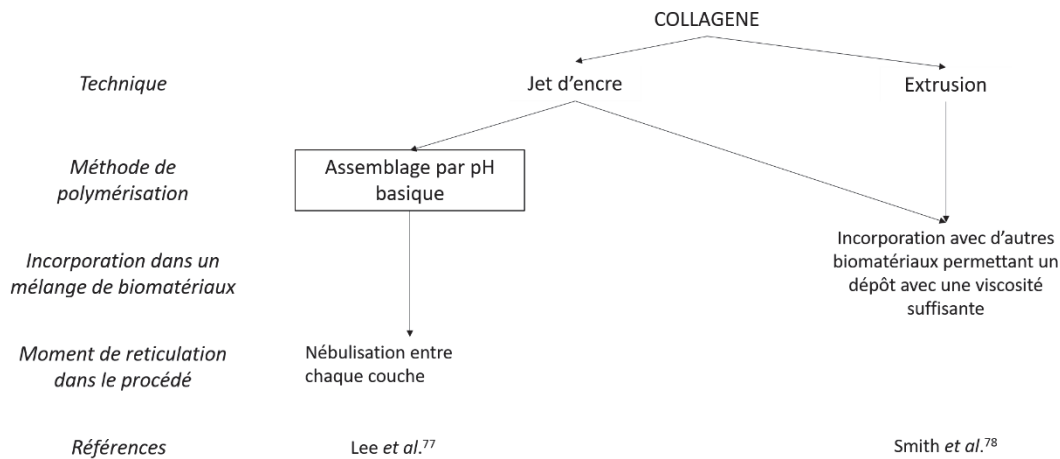


Figure 16. Description globale de l'utilisation du collagène dans le domaine de la bioimpression 3D par jet d'encre et par extrusion^{77,78}.

Lorsqu'il est utilisé pour l'extrusion, il est associé à d'autres biomatériaux qui vont lui apporter la tenue mécanique nécessaire à son dépôt sur le plateau d'impression⁷². Il a l'avantage de permettre l'adhésion des cellules à l'intérieur de la bio-encre. Cependant, comme son temps de gélification est lent, il est impossible de l'utiliser seul en extrusion. De plus, une fois sous forme d'hydrogel, il est peu stable sur le long terme⁷².

II.5 L'acide hyaluronique

II.5.1 Description

C'est un glycosaminoglycane (GAG) présent dans les tissus conjonctifs. C'est un polymère disaccharide formé de l'association de l'acide D-glucuronique et D-N-acétylglucosamine. Il n'est pas sulfaté contrairement aux autres GAG du corps humain⁷⁹. Il est présent dans le cartilage mais aussi dans les tissus conjonctifs où il participe à la bonne hydratation des tissus⁷⁹.

II.5.2 Utilisation de l'acide hyaluronique dans la bioimpression

Son utilisation en bioimpression est souvent couplée à sa modification par l'ajout de groupement méthacrylate afin de permettre sa photopolymérisation par UV⁸⁰ (même principe que la gélatine méthacrylate) ou par l'ajout de groupement thiol⁸¹ afin de permettre la formation de ponts dissulfures.

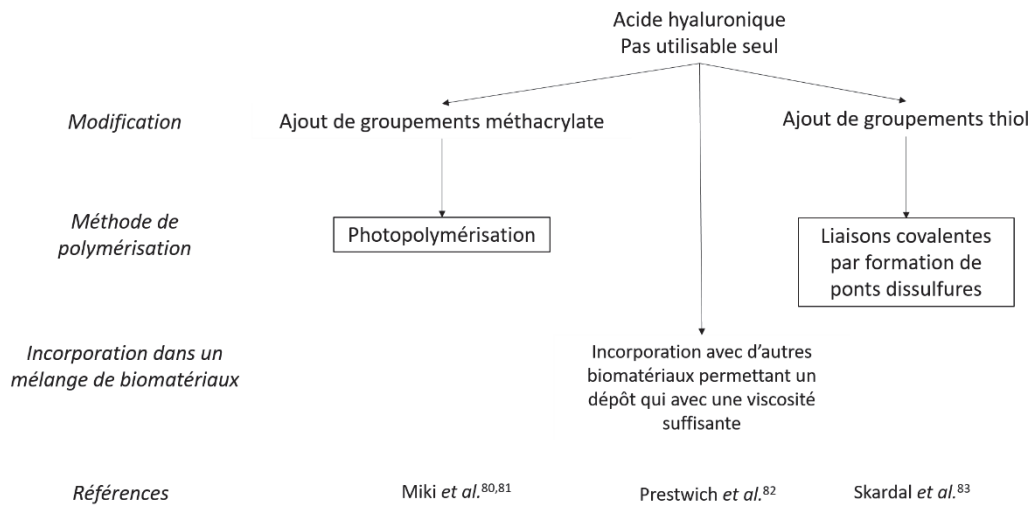


Figure 17. Description globale de l'utilisation du collagène dans le domaine de la bioimpression 3D par jet d'encre et par extrusion⁸⁰⁻⁸³.

Son utilisation présente l'avantage de permettre aux cellules d'adhérer dans la bio-encre après réticulation par le biais de molécules transmembranaires non intégriniques tels que les protéines de la famille CD44⁸⁴ (spécifique de la reconnaissance et de l'adhésion à l'acide hyaluronique). Il s'utilise toujours par incorporation avec d'autres biomatériaux^{85,86}.

II.6 Influence de la contrainte de cisaillement

L'interaction entre la surface de la buse (en contact avec les biomatériaux) et la pression appliquée pour l'extrusion du biomatériau détermine la contrainte de cisaillement subie par le matériau. Lorsque des cellules sont imprimées dans des hydrogels biocompatibles, elles subissent également ces forces, ce qui peut avoir un impact significatif sur la viabilité de ces cellules. Par exemple, une étude a évalué les effets des différentes pressions exercées sur leur viabilité. Ce travail a démontré que lorsque les constructions tissulaires étaient imprimées à 40 psi (2,8 Bars), la viabilité diminuait de près de 40% par rapport aux structures tissulaires imprimées à 5 psi (0,3 Bar)⁸⁷. Une autre étude a comparé les effets de contraintes de cisaillement : faibles (<5 kPa), modérées (5-10 kPa) et fortes (>10 kPa). Les résultats montrent que les cellules exposées à de faibles contraintes de cisaillement ne semblent pas affectées par le processus d'impression en ce qui concerne leur viabilité. Cependant, à des contraintes plus élevées (>5 kPa) la croissance cellulaire et le taux de prolifération est fortement affectée⁸⁸. Cela illustre l'effet important du cisaillement sur la viabilité cellulaire.

II.7 Support cellulaire pour la maturation tissulaire

En plus de toutes les spécificités à prendre en compte lors de l'utilisation de polymères pour la bioimpression, un élément clé reste à considérer : le microenvironnement. C'est l'environnement qui se retrouve au contact d'une cellule. En effet, même si l'hydrogel s'avère biocompatible, qu'il se dégrade de manière contrôlée, et qu'il a les propriétés mécaniques attendues, cela ne signifie pas que les cellules vont pouvoir y adhérer puis se multiplier. L'adhésion de celles-ci à leur environnement est crucial à leur survie⁸⁹.

Il faut pour cela qu'elles reconnaissent des domaines bien précis sur les chaînes de polymères, comme par exemple, le motif RGD⁹⁰, la séquence DGEA ou YISRG⁴⁴. Ces domaines servent alors d'ancrage aux cellules qui vont pouvoir retrouver leurs fonctions basales en induisant l'activation de protéines de signalisation par exemple. L'obtention d'un microenvironnement capable de contrôler le devenir des cellules est un enjeu majeur en ingénierie tissulaire⁹¹. En effet, le développement d'un tissu est régit par de nombreux facteurs régulateurs qui interagissent dynamiquement dans le temps et l'espace. Les récents développements concernent des systèmes se rapprochant le plus possible de l'environnement d'un tissu *in vivo* et contrôlable³¹. Un tel biomimétisme résulte d'une parfaite synchronisation entre les facteurs biologiques et physiques permettant aux cellules de se différencier et de proliférer au bon endroit, au bon moment tout en conservant le phénotype d'intérêt et en formant un tissu fonctionnel. Cet environnement doit donc apporter tous les signaux nécessaires, moléculaires, structurels et physiques pour garantir la régénération tissulaire. C'est également pour cette raison qu'un nombre croissant d'études s'intéresse aux bio-encre formulées à partir de tissus cibles décellularisés et hydrolysés. En utilisant la matrice extracellulaire dont les cellules *in vivo* sont issues, leur développement *in vitro* sera facilité par la reconnaissance de la matrice extracellulaire dont elles sont issues en permettant leur développement physiologique⁹²⁻⁹⁴.

En résumé, le ou les biomatériaux doivent posséder :

- Les propriétés mécaniques appropriées pour permettre le dépôt de matière (soit par extrusion soit par jet d'encre),
- La conservation de la forme 3D dans sa globalité après l'impression,

- Un environnement favorable à la survie des cellules et ce pendant toutes les étapes de la bioimpression.

III. La bioimpression 3D de tissus

Cultiver et caractériser un tissu en 3D requiert des outils et des conditions de culture spécifiques. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux tissus bioimprimés fonctionnels ainsi qu'à leur maturation avec pour but final la fabrication de substituts implantables chez l'homme.

Au début des années 2000, rien que le fait d'imprimer avec des cellules est une avancée scientifique majeure pour ce domaine émergent⁹⁵. Plusieurs études datant de 2011 montrent que l'impression seule, n'est pas néfaste pour la survie des cellules^{96,97}. A partir de là, de très nombreuses preuves de concept voient le jour et un tout nouveau champ de recherche émerge : la bioimpression 3D de tissus.

Dès lors, l'impression de cellules fait ses preuves dans de nombreuses publications scientifiques. Cependant, le défi reste immense quand il s'agit de transformer des couches d'hydrogel cellularisé en un tissu fonctionnel⁹⁸.

La bioimpression 3D de tissus concerne quasiment tous les types cellulaires présent dans le corps humain. Cependant, les niveaux d'avancement de ces recherches dépendent fortement des domaines d'application et une forte hétérogénéité est observée dans les résultats. Ces études varient de la simple preuve de concept de bioimpression 3D de cellules à la bioimpression 3D *in vivo* chez l'animal. Dans ce paragraphe, nous allons nous concentrer sur les tissus dermiques, cartilagineux et vasculaires avec premièrement un état de l'art de la composition de ces tissus cibles (matrice extracellulaire et cellules présentes), puis deuxièmement un aperçu des techniques d'ingénierie tissulaire classique pour la reconstruction *in vitro* de ces tissus et troisièmement, les différentes stratégies de bioimpression 3D de peau, de cartilage et de structures vasculaires. Pour finir, une description non-exhaustive des dernières avancées de bioimpression 3D de tissus hautement spécifiques et complexes sera présentée.

III.1 La peau

III.1.1 Physiologie de la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain puisqu'elle représente en moyenne 16 % de la masse totale d'un individu adulte pour une surface de 2m^2 ⁹⁹. Elle représente la première défense de l'organisme contre les agressions extérieures, joue un rôle majeur contre la déshydratation et assure la protection contre les rayonnements UV. Grâce à ses multiples terminaisons nerveuses, elle fait également partie des organes sensoriels et nous permet de percevoir un grand nombre de stimuli différents qu'ils soient mécaniques (pression, vibration), thermiques ou douloureux (= la nociception).

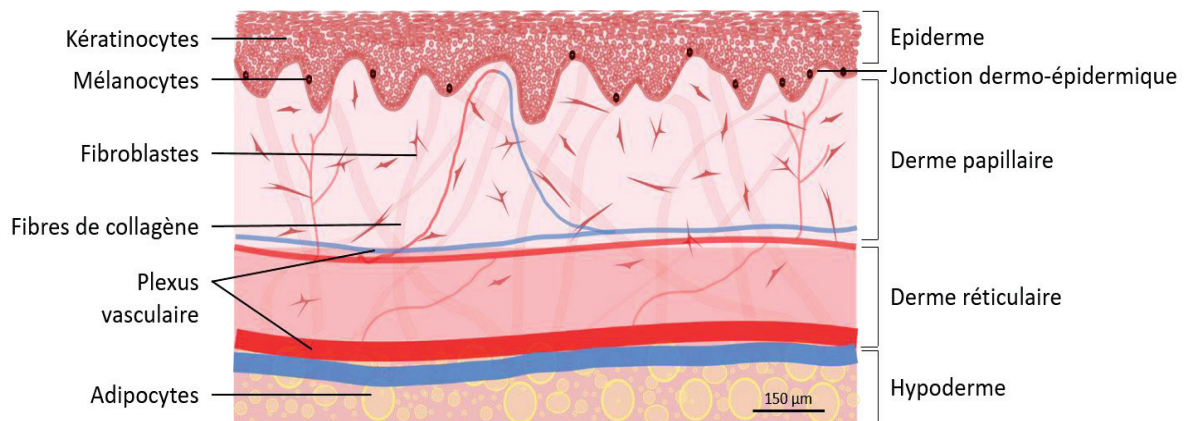


Figure 18. Représentation schématique des différentes couches de la peau avec l'épiderme en surface, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme, librement adapté de¹⁰⁰.

La peau est constituée de 3 couches distinctes (de l'extérieur vers l'intérieur) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 18). Son épaisseur est variable en fonction de sa localisation, par exemple, elle ne fera pas plus d'un millimètre sur les paupières alors qu'elle peut atteindre 4 mm sous la plante des pieds¹⁰¹.

III.1.1.1 L'épiderme

Ce tissu est un épithélium squameux stratifié kératinisé avasculaire, composé essentiellement de kératinocytes qui assurent une barrière jointive contre l'extérieur¹¹. Il est également constitué des mélanocytes qui confèrent à la peau sa couleur, des cellules de Merkel permettant la perception tactile, et des cellules de Langerhans qui sont impliquées dans les réactions du système immunitaire¹⁰².

L'épiderme est organisé en 4 couches (Figure 19) distinctes, correspondant chacune à un état de différenciation des kératinocytes, de l'extérieur vers l'intérieur¹⁰³ :

- La couche cornée ou *stratum corneum* qui est constituée des cornéocytes ou cellules cornée qui résultent d'un processus de maturation des kératinocytes, dit de « kératinisation ». Ce sont des cellules apoptotiques, jointives et remplies de kératine.
- La couche granuleuse ou *stratum granulosum*, dans laquelle les cellules sont chargées de grains de kératohyaline.
- La couche de Malpighi/épineuse ou *stratum spinosum*, où les cellules sont liées entre-elles par de nombreux desmosomes qui leur donne un aspect « épineux », lors de l'examen des coupes histologiques.
- La couche basale ou *stratum germinativum* composée des cellules souches épidermiques qui prolifèrent pour donner naissance aux kératinocytes des couches plus superficielles. Ces cellules sont reliées à la membrane basale par des hémidesmosomes.

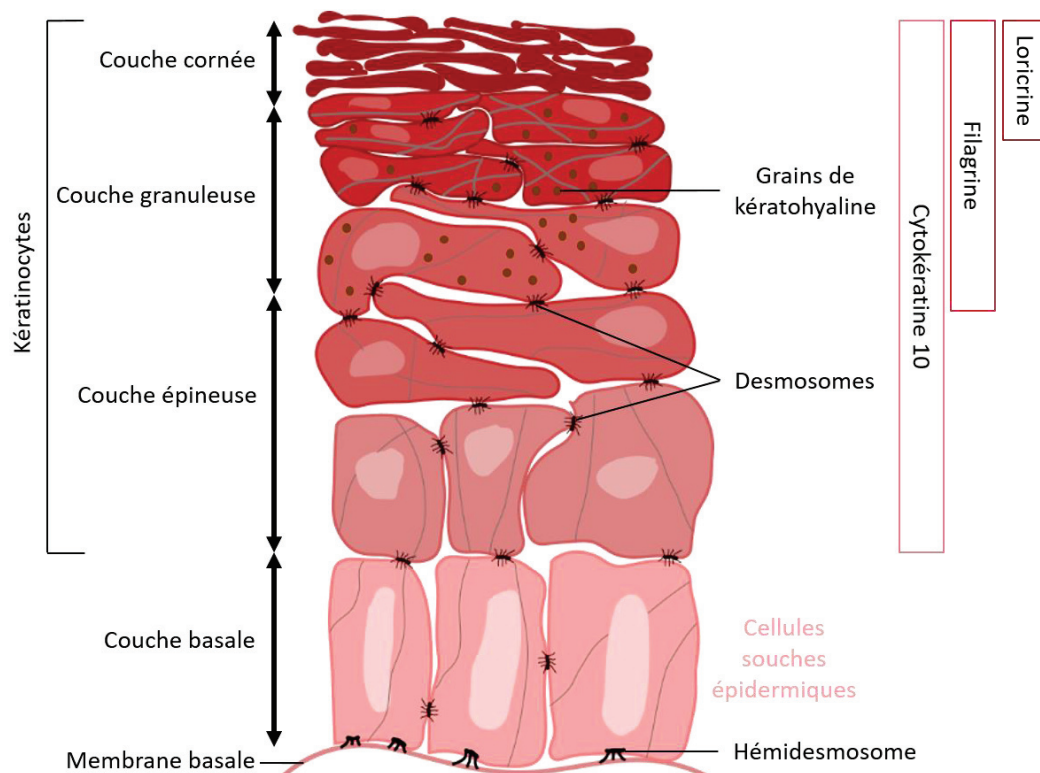


Figure 19. Schéma représentant les quatre couches principales de l'épiderme avec leurs organites spécifiques ainsi que les protéines majoritaires (cytokératine 10, filagrine et loricrine) en fonction de leur localisation¹⁰³.

Pour caractériser un épiderme sain, la présence de plusieurs protéines spécifiques peut être identifiée (Figure 18). La cytokératine 10 qui se localise dans les trois dernières couches de l'épiderme atteste de la différenciation des cellules épithéliales en kératinocytes¹⁰⁴. La filagrine qui se situe dans les deux dernières couches en se liant à la kératine est un témoin de la qualité de la stratification de l'épiderme¹⁰⁴. La loricine, spécifique de la couche cornée est représentative de la fonction de barrière cutanée de la peau¹⁰⁵.

III.1.1.2 La jonction dermo-épidermique

C'est une membrane basale qui sépare la couche épidermique de la couche dermique, et sur laquelle est ancrée la couche basale de kératinocytes. Elle est composée principalement de collagène de type IV et VII sécrété à la fois par les kératinocytes de l'épiderme et par les fibroblastes du derme¹⁰⁶. Son rôle premier est celui d'ancrage qui permet aux kératinocytes de s'orienter pour une différenciation optimale. Son second rôle implique la communication entre les deux couches de la peau et une diffusivité des nutriments jusqu'aux kératinocytes. Son intégrité est le signe d'une peau ou d'un modèle de peau fonctionnelle et bien organisé¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La détection de plusieurs protéines spécifiques comme la laminine 332 et le collagène VII par immunomarquage par exemple, est signe d'une jonction dermo-épidermique saine¹⁰⁶.

III.1.1.3 Le derme

C'est un tissu conjonctif composé principalement de fibroblastes et de cellules dermiques du système immunitaire (macrophages, mastocytes et cellules dendritiques). On distingue deux régions différentes dans le derme. La partie la plus superficielle est appelée derme papillaire dans lequel on retrouve les fibroblastes avec une forte activité de synthèse matricielle¹⁰⁹. Il est séparé du derme réticulaire par le plexus vasculaire qui est un réseau constitué de capillaires artério-veineux formant un « lit » vasculaire¹⁰⁰. La dernière partie, plus dense et au contact de l'hypoderme, contient des fibres de la matrice extracellulaire de diamètre plus important (entre 75 et 105 nm) ayant une orientation préférentiellement parallèle à la surface de la peau et lui donnant sa résistance¹⁰⁹ (Figure 20).

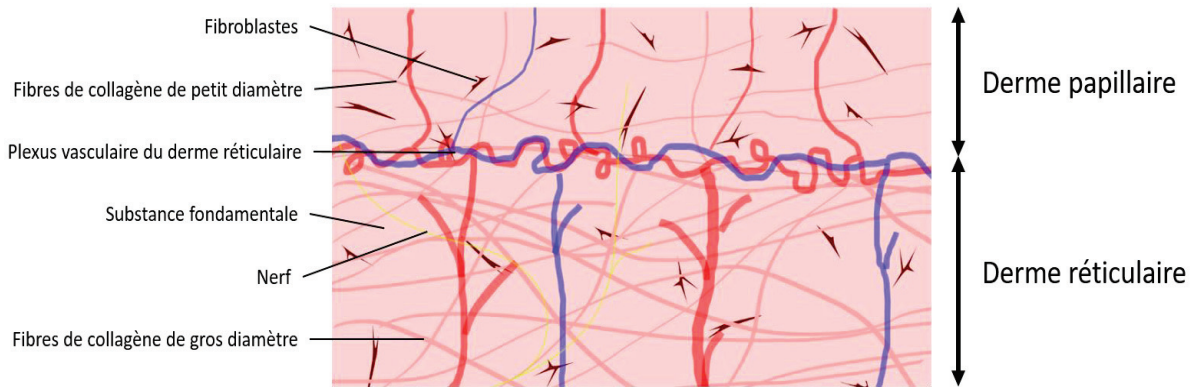


Figure 20. Schéma représentatif du derme avec deux régions distinctes : le derme papillaire associée à une proportion de cellules/matrice extracellulaire équivalente et le derme réticulaire avec une prédominance de la matrice extracellulaire ¹⁰⁹.

III.1.1.3.1 Les cellules du derme

Les cellules les plus représentées dans le derme sont les fibroblastes¹¹⁰. En 2D comme en 3D, elles adoptent des formes fusiformes caractérisées par des pseudopodes très fins. Ces cellules sont des dérivés des cellules souches mésenchymateuses qui sont responsables de la synthèse et de la dégradation des protéoglycanes et des glycoprotéines de la matrice extracellulaire, ainsi que de la sécrétion d'un certains nombres de signaux/facteurs solubles et de facteurs de croissance¹¹¹. Ils sont définis comme des cellules adhérentes qui ne sont d'origine ni endothéliale, ni épithéliale, ni hématopoïétique¹¹². Ils ont aussi un rôle important dans la cicatrisation via leur changement phénotypique en myofibroblastes¹¹³ et dans la régulation de l'inflammation. De plus, ils sont responsables de la sécrétion des enzymes telles que la collagénase et des protéases matricielles permettant de dégrader la matrice extracellulaire afin de la renouveler et de la réorganiser¹¹⁴.

III.1.1.3.2 La matrice extracellulaire du derme

La matrice extracellulaire du derme est une structure complexe, constituée de fibres élastiques et de fibres de collagène. Trois types de fibres élastiques sont décrits dans la littérature grâce à leurs variations de composition biochimique¹⁰⁹ :

- Les fibres oxytalanes composées de microfibrilles principalement constituées de fibrilline,

- Les fibres d'élaunine dites immatures composées majoritairement de microfibrilles et de peu d'élastine (elle-même formée de l'assemblage de monomère de tropoélastine),
- Les fibres élastiques matures composées de peu de microfibrilles et majoritairement d'élastine.

Les fibres de collagène sont regroupées en deux catégories : les fibres de collagène de diamètre élevé (en moyenne 90 nm) regroupées en faisceaux denses et les fibres de réticuline de diamètre inférieur à 60 nm organisées en trousseaux lâches. Ces dernières sont principalement localisées à proximité de la jonction dermo-épidermique⁷⁴.

Entre les cellules et le réseau de fibre se trouve la substance fondamentale (ou matrice extrafibrillaire) qui contient essentiellement des glycosaminoglycanes non sulfatés comme l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycanes sulfatés qui s'associent au réseau fibrillaire pour donner des protéoglycanes. La substance fondamentale est aussi composée de protéines d'adhérence telles que la fibronectine et les laminines. Cet ensemble forme un gel qui permet la circulation des facteurs de signalisation cellulaire indispensable à la migration et à la prolifération cellulaire¹¹⁵.

La matrice extracellulaire du derme lui confère ses propriétés anisotropiques : l'orientation des fibres, de collagène notamment, lui donne une forte résistance à la traction. Les études réalisées par indentation *in vivo* indiquent des valeurs de module de Young comprises entre 0,001 et 10 MPa^{115,116}. Les variations de ces valeurs dépendent très fortement de l'âge de la personne et de la méthode de caractérisation.

III.1.2 Etude de la reconstruction de la peau *in vitro* par ingénierie tissulaire classique

L'évolution des modèles de peau équivalente en trois dimensions et reconstruit par ingénierie tissulaire ne cesse de s'accélérer. Depuis les premières cultures de kératinocytes¹² sur les couches nourricières, les recherches pour produire des substituts de peau sont motivées par le défi de traiter les grands brûlés (atteinte de plus de 70% du corps), les plaies chroniques (difficilement cicatrisables) et par la réglementation européenne exigeant des preuves d'innocuité et d'efficacité des produits cosmétiques tout en supprimant les tests sur

les animaux. Cette demande conduit à l'évolution et à la complexification des peaux reconstruites.

Le premier modèle décrit de peau équivalente proposé par Karasek et Charlton en 1971¹¹⁷ utilise un hydrogel de collagène. Il a été produit par extraction acide du collagène d'une queue de rat, puis reconstitué dans une boîte de pétri par élévation du pH grâce à des vapeurs d'ammoniac. Le pH a été ensuite équilibré par des bains successifs de DMEM. Les fibroblastes ont ainsi pu êtreensemencés sur cette matrice à l'intérieur de laquelle ils ont pu migrer. Ce modèle a évolué depuis pour permettre, à la surface de l'hydrogel de collagène cellularisé par les fibroblastes, l'ensemencement de kératinocytes. Les kératinocytes se multiplient et prolifèrent, entraînant la formation d'un épiderme. La différenciation épidermique est améliorée par l'élévation du tissu à l'interface air-liquide¹¹⁸⁻¹²⁰.

L'utilisation d'une matrice de collagène présente des désavantages (II.4.2) c'est pourquoi d'autres équipes se sont intéressées à différentes matrices d'ensemencement, comme l'éponge de collagène-glycosaminoglycane-chitosane. Elle est préparée par le mélange de collagène de type I et III, de chitosane et de chondroïtine 4-6 sulfate. Ce mélange est ensuite congelé puis lyophilisé pour être utilisé comme substrat de développement aux fibroblastes qui serontensemencés¹²¹. Le résultat est l'obtention d'une matrice extracellulaire nouvellement synthétisée et contenant toutes les macromolécules souhaitées. Ce derme ainsi reconstruit permet le développement et la régénération d'un épiderme pluristratifié et différencié avec la présence d'une jonction dermo-épidermique organisée¹²². En effet, l'association *in vitro* des fibroblastes et des kératinocytes permet d'aboutir à une synergie avec des sécrétions de facteurs de croissance bien supérieures à celles observées en présence d'une seule lignée¹²². On appelle cette association du derme et de l'épiderme : la peau totale reconstruite.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour la peau, la littérature décrit peu les propriétés mécaniques des substituts obtenus. Une étude¹²³ utilisant les éponges de collagènes décrites précédemment et commercialisées, entre autre, par BASF (MIMEDisc™ BASF BCS, France), montre que cette matrice acellulaire possède un module de Young de 4 kPa, le derme reconstruit par des fibroblastes (après 28 jours de maturation) permet de constater une augmentation de celui-ci à 9 kPa tandis que la peau totale reconstruite (ajout des kératinocytes à J28, puis culture immergée 7 jours et interface air-liquide 14 jours) a un

module de Young atteignant 83 kPa. Cette augmentation montre bien l'effet de la sécrétion matricielle (caractérisée histologiquement dans le même temps) sur la résistance de ces substituts. De plus, l'ensemencement des kératinocytes au sommet du derme reconstruit stimule le métabolisme des fibroblastes. Ces résultats sont à mettre en regard des valeurs *in vivo* qui se situent dans le même ordre de grandeur. Là aussi les méthodes de caractérisation vont fortement influencer les résultats.

Ces stratégies de reconstruction de peaux équivalentes montrent que les fibroblastes ensemencés dans une matrice sont capables de sécréter de la matrice extracellulaire. La qualité du derme généré va favoriser le bon développement d'un épiderme pluristratifié avec une jonction dermo-épidermique organisée. Cependant, la génération de structures plus larges intégrant des propriétés mécaniques du même ordre de grandeur que la peau *in vivo*, n'est pas encore disponible.

III.1.3 La bioimpression 3D de peau

La peau fait partie des tissus les plus étudiés en bioimpression 3D. Sa stratification en couche fait d'elle un sujet adapté pour commencer la bioimpression 3D et valider de nouveaux concepts d'impression ou de nouvelles bio-encres.

En 2014, Lee et al¹²⁴, ont été les premiers à déposer des kératinocytes et des fibroblastes en un arrangement stratifié, comme présenté sur la Figure 21. Ils utilisent la technologie de jet d'encre avec deux seringues distinctes, la première composée d'un précurseur de collagène de type I à une concentration de 3 mg/mL et la deuxième de cellules en suspension avec des densités allant de 0,5 à 2 millions de cellules/mL pour les fibroblastes et de 0,5 à 5 millions de cellules/mL pour les kératinocytes. La bioimpression commence par l'éjection de gouttelettes de collagène (52 nL) pour former la première couche avec une étape de polymérisation basique du collagène par nébulisation de bicarbonate de sodium. Ensuite, la construction tissulaire se poursuit par l'alternance de deux couches de collagène puis une couche de fibroblastes, trois fois de suite. Les deux dernières couches sont composées des kératinocytes seuls. L'hydrogel ainsi cellularisé va être mis en culture (immérgé pendant 4 à 8 jours) pour ensuite subir une phase de maturation à l'interface air-liquide afin de permettre aux kératinocytes de se différencier (pendant 10 à 14 jours).

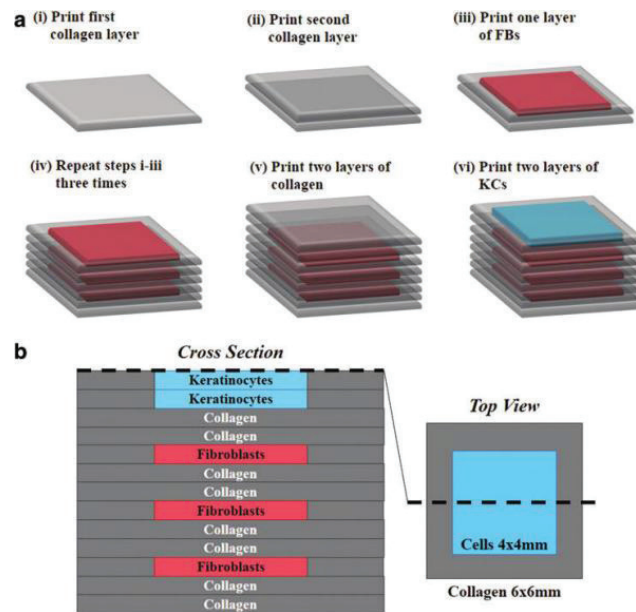


Figure 21. Construction de tissu cutané tridimensionnel. (a) Impression couche par couche de la matrice de collagène, des kératinocytes et des fibroblastes pour construire les compartiments dermique et épidermique dans une seule structure. (b) Schéma du tissu cutané imprimé en 3D montrant la coupe (à gauche) et la vue du dessus (à droite) ¹²⁴.

Les caractérisations histologiques du tissu nouvellement formé, après sa maturation à l'interface air-liquide, montre un épithélium pluristratifié qui se développe sur un équivalent de derme contenant des fibroblastes et une matrice de collagène. Ce modèle de peau bioimprimé conserve la forme et les dimensions 3D donnés lors de l'impression pendant la phase de maturation.

Cette étude préliminaire présente pour la première fois la bioimpression de peau (fibroblastes et kératinocytes). Cependant, les caractérisations histologiques se limitent à l'organisation générale sans évoquer la fonctionnalité du tissu. De plus, l'impression d'un tissu de 6 x 6 x 1,2 mm avec la technologie jet d'encre est chronophage : 60 minutes.

Binder *et al.* ¹²⁵, en 2011, ont quant à eux été les premiers à bioimprimer directement sur une plaie cutanée *in vivo*, grâce à la technologie de jet d'encre. Une fois la plaie scannée grâce à un laser pour en déterminer la profondeur ainsi que la largeur, ils ont grâce à une imprimante jet d'encre, délivrés leur bio-encre composée de fibroblastes, de kératinocytes et de fibrine. L'épithélialisation de la plaie a été observée après deux semaines avec une ré-épithélialisation complète après huit semaines.

Dans un souci de complexification des modèles, une autre équipe de chercheurs a inclus au sein de leur encre des mélanocytes afin d'obtenir une peau pigmentée¹²⁶. Ils se sont tout d'abord penchés sur la formulation d'un milieu de culture pouvant supporter la prolifération de trois types cellulaires différents : les kératinocytes, les mélanocytes ainsi que les fibroblastes. Là encore, la biofabrication de ce tissu découle de plusieurs étapes : tout d'abord, l'impression de collagène-fibroblastes grâce à la technologie de jet d'encre, puis quatre jours plus tard celle des kératinocytes-mélanocytes (avec cette même technologie). Ces derniers sont intégrés dans une bio-encre de PolyVinylPyrrolidone (PVP) décrit dans un travail précédent¹²⁷.

Pour avoir un point de comparaison dans cette nouvelle approche, ils ont réalisé la même expérimentation avec cette fois-ci, un dépôt manuel du mélange de cellules kératinocytes-mélanocytes. L'ensemencement manuel ne permet pas une pigmentation homogène (Figure 22 à droite). Leurs résultats montrent une facilité de déposition lors de l'étape de bioimpression des kératinocytes-mélanocytes avec une distribution homogène des granules de mélanine (Figure 22 à gauche). Les kératinocytes sont, quant à eux, bien développés de manière stratifiés et différenciés ce qui est essentiel pour le transfert de mélanine (des mélanocytes aux kératinocytes) et l'obtention d'une peau totale pigmentée et fonctionnelle.

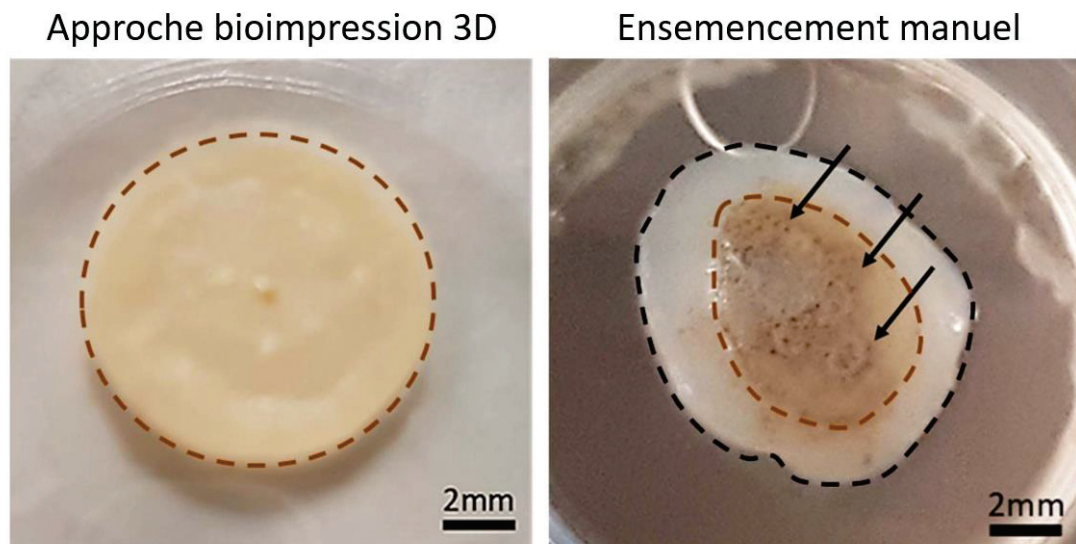


Figure 22. Images représentatives de constructions de peaux humaines pigmentées fabriquées par deux approches différentes. A gauche, l'approche par bioimpression 3D de peau de mouton pigmentée avec une pigmentation uniforme de la peau, la zone pigmentée est entourée par la ligne en pointillée marron. (Droite) A droite, l'approche d'ensemencement manuel, avec une pigmentation inégale et la présence de taches pigmentées foncées indiquées par les flèches noires, la zone pigmentée est entourée par la ligne pointillée brune tandis que la zone non pigmentée est entourée par la ligne pointillée noire; barre d'échelle: 2 mm¹²⁶.

L'utilisation de la technologie de bioextrusion pour la bioimpression de peau est peu répandue. L'équipe de Dong-Woo Cho¹²⁸ a développé un système de trois impressions distinctes en une seule étape en proposant une solution à la rétractation du derme (lors de la phase de maturation) grâce à un insert imprimé sur-mesure et dans le même temps d'impression. L'autre innovation vient de la combinaison de trois technologies de bioimpression dans le même objet. En effet, l'insert est imprimé en PolyCaproLactone grâce à l'extrusion, puis le derme est bioimprimé par bioextrusion. Ce dernier est composé de fibroblastes (à une concentration de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL) et de collagène de type I. Après trois jours de maturation en culture immergée, les kératinocytes (à une concentration de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL) vont être bioimprimés avec la technologie de jet d'encre.

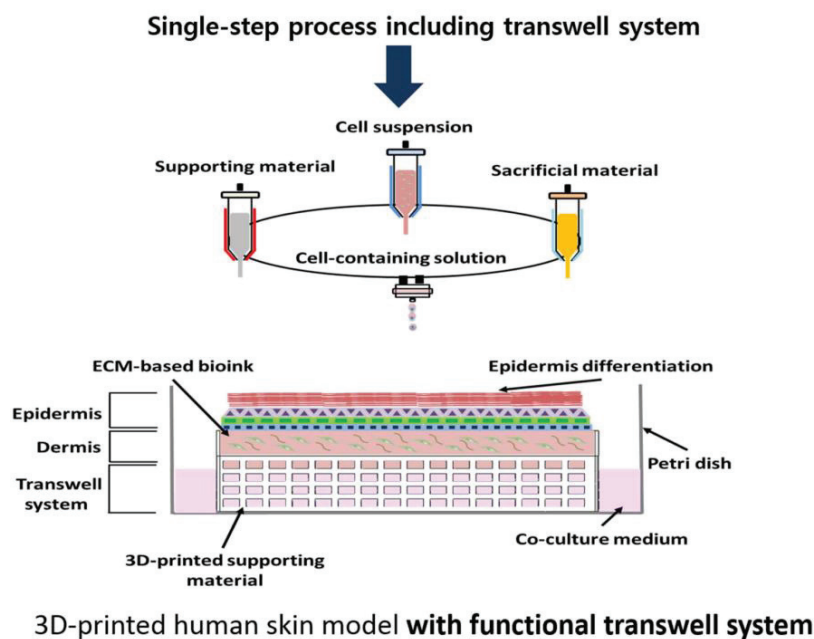


Figure 23. Représentation schématique de la fabrication et de l'étape de maturation d'un modèle de peau bioimprimée avec un insert lui aussi imprimé, le tout en un procédé comprenant une seule étape¹²⁸.

La présence d'un insert sur-mesure présente des avantages certains. Outre l'économie, il permet d'empêcher la rétractation du derme et ainsi permettre d'ensemencer les kératinocytes en une seule étape de bioimpression. Les résultats en immunofluorescence montrent la présence de collagène de type I dans le derme (sans témoin difficile de conclure sur la néo-sécrétion par les fibroblastes) et la présence de la cytokératine 10, témoin de la différenciation épidermique.

Au cours des dix dernières années, la conception par bioimpression 3D d'une peau similaire à une peau humaine normale est à l'étude dans plusieurs laboratoires. Bien que la structure cutanée complexe bioimprimée ne soit pas encore atteinte, les résultats actuels montrent des progrès significatifs dans la création de peaux équivalentes. Pour résumer¹²⁹ :

- Les cellules les plus utilisées sont les fibroblastes pour le derme et les kératinocytes pour l'épiderme. La majorité des peaux reconstruites par bioimpression 3D contiennent ces deux types cellulaires mais dans une peau humaine native on rencontre une complexité supérieure avec la présence de mélanocytes pour la pigmentation, de cellules endothéliales pour la vascularisation, des follicules pileux et des glandes sébacées^{130,131}. Afin d'obtenir une peau complète, les recherches devront se concentrer sur l'intégration de ses différents types cellulaires par des bioimpressions 3D multicellulaires.
- Les deux technologies principales qui sont le jet d'encre et la bioextrusion semblent être bien adaptées surtout quand les deux sont combinées respectivement pour la bioimpression de kératinocytes et de fibroblastes. La bioimpression multicellulaire exige un positionnement précis et local de certains types cellulaires qui est supporté par les évolutions technologiques des nouvelles bioimprimantes combinant plusieurs technologies¹²⁸.
- En ce qui concerne les biomatériaux, les plus utilisés sont le collagène, le fibrinogène, la gélatine et l'alginate¹³². Cependant, ces biomatériaux, seuls ou dans un mélange, présentent des propriétés mécaniques inférieurs à celles de la peau humaine normale¹⁰⁰. De plus, si l'on envisage à plus long terme, des greffes de peaux bioimprimées, ces biomatériaux devront être approuvés règlementairement et de grade clinique, ce qui est déjà le cas pour certaines référence de fibrinogène, de gélatine et d'alginate.
- Au niveau de la maturation, la méthode de référence porte sur la culture tout d'abord immergée et statique, suivie d'une phase à l'interface air-liquide pour provoquer la différenciation de l'épiderme¹¹. Cette maturation peut évoluer grâce à l'apport des bioréacteurs afin d'augmenter l'organisation de la matrice extracellulaire. Pour l'instant très peu d'études impliquent la mise sous contrainte de peaux bioimprimées, c'est une des innovations à envisager.

- Les caractérisations des peaux bioimprimées doivent prendre en compte l'organisation complexe et à différentes échelles de la peau, en utilisant une combinaison de plusieurs techniques comme l'immunohistologie pour la détection des marqueurs de l'épiderme par exemple, mais aussi la microscopie électronique pour rendre compte de l'ultrastructure de la jonction dermo-épidermique. Une stratification correcte concomitante avec la localisation des marqueurs de la différenciation épidermique est un indicateur important d'un comportement épidermique normal et donc un témoin d'une reconstruction physiologique¹³³.

III.2 Le cartilage

III.2.1 Physiologie du cartilage

Il existe plusieurs types de cartilage dans le corps humain : le cartilage articulaire ou hyalin, le cartilage élastique (qu'on retrouve par exemple dans le nez ou dans l'oreille) et le cartilage de croissance. Le cartilage articulaire se retrouve sur les régions épiphysaires de l'os. C'est un tissu conjonctif hautement spécialisé, sans innervation ni vascularisation, qui permet grâce à ses propriétés mécaniques de jouer un rôle d'amortisseur et de protecteur. En effet, il va favoriser le glissement des surfaces osseuses entre elles, grâce à un coefficient de friction extrêmement faible, et rendre possible le mouvement d'une articulation¹³⁴.

Il possède d'excellentes propriétés biomécaniques de résistance à la pression¹³⁵ par une charge physiologique permanente (environ 15 MPa) grâce à une matrice extracellulaire extrêmement riche en eau et en collagène de type II¹³⁶.

III.2.1.1 Les cellules du cartilage articulaire

Le cartilage hyalin est constitué d'un seul type cellulaire : les chondrocytes. Ils occupent en moyenne 10% du volume total du cartilage et proviennent de cellules souches mésenchymateuses qui se différencient, sous l'influence de facteurs de croissance, en chondroprogéniteurs puis en chondroblastes, et enfin en chondrocytes (Figure 24). La combinaison des facteurs de différenciation et de transcription intervient à des stades et à des niveaux très précis. Ce procédé de différenciation cellulaire implique un changement constant du microenvironnement qui va guider les cellules vers leur état différencié¹³⁷.

Les chondrocytes possèdent une activité de synthèse matricielle très importante. En raison du caractère avasculaire de ce tissu, les nutriments diffusent uniquement depuis le liquide synovial pour les couches superficielles et grâce à l'os sous-chondral pour les couches profondes. Chaque chondrocyte établit un microenvironnement spécialisé avec une responsabilité dans la sécrétion de la matrice extracellulaire adjacente. Le chondrocyte ainsi piégé, ne migre plus, et ne se divise plus : ce sont des cellules quiescentes^{135,138}. Les chondrocytes répondent cependant à une multitude de stimuli biochimiques (facteurs de croissance) et physiques (pression mécanique). Ainsi, suivant les différents signaux perçus, ils

sont responsables de la production, de l'organisation et du maintien de l'intégrité du cartilage¹³⁸.

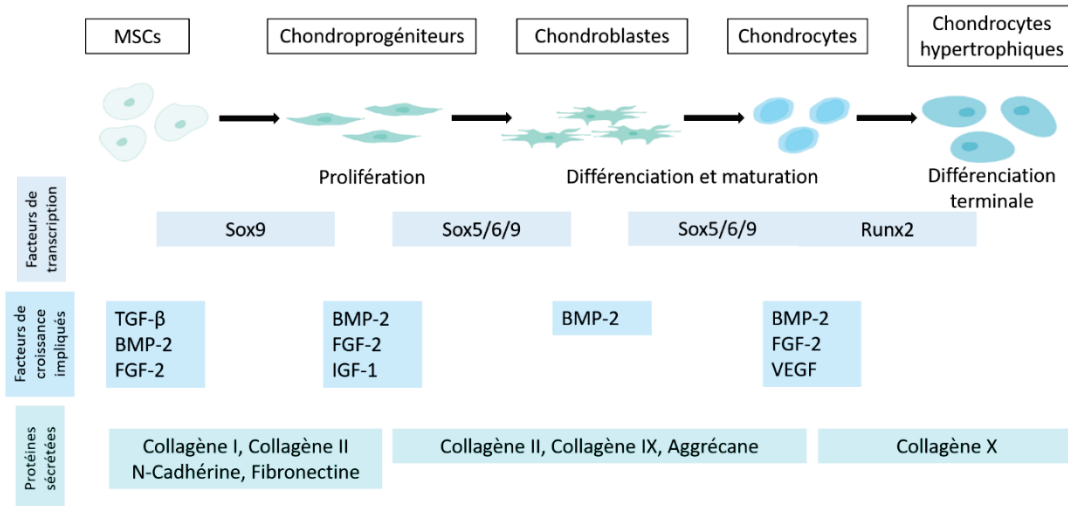


Figure 24. La chondrogenèse (adapté de¹³⁷) : séquence schématique d'événements conduisant à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) jusqu'aux chondrocytes.

III.2.1.2 La matrice extracellulaire du cartilage

Elle est composée d'un mélange de protéines et de glycosaminoglycanes dont la composition varie en fonction de la profondeur dans le tissu (Figure 25). Elle est composée principalement de collagène de type II (en moyenne 60 %) et de protéoglycanes (5 à 10 %) comme l'aggrécane, la chondroïtine sulfate, la kératine sulfate et des glycosaminoglycanes qui permettent aux chondrocytes de s'ancrer. L'association de tous ces composés matriciels permet de retenir efficacement une certaine quantité d'eau (20 à 40 %) en apportant les propriétés mécaniques de résistance à la compression des articulations¹³⁸.

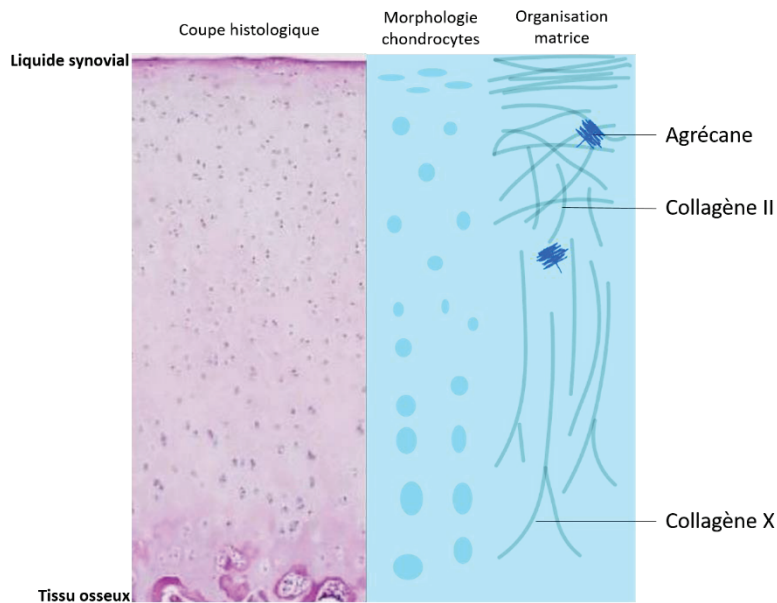


Figure 25. Schéma représentatif de l'organisation du cartilage articulaire. A gauche, coupe histologique hématoxyline/éosine. A droite, la morphologie des chondrocytes en fonction de leur localisation et l'organisation de la matrice extracellulaire¹³⁹.

L'altération de cette matrice extracellulaire conduit à la dédifférenciation des chondrocytes. La disposition de ce réseau tridimensionnel et la répartition des molécules d'eau à l'intérieur maintiennent donc les chondrocytes dans un état différencié.

Des valeurs de propriétés mécaniques du cartilage sont complexes à obtenir à partir de la littérature, notamment à cause d'un nombre élevé d'appareillages différents utilisables en fonction des tests (compression, traction, cisaillement) ou des méthodes de mise en œuvre (dynamique, statique, milieu confiné). Ceci explique les nombreuses divergences trouvées dans la littérature. La mesure de compression grâce à du cartilage prélevé (ex-vivo) permet néanmoins d'avoir une idée de l'ordre de grandeur du module de Young compris entre 5 et 30 MPa¹⁴⁰.

III.2.2 La reconstruction *in vitro* de cartilage par ingénierie tissulaire classique

Quand il est endommagé, les lésions du cartilage sont comblées par un tissu cicatriciel que l'on nomme le fibrocartilage. C'est un tissu cartilagineux qui possède des propriétés biomécaniques inférieures à ceux des tissus sains, conduisant au développement de pathologies arthrosiques. Selon le type de lésions, plusieurs techniques de réparation peuvent être envisagées :

- La chirurgie : microfracture, autogreffe ostéocondrale ou injection de chondrocytes

- L'ingénierie tissulaire du cartilage.

Pour cette dernière option, deux choix apparaissent pour la sélection de la source cellulaire. En effet, le chondrocyte semble être le candidat idéal puisqu'il est le seul représentant du cartilage mature. Cependant, deux inconvénients notables existent. Premièrement, le prélèvement de cartilage est un acte invasif et il doit être réalisé sur des zones non portantes, ce qui limite sa disponibilité et augmente la morbidité. Deuxièmement, l'expansion des cellules prélevées et cultivées en monocouche pose problème en raison de l'instabilité phénotypique des chondrocytes. Ils vont avoir tendance à se différencier, en sécrétant préférentiellement du collagène de type I ce qui induit la formation d'une matrice fibreuse cicatricielle¹³⁹.

Actuellement, les recherches s'orientent vers l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (prélèvement de moelle osseuse ou de tissus adipeux) dont la différenciation peut être induite par les facteurs de croissance après l'encensement sur une matrice tridimensionnelle¹³⁸. Les étapes restent nombreuses avant d'obtenir un substitut cartilagineux utilisable en clinique¹³⁴. Les optimisations portent sur l'utilisation de facteurs de croissance comme le TGF- β (= Transforming Growth Factor) et les BMP (Bone Morphogenic Protein), ainsi que sur la culture en hypoxie pour mimer au mieux l'environnement *in vivo*.

Plusieurs études montrent l'importance d'utiliser un échafaudage avec une élasticité contrôlable et mesurable^{141,142}. Les propriétés mécaniques des échafaudages pour diriger la différenciation des cellules souches mésenchymateuses doivent être intégrées dans la conception et le développement des stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage¹⁴³. Cependant, peu d'études font le lien entre les propriétés mécaniques des échafaudages, l'intégration de cellules souches mésenchymateuses, l'apport de facteurs de croissance et le devenir phénotypiques des cellules.

III.2.3 La bioimpression de cartilage

Le cartilage est un tissu qui n'est pas vascularisé et qui comporte un seul type cellulaire, cela en a fait un choix judicieux dans les applications de bioimpression 3D en ne nécessitant pas de co-culture ou de mise en forme complexe.

Kesti *et al.*¹⁴⁴ ont développé une nouvelle formulation de bio-encre composée de Gellan (3% m/v), d'alginate (2% m/v) et de matrice extracellulaire de cartilage décellularisée (40% m/m). Ils ont ajouté à ce mélange de biomatériaux des chondrocytes bovins à une concentration de $6 \cdot 10^6$ cellules/mL. Ils utilisent une technologie de bioextrusion en se servant d'un matériau support (Pluronic F127) pour l'impression de surplomb car la viscosité de leur bio-encre ne leur permet pas l'impression directe de surplomb. La viabilité des cellules après impression est de 80% (suivi de viabilité cellulaire avec un kit live/dead) et de 100% après 7 jours de maturation en conditions statiques. L'étude *in vitro* s'est poursuivie pendant 8 semaines avec l'observation de dépôt de protéines spécifiques de la matrice du cartilage telles que le collagène de type II et des glycosaminoglycanes.

L'une des premières études sur la bioimpression de cartilage a été réalisée par jet d'encre couplé à un mécanisme de photopolymérisation UV entre chaque couche²³. La bio-encre contient du poly(éthylène glycol) diméthylacrylate (PEGDA) qui se photopolymérise grâce à un photoinitiateur (Irgacure 2959) sous l'action d'un rayonnement UV, et des chondrocytes à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL. L'objectif est d'imprimer cette bio-encre à l'intérieur d'un explant de condyle fémoral bovin (Figure 26) et d'observer son intégration à la matrice naturelle.

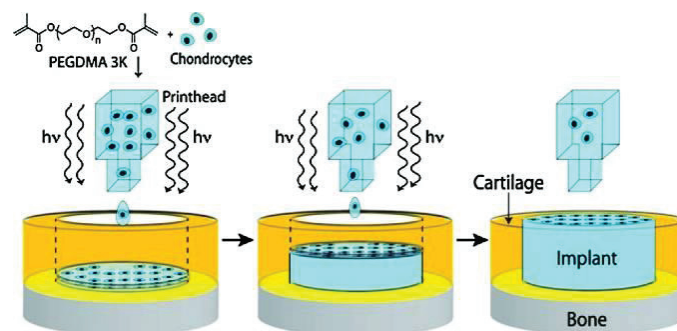


Figure 26. Représentation schématique de la bioimpression 3D de cartilage par un procédé de jet d'encre et de photopolymérisation²³.

Les résultats montrent une stabilité mécanique suffisante jusqu'à 400 kPa (module de compression), et un maintien de la viabilité des chondrocytes pendant 6 semaines. De plus, les caractérisations histologiques indiquent la présence de collagène II et d'agrécan témoin du maintien du phénotype chondrogénique. La production de matrice extracellulaire est plus

importante à l'interface entre l'hydrogel et le tissu du cartilage hôte, ce qui indique une bonne intégration.

D'autres auteurs ont utilisé de la « nanofibrillated cellulose »¹⁴⁵ (= NFC) qui est un composé hydrophile et biocompatible obtenu par hydrolyse enzymatique combinée à une homogénéisation à haute pression de cellulose¹⁴⁶. Les auteurs ont fait varier la formulation de l'encre en jouant sur la proportion de NFC et d'alginate (permettant la gélification de l'encre en présence de CaCl₂ à une concentration de 90 mM). Ils ont utilisé la bioextrusion et quatre bio-encres ont été formulées et étudiées pour trouver les proportions les plus appropriées de NFC/alginate en se basant sur les propriétés rhéologiques, la fidélité de la forme 3D et la stabilité dans le temps de leurs constructions tissulaires. Certaines de leurs impressions, telles qu'un modèle d'oreille humaine, suggèrent qu'ils sont capables d'imprimer des formes complexes (Figure 26-B). Cette publication présente la preuve de concept d'impression de chondrocytes dans un hydrogel. Les cellules restent vivantes pendant les 7 jours de l'expérimentation (Figure 27-A).

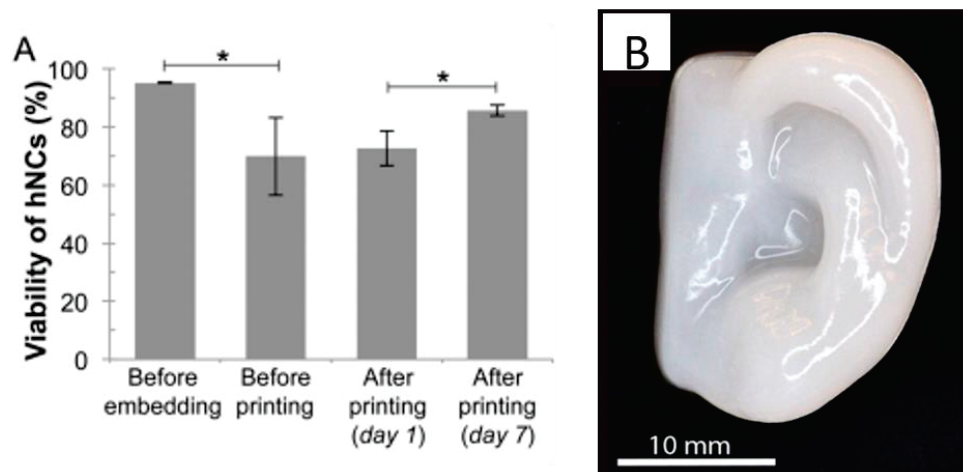


Figure 27. A) Pourcentage de viabilité des chondrocytes avant et après bioimpression 3D (jusqu'à 7 jours). B) Exemple d'une bioimpression d'un modèle réduit d'oreille humaine¹⁴⁵.

En utilisant la bio-encre développée dans le paragraphe précédent (NFC/alginate), une seconde étude démontre qu'elle est adaptée à la bioimpression par bioextrusion de cellules souches reprogrammées (iPS) pour le développement d'un substitut cartilagineux¹⁴⁷. La composition de la bio-encre est de 60% m/v de NFC et de 40% m/v d'alginate. Les cellules iPS

ont été différenciées après l'étape de bioimpression, par un cocktail de facteurs de croissance. Après 5 semaines de culture, ils ont constatés une expression du collagène de type II et l'absence d'expression de Oct4 (signifiant le caractère non-tumorigène des cellules). Ils en concluent que l'utilisation de cette bio-encre est appropriée à la production de substituts cartilagineux.

Dutchi *et al.*⁶⁴ ont publié une étude sur la bioimpression coaxiale de cartilage *in situ*. Pour cela, ils ont utilisé la technique d'extrusion coaxiale de deux bio-encres photopolymérisables aux UV. Les deux bio-encres utilisées conjointement forment une structure cœur-coquille avec un extérieur photoréticulable acellulaire (Gélatine méthacrylate 10% m/v /acide hyaluronique 2% m/v /photoinitiateur 0,1% m/v) et un noyau composé de cellules souches adipeuses (ADSC) en suspension dans un mélange gélatine méthacrylate/acide hyaluronique. L'action des UV après l'impression permet de polymériser l'enveloppe extérieure sous l'action du photoinitiateur.

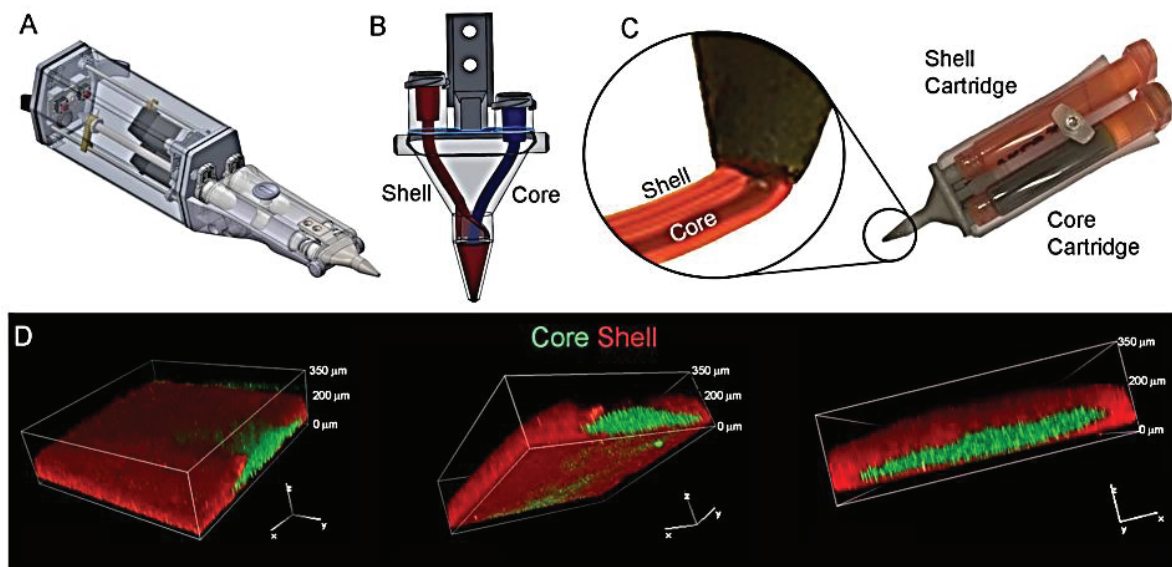


Figure 28. A) Représentation schématique de l'imprimante 3D coaxiale. B) Représentation schématique de la buse coaxiale. C) Photographie d'une cartouche avec un agrandissement de la buse lors du dépôt coaxial. D) Représentation d'images confocales de l'échantillon imprimé, en rouge la bio-encre (coquille) acellulaire et en vert la bio-encre interne chargée de cellules⁶⁴.

La preuve de concept concerne principalement la viabilité, de plus de 90%, des cellules 7 jours après l'impression. Les cellules adipocytaires ont été cultivées pendant 8 semaines *in vitro* en présence de facteurs de croissance chondrogéniques. Une caractérisation complète comprenant l'analyse de l'expression des gènes et des protéines, l'immunohistologie, la

microscopie confocale, la microscopie à force atomique et la compression mécanique non confinée ont démontré que leur stratégie de biofabrication *in situ* représente une innovation avec des implications importantes pour la personnalisation de la réparation du cartilage chez les patients présentant des lésions cartilagineuses et une arthrose.

Joydip Kundu *et al.*¹⁴⁸ ont mené une étude sur l'utilisation d'un échafaudage rigide de PCL (PolyCaproLactone) imprimé en 3D par extrusion pneumatique (système de dépôt multi-tête) couplé à la bioimpression 3D d'alginate (4 % m/v) cellularisé par des chondrocytes à une concentration de 1.10^6 cellules/mL et supplémenté avec du TGF- β . Les tissus ainsi obtenus et maturés pendant 24 heures dans du DMEM, ont été implanté chez une souris nude pendant 4 semaines.

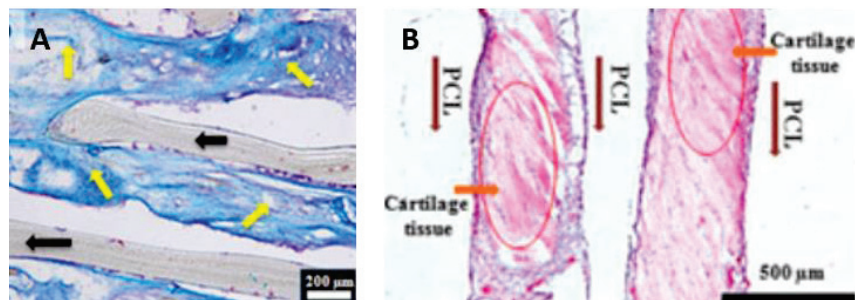


Figure 29. Caractérisation histologique A) des glycosaminoglycanes sulfatés par le bleu alcian, les flèches jaunes correspondent à l'accumulation des GAG, et les flèches noires correspondent à la structure de l'échafaudage. Barre d'échelle : 200 μ m. B) Par Hématoxyline–Eosine montrant un tissu conjonctif dense avec la présence de fibre de collagène (rose vif) et de chondrocytes¹⁴⁸.

Quatre semaines après l'implantation, les échafaudages PCL/alginate/cellules (chondrocytes + TGF- β 1) présentait une teneur élevée en matrice extracellulaire et en glycosaminoglycanes dans le cartilage néofabriqué, sans réponse indésirable (inflammation par exemple) des tissus. En conclusion, il a été présenté un échafaudage hybride supportant la régénération du cartilage et bioimprimé par extrusion.

Les techniques de bioimpression du cartilage ouvrent des perspectives dans la génération d'implants cartilagineux. Plusieurs points importants à résumer :

- L'utilisation de chondrocytes, de cellules souches mésenchymateuses et de cellules souches reprogrammées ont montré que ces sources cellulaires étaient adaptées à l'obtention de substituts cartilagineux. La quantification des protéines sécrétées doit être systématique afin de déterminer la qualité de la matrice extracellulaire sécrétée pour exclure la présence de collagène I par exemple qui indique la présence d'un cartilage fibreux non fonctionnel.
- Les biomatériaux de grade médical, donc utilisables en clinique, comme l'alginate, ne présentent pas des caractéristiques mécaniques du même ordre de grandeur que le cartilage natif. Les biomatériaux photopolymérisables, qui ont des propriétés mécaniques suffisantes, ne sont pas disponibles au grade clinique. C'est un point important d'amélioration pour envisager de propulser ces technologies de bioimpression en médecine régénérative.

III.3 Le tissu vasculaire

Le rôle principal de la vascularisation est bien entendu le transport des nutriments, des gaz ainsi que l'élimination de déchets sécrétés par les cellules. L'organisation anatomique de cet endothélium dépend principalement du diamètre du vaisseau correspondant. Le profil d'expression et le rôle des cellules endothéliales varient en fonction de leur localisation dans le corps.

III.3.1 Physiologie de l'endothélium vasculaire

III.3.1.1 Organisation générale

Les vaisseaux sanguins transportent le sang dans l'organisme. Leur organisation se distingue en fonction de leur localisation, de l'aorte à la sortie du ventricule gauche jusqu'à la veine cave dans l'atrium droit¹⁴⁹⁻¹⁵¹ :

- L'aorte, située à la sortie du ventricule gauche du cœur, est l'artère la plus grosse du corps avec 3 cm de diamètre, elle supporte des pressions sanguines de 100 mmHg en moyenne,
- Les artères transportant le sang oxygéné jusqu'aux tissus ont des diamètres très variables allant de 2 cm à une centaine de microns. Les pressions supportées par ces vaisseaux sont de l'ordre de 40 mmHg. Leur organisation comprend trois couches bien distinctes : l'intima, la plus interne composée d'une monocouche de cellules endothéliales, la media qui est la couche élastique composée de cellules musculaires lisses et d'un fort contingent de fibres élastiques, et pour finir, la plus externe, l'adventice qui est composée de fibroblastes et de fibres de collagène associées, apportant la résistance mécanique,
- Les artérioles apportant le sang à l'intérieur des organes en régulant sa distribution avec des diamètres de 25 μm en moyenne, l'adventice est ici très mince,
- Les capillaires qui permettent l'échange des nutriments et de l'oxygène dans les tissus. Leur diamètre est compris entre 3 et 20 μm et ils possèdent une lame basale et une monocouche de cellules endothéliales,
- Les veinules issues des capillaires sont chargées de collecter le sang dépourvu d'oxygène. L'endothélium y est toujours présent et il présente une mince couche

conjonctive. Leurs diamètres augmentent progressivement avec la mise en place d'une structure veineuse,

- Les veines, qui peuvent être classées suivant leur composition : essentiellement musculaire, ou fibreuse ou fibro-élastiques.

L'élément commun à toutes ces structures est l'endothélium vasculaire. Ses fonctions sont essentielles : maintenir l'hémostase et l'intégrité vasculaire, prévenir les thromboses, permettre et contrôler les échanges (nutriments et gaz)^{152,153}.

III.3.1.2 Les cellules endothéliales

De très nombreuses études sur l'angiogenèse et l'ingénierie vasculaire utilisent des cellules endothéliales provenant de la veine ombilicale (= HUVEC)¹⁵⁴. Ces cellules présentent de nombreux avantages. Elles sont disponibles en grande quantité, facilement isolables et amplifiables.

Les cellules endothéliales peuvent être extraites de différents tissus et donc présentent une grande variété de phénotypes^{155,156}. Ces variations phénotypiques peuvent influencer la perméabilité moléculaire à l'intérieur des vaisseaux par exemple. L'origine de la source cellulaire dans le but d'une reconstruction vasculaire n'est donc pas à négliger. Il existe par exemple, des cellules endothéliales extraites spécifiquement de la microcirculation du derme : Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, les HDMEC¹⁵⁷.

Malgré leurs provenances variables, les cellules endothéliales possèdent des caractéristiques communes. C'est grâce à des marqueurs spécifiques que l'on pourra les discriminer des autres types cellulaires au sein d'un tissu nouvellement formé par immunohistochimie. Les protéines identifiables spécifiques les plus utilisés sont :

- Le CD31 (= Cluster of Differentiation 31) qui est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des immunoglobulines. Le CD31 est exprimé à la surface des plaquettes, macrophages, neutrophiles et monocytes, mais aussi au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales. On lui attribue plusieurs rôles, tout d'abord, dans l'adhésion entre les cellules endothéliales adjacentes, mais aussi dans la régulation de l'angiogenèse et dans la régulation de l'inflammation¹⁵⁸.

- Le VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) qui est un récepteur de type tyrosine kinase, situé à la surface des cellules endothéliales. Il joue un rôle dans l'induction de la réponse proliférative des cellules endothéliales lors de sa stimulation médiée par son ligand : le VEGF¹⁵⁹.
- La VE-Cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin) est une protéine spécifique de l'endothélium vasculaire et se situe à la surface des cellules endothéliales. La VE-Cadhérine est exprimée de façon constitutive et participe à de nombreuses fonctions endothéliales telles que le maintien de l'intégrité vasculaire, l'angiogenèse, la migration et la survie cellulaire¹⁶⁰.
- Le vWF (Von Willebrand Factor) qui est une glycoprotéine intracellulaire synthétisée par les cellules endothéliales et stockée à l'intérieur de celles-ci dans les corps de Weibel Palade^{161,162}.

III.3.2 La reconstruction *in vitro* de vaisseaux par ingénierie tissulaire classique

Les prothèses vasculaires servant au remplacement des gros vaisseaux (aorte et artère) sont déjà utilisées en clinique. La problématique de l'ingénierie tissulaire vasculaire doit répondre à des remplacements de vaisseaux de petits diamètres (inférieurs à 6 mm). On retrouve trois principales approches pour la reconstruction de substituts vasculaires¹⁶³ :

- Les matrices décellularisées¹⁶⁴ qui sont la plupart du temps issues de petits vaisseaux des intestins. L'avantage principal est que l'architecture est déjà en trois dimensions avec la présence de molécules d'intérêt comme le collagène I et l'élastine. Il suffit alors de les re-ensemencer avec des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Plusieurs études ont démontrées une résistance mécanique suffisante pour un substitut vasculaire ainsi qu'une bonne colonisation des deux types cellulaires.
- Les feuillets cellulaires développés par l'Heureux *et al.*¹⁶⁵, ne nécessitent quant à eux pas d'échafaudage. La technique s'appuie sur la capacité des cellules à former des feuillets cellulaires qui peuvent être mis en forme autour de cylindres afin de donner un tissu cylindrique pouvant alors supporter des pressions allant jusqu'à 2000 mmHg (= 266 kPa). Elles ont déjà été utilisées en clinique chez une population de patients dialysés.

- Les échafaudages de biomatériaux synthétiques ou naturels qui ont été développés par Niklason *et al.*¹⁶⁶. Ils ont apporté une des premières preuves de concept dans la fabrication d'un substitut vasculaire implantable formulé à partir d'acide polyglycolique (PGA)ensemencé par des cellules musculaires lisses sur la face externe et par des cellules endothéliales sur la face interne. Après 8 semaines de culture, les substituts obtenus résistent à des pressions pouvant atteindre 2150 mmHg (= 286 kPa).

III.3.3 La bioimpression 3D de vaisseaux

La principale limite à l'utilisation de la bioimpression pour la fabrication d'un organe de taille cliniquement pertinente vient de la difficulté à intégrer à ce tissu une vascularisation fonctionnelle. La capacité de reconstruire, à l'intérieur même d'un tissu issu de l'ingénierie tissulaire, un réseau vasculaire hiérarchisé (diamètres variables) et perfusable, constitue un défi majeur pour les prochaines années. La bioimpression 3D, grâce à sa capacité à intégrer des structures multicellulaires complexes avec une précision pertinente, apporte une solution concrète et la possibilité de voir un jour la bioimpression de tissus vascularisés émerger.

III.3.3.1 Stratégies de vascularisation des tissus bioimprimés

Il y a deux problématiques bien distinctes dans la bioimpression 3D vasculaire. La première concerne la fabrication de structures vasculaires tubulaires pour répondre à la problématique de vaisseaux endommagés, que l'on nommera l'approche directe. Et deuxièmement, une approche destinée à la bioimpression 3D de tissus vascularisés avec l'intégration d'un système vasculaire à l'intérieur même d'un tissu fonctionnel, que l'on nommera l'approche indirecte.

III.3.3.1.1 Approche directe par extrusion basée sur un échafaudage

L'obtention de tubes, avec des géométries ramifiées, spécifiques et adaptables aux besoins d'un patient, est désormais possible grâce à l'apport de la bioimpression 3D.

Nakamura *et al.*¹⁶⁷ ont étudié la génération d'une structure tubulaire colonisée par des cellules Hela grâce à la technologie de jet d'encre. Leur bio-encre est composée d'alginate et de cellules Hela (à une concentration de 6 millions de cellules/mL), qui est éjecté dans un bain de calcium (10% m/v) et de polyvinylalcool (PVA), présent uniquement afin d'augmenter la viscosité. Ils obtiennent des tubes cellularisés d'un diamètre de 200 μm en moyenne.

Xu *et al.*¹⁶⁸ ont affiné cette technique pour arriver à la bioimpression de structures tubulaires supportant des surplombs. En sélectionnant de l'alginate à 1% m/v et des fibroblastes ($3 \cdot 10^6$ cellules/mL), ils ont bioimprimé à l'aide de la technologie de jet d'encre, un tube de 5 mm de hauteur avec un angle de surplomb de 63° (Figure 30).

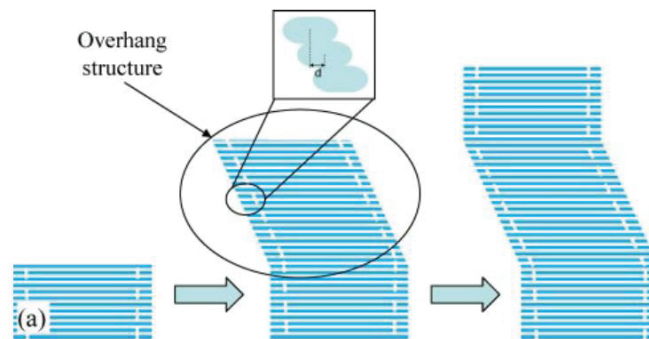


Figure 30. Etapes de la bioimpression 3D d'un tube vascularisé avec un surplomb¹⁶⁸.

Les résultats de viabilité cellulaire montrent une viabilité de 82%, 72 heures après l'impression ainsi qu'une conservation de la structure imprimée. L'obtention de surplomb bioimprimés permet d'aller plus loin dans la complexification des impressions et ainsi, ne plus être limité technologiquement dans l'optique d'une personnalisation patient-spécifique.

Une étude publiée par Tan et Yeong¹⁶⁹ démontre la fabrication de constructions tubulaires en alginate par bioextrusion. Ils ont imprimé successivement une couche d'alginate (de diamètre de 6 mm, à des concentrations variant entre 1 et 3% m/v) puis « une couche » de CaCl_2 qui joue le rôle d'agent réticulant. Les échafaudages faisaient en moyenne 15 mm de hauteur. L'avantage de cette méthode est la fabrication rapide de structure de grand diamètre rapidement. Cependant, cette méthode nécessite encore des optimisations pour compenser les pertes de précisions induites par l'étape de réticulation.

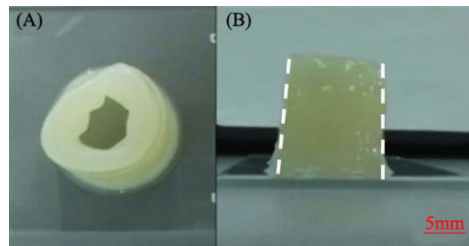


Figure 31. Construction tubulaire de 15 mm de hauteur dans l'axe vertical¹⁶⁹.

III.3.3.1.2 Approche indirecte par extrusion basée sur un échafaudage

L'essentiel dans la création d'un réseau vasculaire pour l'ingénierie tissulaire est qu'il puisse assurer une perfusion stable pendant la phase de maturation *in vitro* du tissu, puis qu'il continue d'assurer sa fonction sur le site d'implantation *in vivo*¹⁷⁰. Ces deux points sont les principaux verrous dans la génération de tissus de volumes et de complexité cliniquement pertinente. Afin de parvenir à outrepasser ces limites, plusieurs exigences doivent être prises en compte :

- Utiliser une technologie (ou plusieurs) permettant de produire des objets bioimprimés de taille physiologique,
- Permettre l'intégration de différents types cellulaires,
- Permettre la perfusion d'un réseau de vascularisation (dès la fin de l'impression) afin d'apporter les nutriments nécessaires jusqu'au centre du tissu (plusieurs centimètres),
- Contrôler la maturation de ce tissu *in vitro*.

Une première étude⁵² développée par Li *et al.* montre l'obtention, par bioimpression grâce à la technologie de bioextrusion, d'une structure contenant des tubes verticaux formulée avec deux combinaisons différentes d'hydrogels (Figure 32-A). L'enveloppe extérieure contient de la gélatine, de l'alginate, du chitosane et des hépatocytes. Les structures tubulaires sont formées de gélatine, d'alginate, de fibrinogène et de cellules souches adipocytaires (ADSC). La bio-encre est extrudée dans un environnement thermostaté à 6°C pour garder la gélatine en dessous de sa température de fusion et ainsi apporter à la structure la viscosité nécessaire supportant l'impression couche par couche (Figure 32-B). Puis la réticulation des autres biomatériaux se fait successivement grâce à la thrombine (pour le fibrinogène), le chlorure de calcium (pour l'alginate) et le glutaraldéhyde pour le chitosane.

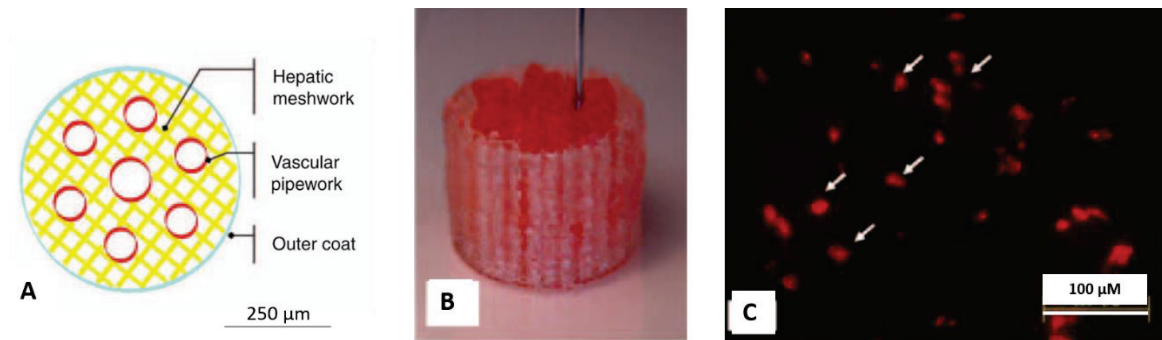


Figure 32. A) Représentation schématique de la structure avant la bioimpression. B) L'étape de bioimpression couche par couche par bioextrusion. C) Immunofluorescence révélant l'albumine sécrétée par les hépatocytes, barre d'échelle : 100 µm⁵².

Ces prémices de réseau vasculaire montrent le potentiel de cette technologie pour la mise en forme complexe de différents biomatériaux cellularisés. Les ADSC ont été induites *in situ* en cellules endothéliales grâce à un facteur de croissance l'EGF (epidermal growth factor)¹⁷¹. Les hépatocytes se multiplient, prolifèrent et assurent une des fonctions normales de sécrétion comme en témoigne le marquage par immunofluorescence de l'albumine (principale protéine sécrétée par les hépatocytes) (Figure 32-C).

Plutôt que d'imprimer des tubes vides, plusieurs études décrivent l'utilisation d'une encre dite fugitive. Sa fonction consiste à être imprimée dans le même temps d'impression que la bio-encre cellularisée, puis une fois l'étape de bioimpression terminée, cette encre fugitive peut être dissoute pour laisser place à des canaux pouvant accueillir des cellules endothéliales^{61,172,173}. Par exemple, Miller *et al.*¹⁷⁴ utilise un mélange de polysaccharides (glucose, sucrose et dextran) qu'ils portent à ébullition (165°C) afin d'obtenir une solution pouvant être chargée dans une seringue et imprimée à 110°C. Ensuite, une matrice cellularisée (essai avec différents biomatériaux : PEG, fibrine, alginate, agarose) va être coulée sur le réseau de polysaccharides. La dissolution de ce réseau par une perfusion de milieu de culture laissera alors un réseau creux (Figure 33-A).

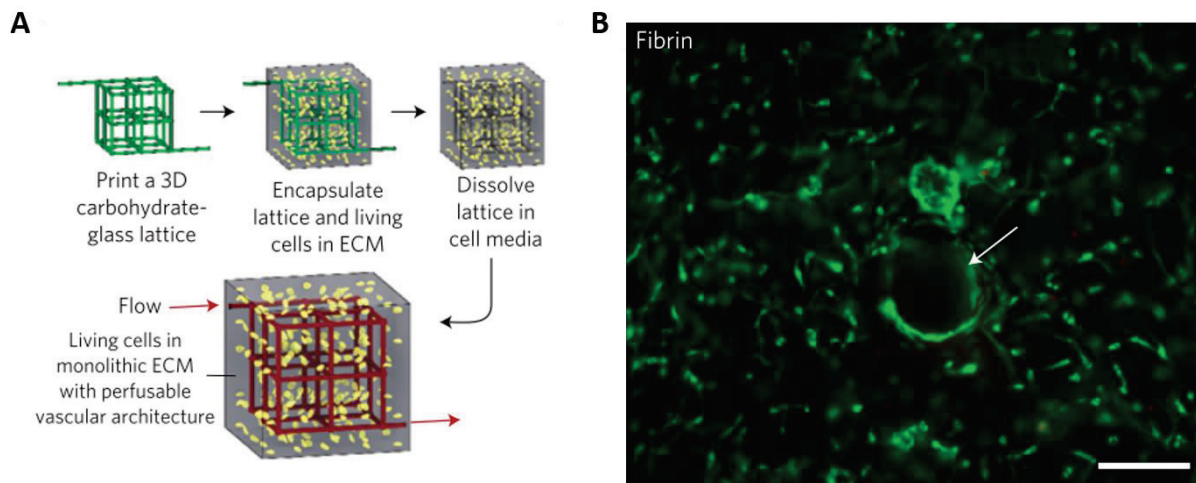


Figure 33. A) Représentation schématique du procédé permettant d'obtenir un réseau ouvert et interconnecté grâce à une encre sacrificielle. B) Observation en microscopie électronique d'une coupe transversale de la section d'un tube cellularisé par des HUVEC (marquée à la calcéine AM). Barre d'échelle : 200 μm ¹⁷⁴.

Cette encre fugitive peut aussi être formulée à base de polyoxamères dont le plus connu est l'acide Pluronic F127®. Ils possèdent des caractéristiques de liquéfaction à partir de 4°C et se retrouve sous la forme d'un hydrogel quand il est à température ambiante^{86,175}. De plus, il a été démontré qu'il était biocompatible¹⁷⁶. Son utilisation comme encre fugitive est simple puisqu'il suffit de le solubiliser à froid (4°C) puis de le charger dans une seringue pour son impression à température ambiante. Son élimination peut se faire après la phase d'impression par rinçage avec du PBS ou du DMEM à 4°C.

Kolesky et al^{61,177} ont développé une méthode de bioimpression par bioextrusion, en se servant d'une encre fugitive, une structure vascularisée de plus de 1 cm d'épaisseur qu'ils ont gardé en culture pendant plus de 6 semaines. Pour cela, trois encres imprimables ont dû être formulées. La première est l'encre en silicone utilisée pour imprimer le bioréacteur perfusable. La deuxième est l'encre fugitive active composée d'acide pluronique (Pluronic F127®) et de thrombine. Et la troisième est la bio-encre composée de gélatine, et de fibrinogène chargée de fibroblastes.

Ici, l'encre fugitive a deux rôles, le premier de permettre la formation de canaux mesurant 45 μm de diamètre après sa dissolution mais aussi, et grâce à la thrombine, de polymériser la

bio-encre à son contact (auto-assemblage fibrinogène en fibrine). Cette polymérisation locale permet dès la fin de la dissolution la possibilité de perfuser directement le bioréacteur.

Toutes les différentes étapes décrites sur la Figure 34, montrent comment ils ont obtenu un tissu qu'ils ont pu perfuser avec des HUVEC dès la fin de l'étape d'impression afin d'apporter rapidement une vascularisation fonctionnelle à l'ensemble du tissu.

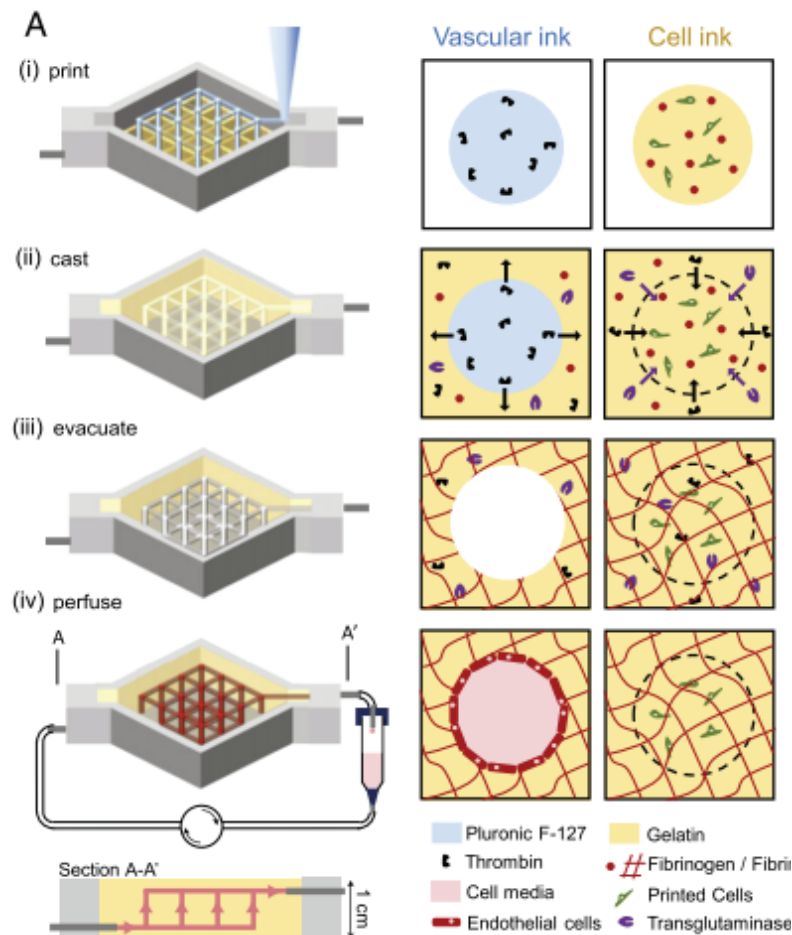


Figure 34. Représentation schématique du procédé de fabrication des tissus. i) Impression de l'encre fugitive dite vasculaire (en bleue) qui contient de l'acide pluronique et de la thrombine, suivit de la bioimpression de la bio-encre (gélatine et fibrinogène) chargée de cellules, à l'intérieur d'une puce à perfusion. iii) Lors du refroidissement l'encre fugitive qui se liquéfie est évacuée laissant un réseau de tubes vides. iv) Ce réseau peut être perfusé et endothélialisés par des HUVEC⁶¹.

Dans cette même publication, l'équipe de Jenifer A. Lewis a fait un progrès significatif dans l'obtention de tissus vascularisés en réussissant la bioimpression, toujours par bioextrusion, de multimatériaux permettant la création de tissus vascularisés de plus de 1 cm d'épaisseur⁶¹. Ces tissus sont remplis de matrice extracellulaire, d'un système vasculaire intégré et de plusieurs types cellulaires différents. L'étude va encore plus loin en démontrant la perfusion active de ces constructions pendant plus de 6 semaines afin de favoriser la

différenciation de cellules souches mésenchymateuses vers une lignée ostéogénique *in situ*⁶¹. Dans cette même publication, il a été également montré la formation d'un vaisseau de plusieurs centaines de microns de diamètre et de quelques millimètres de longueur à l'intérieur même d'un tissu composé de fibroblastes.

Pour conclure, ces deux approches (directe et indirecte) ne répondent pas aux mêmes attentes et ne nécessitent pas les mêmes développements:

- Pour l'approche directe, le but est d'obtenir des vaisseaux de petits diamètres (inférieur à 6 mm) qui pour l'instant ne possèdent pas d'équivalent en clinique contrairement à des vaisseaux de gros diamètres qui peuvent être remplacés (substituts textile avasculaires en Dacron par exemple). Les résultats se concentrent sur le développement de bio-encres pouvant supporter l'empilement des couches sur plusieurs centimètres et inclure de potentielles bifurcations, sans déformation. Ces spécificités sont dictées par un objectif d'implantation clinique patient-spécifique.
- L'approche indirecte est concernée par l'intégration multicellulaire dans un même tissu, avec l'apport d'une vascularisation fonctionnelle. Cette approche complexe doit répondre à de multiples problématiques comme par exemple des temps de maturation différents en fonction des types cellulaires utilisés mais aussi l'adaptation de milieux de culture répondant aux exigences de tous les types cellulaires présents.

III.4 Autres tissus bioimprimés hautement spécifiques

III.4.1 Le tissu cardiaque

Dans l'un des premiers travaux utilisant des cellules cardiaques, Gaetani *et al.*¹⁷⁸ ont démontré que la bioimpression 3D par bioextrusion peut être utilisée pour imprimer des cellules progénitrices cardiaques humaines, dans une suspension d'alginate, tout en préservant leur viabilité à 89% après 7 jours de culture. Ils ont aussi démontré que le procédé de bioimpression n'affecte pas l'engagement en lignée cardiaque des cellules.

Les travaux les plus récents concernent la bioimpression de patchs cardiaques⁸⁵. Par exemple, un patch composé de cellules progénitrices cardiaques humaines (hCMPC) à une concentration de $30 \cdot 10^6$ cellules/mL de bio-encre (mélange de gélatine et d'acide hyaluronique : HyStem matrix). Après la bioimpression grâce à la machine BioScaffolder (Sys + Eng, Gladbeck, Allemagne), les constructions sont réticulées grâce à un agent contenant un thiol réactif (pour la création de ponts dissulfures), puis mises en culture pendant 7 jours avant transplantation *in vivo* chez une souris durant 4 semaines.

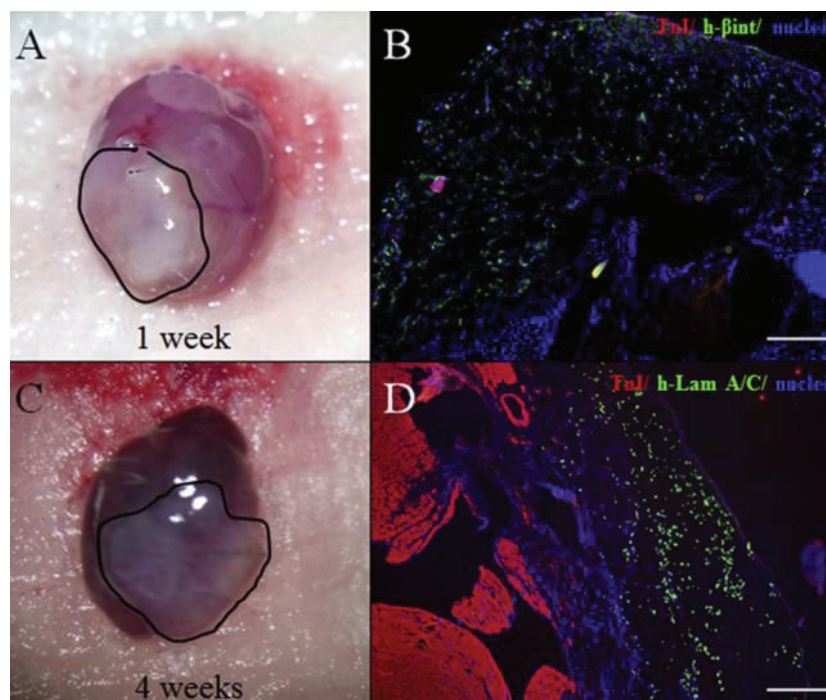


Figure 35. Greffe d'un patch bioimprimé contenant des cellules cardiaques. Ces patchs sont visibles chez toutes les souris traitées sur la paroi ventriculaire après 1 semaine (A) et 4 semaines (C). B) La présence de cellules humaines (transplantées) a été confirmée par une analyse par immunofluorescence de la b-intégrine spécifique à l'homme. D) Immunofluorescence révélant la présence de la lamin A/C en présence des hCMPC dans tout le patch⁸⁵.

Leurs résultats montrent que les hCMPC conservent leur phénotype cardiogénique, pendant plus d'un mois et sont capables de se différencier. La fixation du patch sur un cœur de souris a montré la préservation de la fonction cardiaque en réduisant le remodelage cicatriciel du ventricule gauche et en améliorant la viabilité du myocarde.

D'autres recherches se penchent plus précisément sur la bioimpression de la valve aortique¹⁷⁹. Celle-ci présente une anatomie et une hétérogénéité complexe en trois dimensions, pour une fonction essentiellement biomécanique. Plusieurs études montrent la bioimpression de valves cardiaque par bioimpression et certaines études utilisent une bio-encre photopolymérisable déposée par bioextrusion composée de polyéthylène glycol diacrylate (PEG-DA) mélangé à l'alginate, additionné d'un photoinitiateur (Irgacure 2959). Hockaday *et al.* ont utilisé cette bio-encre qu'ils ont, au fur et à mesure de la construction, polymérisé à l'aide d'une lampe UV (365 nm) pour obtenir un hydrogel pouvant atteindre un module de Young de 75 kPa. Les cellules de valve interstitielle ont étéensemencées après la bioimpression et les constructions ont été maintenues en culture pendant 21 jours.

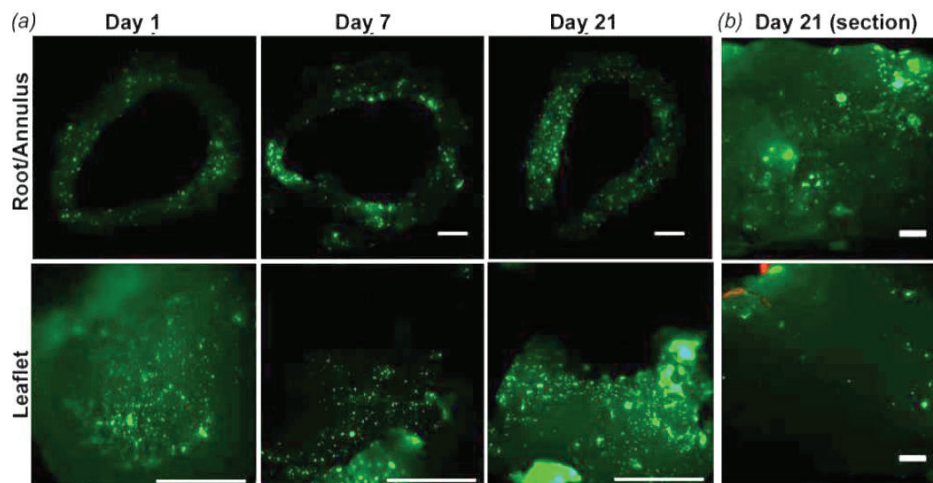


Figure 36. Test de viabilité des cellules de la valve interstitielle, cultivées sur les constructions de valves imprimées en 3D. A) Les cellules vivantes sont visibles à la fois à la surface et en haut de la valve et dans les folioles après 1, 7 et 21 jours de maturation. Barre d'échelle : 2mm. B) Des cellules ont également été détectés dans l'interstice des folioles. Barre d'échelle : 100 μm ¹⁷⁹.

Ces échafaudagesensemencés de cellules ont permis la conservation de la viabilité cellulaire proche de 100% pendant 21 jours. Ces résultats montrent que les constructions en hydrogel par photopolymérisation permettent la bioimpression de valves aortiques très proches morphologiquement de l'anatomie physiologique.

III.4.2 Le tissu rénal

Des modèles tridimensionnels de tissus rénaux qui reproduisent les réponses physiologiques sont nécessaires pour le criblage de médicaments, la modélisation de maladies et l'ingénierie de l'organe complet. L'équipe de Jenifer Lewis a réussi à bioimprimer des tubules proximaux rénaux entièrement intégrés dans une matrice extracellulaire et logés dans des puces perfusables leur permettant un maintien en culture pendant 2 mois¹⁸⁰. Il y a quatre étapes pour arriver à la fabrication d'un tube proximal 3D sur une puce (Figure 37) :

- Impression de l'encre fugitive (pluronic F127 et thrombine 100 U/mL) sur une matrice composée de gélatine 7,5% m/v, fibrinogène 10 mg/mL, CaCl₂ 2,5 mM et transglutaminase à 0,2% m/v,
- Coulage de cette même matrice autour du canal nouvellement formé,
- Evacuation de l'encre fugitive par rinçage à 4°C afin de créer un tube ouvert,
- Perfusion de cellules rénales dans ce tube.

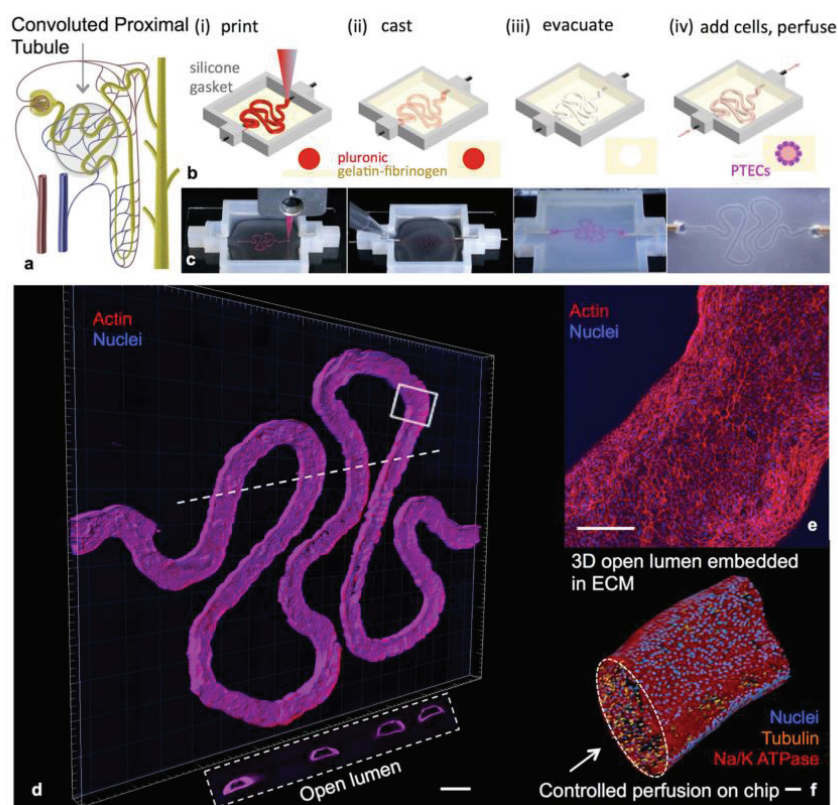


Figure 37. Tubule proximal 3D sur puce. A) Représentation schématique du néphron mettant en évidence le tubule. B et C) Représentation schématique des étapes dans la fabrication du tubule perfusable. D) Visualisation 3D du tubule proximal imprimé par microscopie confocale avec l'actine colorée en rouge et les noyaux en bleu¹⁸⁰.

Contrairement aux dispositifs de reins sur puce basés sur des monocouches de cellules, les tubules de reins proximaux bioimprimés en 3D et perfusables, permettent la collecte de 10000 cellules pour un échantillonnage précis en cytométrie de flux et ainsi l'obtention de réponses quantifiables. Ces tubules proximaux favorisent la formation d'un épithélium analogue au tissu *in vivo* avec des propriétés phénotypiques et fonctionnelles améliorées par rapport aux mêmes cellules cultivées en 2D. En effet, les auteurs observent une polarisation de l'épithélium nouvellement formé qui est une condition essentielle pour le transport et la filtration de molécules, avec la présence de microvillosités du côté apical (face à la lumière ouverte du canal) et des cellules en forme de colonne, similaires à celles que l'on retrouve *in vivo*. En ce qui concerne la fonctionnalité, les auteurs constatent une augmentation de l'absorption de l'albumine et de la mégaline, témoin de l'organisation fonctionnelle de ce tubule. De plus, ce modèle permet l'étude des mécanismes d'endommagement des tubules induit par certains médicaments en regardant de plus près les jonctions cellulaires et la mortalité des cellules. Cette méthode de bioimpression ouvre de nouvelles voies pour la création d'organe sur puce avec des cellules d'intérêts dans un microenvironnement physiologique.

IV. Méthodes de culture pour la maturation des tissus : du statique au dynamique

IV.1 Culture statique

C'est en s'inspirant de la culture classique de cellules en 2D que les premiers éléments d'ingénierie tissulaire ont été cultivés de manière passive par simple diffusion de nutriments et de gaz¹⁸¹. Cependant, la diffusivité des nutriments et des gaz, jusqu'au centre d'un hydrogel est un paramètre limitant à surveiller attentivement. Il est pourtant difficile de conclure sur une distance limite précise car cela dépendra de la composition du gel et des besoins du type cellulaire présent. Il a été montré que l'oxygène diffuse sur des distances allant jusqu'à 500 μm , et il est communément admis que la diffusion des gaz et des nutriments à l'intérieur de tissus ne dépasse pas cette limite de 500 μm ^{182,183}. La conséquence de cette limitation peut être illustrée par une des premières études sur la formation de sphéroïdes de cellules cancéreuses de colons qui montre qu'au-delà d'un diamètre de 1 mm, les sphéroïdes contiennent une zone centrale nécrotique et hypoxique¹⁸⁴.

Cette contrainte de taille peut être outrepassée en utilisant un des paramètres de la bioimpression 3D : le remplissage. En effet, lors d'une construction tissulaire, au moment du choix des paramètres (GCode), il peut être défini un remplissage inférieur à 100% et ainsi espacer les joncs déposés dans les axes X et Y créant ainsi des espaces permettant au milieu de culture de s'infiltrer en ne dépassant jamais cette limite de 500 μm . En modulant l'architecture interne des tissus bioimprimés cela permet d'obtenir des structures de taille globale supérieure à 500 μm d'épaisseur (Figure 38).

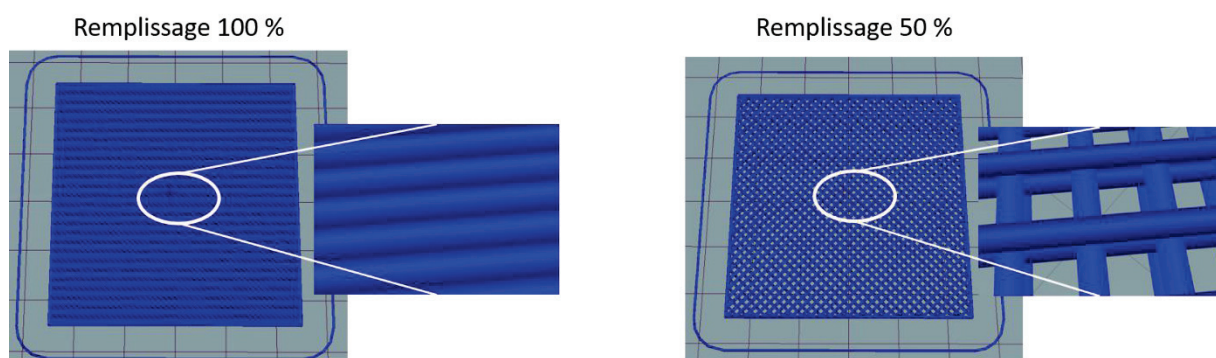


Figure 38. Schéma représentatif d'un cube de dimensions 5 x 5 x 0,5 cm avec deux remplissages différents l'un à 100 % (à gauche) et l'autre à 50 % (à droite).

IV.2 Les bioréacteurs pour l'ingénierie tissulaire

Dans ce paragraphe ne seront abordés que les bioréacteurs dédiés à la culture de tissus. Ils peuvent dès lors se diviser en plusieurs catégories. Tout d'abord, ceux qui permettent une distribution homogène des cellules sur un échafaudage¹⁸⁵, puis ceux qui apportent les gaz, et les nutriments de manière homogène jusqu'à l'intérieur des tissus en formation, grâce à des transports de masse efficaces, et pour finir ceux qui exposent les constructions tissulaires à des forces mécaniques¹⁸⁶.

De manière générale, un bioréacteur comprend (Figure 39):

- Une cuve dans laquelle se trouve le tissu cultivé,
- Un système d'agitation,
- Des capteurs et des régulateurs de température,
- Une sonde de pH couplée à un injecteur de NaOH/CO₂ pour l'équilibre du pH,
- Une sonde oxymétrique pour le contrôle de l'oxygène dissout,

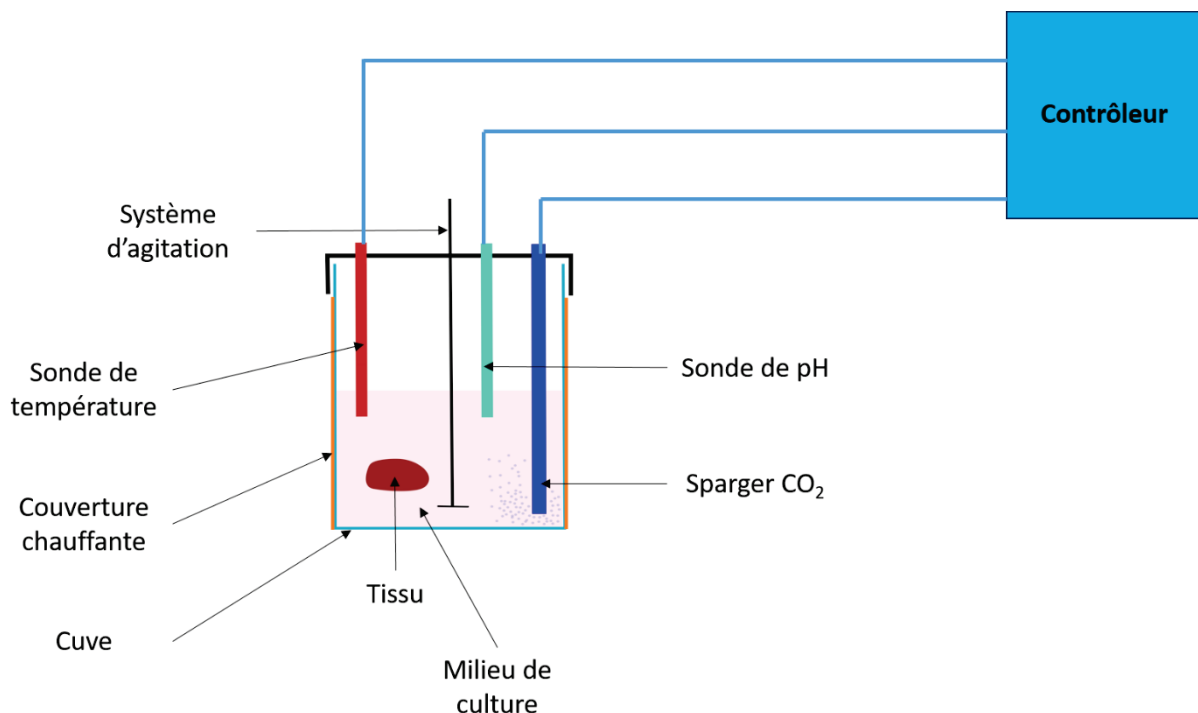


Figure 39. Représentation schématique générale d'un bioréacteur avec un système d'agitation, une régulation de la température, un contrôle du pH, pour la culture d'un tissu.

IV.2.1 Systèmes de bioréacteurs avec une contrainte de flux

Cette catégorie de bioréacteur est utilisée dans le but de mélanger efficacement le milieu de culture autour des constructions tissulaires en atténuant les problèmes liés à la fourniture des nutriments et à l'élimination des déchets grâce à une circulation constante et homogène du milieu de culture¹⁸⁷. Le transport des nutriments et des gaz peut se faire par convection en assurant une distribution plus uniforme des facteurs de croissance par exemple, par rapport à une culture statique. Dans ce dernier cas, les phénomènes de diffusion prédominent et dans le cas de molécules de haute masse moléculaire en faibles concentrations comme les facteurs de croissance, ils seront peu susceptibles de se distribuer uniformément dans le tissu¹⁸⁸.

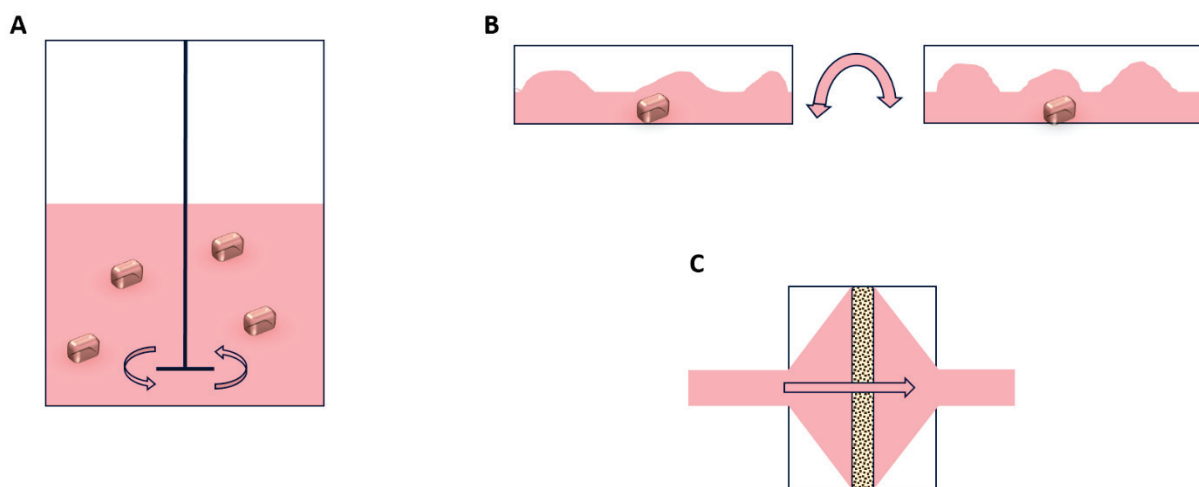


Figure 40. Mécanismes des bioréacteurs à contrainte de flux (la structure tissulaire est représentée en gris). A) Le "spinner flask". B) La plateforme oscillante. C) Le système de perfusion.

Il existe trois types de bioréacteurs à contrainte de flux présentés sur la Figure 40 :

- Le « spinner flask » (Figure 40-A) qui consiste à apporter une agitation mécanique dans la cuve où se trouvent les tissus. Le but est d'accroître la prolifération cellulaire et la production de matrice extracellulaire. Plusieurs résultats mettent en évidence son utilisation pour l'expansion de population de cellules souches, mais aussi pour l'ingénierie du cartilage¹⁸⁹, des os¹⁹⁰ et de tissus cardiaques¹⁹¹.
- La plateforme oscillante, ou bioréacteur à vague, (Figure 40-B) qui provoque une agitation de gauche à droite et va mélanger le milieu de culture. Son utilisation est cependant limitée à certaines étapes lors de la création de tissu comme par exemple pour induire une agrégation cellulaire de cellules cardiaques¹⁹².

- Les systèmes de perfusion par un flux de milieu de culture (Figure 40-C) contenant ou non des cellules à ensemercer. Ils sont fréquemment utilisés dans le domaine vasculaire pour recréer des tubes vascularisés^{61,95,193}, ou étudier l'angiogenèse. Un flux pulsatile peut être utilisé afin d'exercer des forces de cisaillement sur les cellules endothéliales, améliorant ainsi l'organisation structurale et la résistance mécanique de la paroi¹⁶⁶. Ils ont aussi été utilisés dans le domaine osseux en améliorant de manière homogène les transports de nutriments et de gaz dans les constructions tridimensionnelles¹⁹⁴.

IV.2.2 Systèmes de bioréacteurs pour une stimulation physique

Les bioréacteurs peuvent être utilisés pour générer des contraintes mécaniques à l'intérieur d'un tissu afin de provoquer une organisation spécifiques des cellules, d'organiser la matrice extracellulaire et d'obtenir une réponse globale du tissu. Cela permet de parvenir à une maturation dynamique. Les stimulations physiques peuvent être de plusieurs types :

- Les contraintes passives (Figure 41-A) provoquées par le contrôle de l'élasticité du support de culture cellulaire qui peut orienter la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Lorsque les cellules souches mésenchymateuses sontensemencées sur des hydrogels avec de faibles rigidités (0,1 à 1 kPa), elles expriment des niveaux élevés de facteurs de transcription neurogènes. Sur des gels possédant une rigidité intermédiaire (11kPa) ces cellules expriment préférentiellement des facteurs de transcription myogéniques. Et sur des gels très rigides (34 kPa) des niveaux élevés de facteurs de transcription ostéogéniques sont détectés.
- Les tractions dynamiques (Figure 41-B) provoquées par des cycles d'étirement et de relaxation. Ce type de bioréacteur peut être utilisé dans l'ingénierie du tissu musculaire^{35,195,196}. Par exemple, une équipe a créé des tissus musculaires en ensemençant les cellules des muscles squelettiques dans une matrice de collagène/Matrigel¹⁹⁷. Après une maturation passive *in vitro* de 16 jours, ces constructions cellularisées ont été attachées de part et d'autre à un système leur appliquant des cycles de traction et de relaxation pendant 8 jours. Les résultats montrent une augmentation du diamètre des fibres (myofibres) de 12% et une augmentation de la surface de 40% de ces fibres.

- La stimulation électrique (Figure 41-C) permet de faire passer un courant à travers le tissu cardiaque par exemple¹⁹⁸. Une étude a démontré l'efficacité de cette stimulation sur des tissus myocardiques¹⁹⁹ (des myocytes ont étéensemencés avec du Matrigel sur des éponges de collagène et cultivés sans simulation pendant 1, 3 ou 5 jours). Après 8 jours de simulation, les cellules ont montré un niveau de différenciation ultrastructurale comparable à celui du myocarde natif (cellules alignées, allongées et un noyau allongé positionné au centre de la cellule). De plus, cette stimulation induit une amélioration de l'alignement et du couplage cellulaire (contractions synchrones).
- La compression dynamique (Figure 41-D) utilisée principalement dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ce type de contrainte, très similaire à celle que subit le cartilage *in vivo*, favorise les transports de nutriments et de facteurs de croissance au sein même du tissu en augmentant leur disponibilité pour les cellules²⁰⁰. Plusieurs études montrent une augmentation de la sécrétion des glycosaminoglycanes et du collagène de type II, concomitante à l'obtention d'un module de Young plus élevé^{201,202}.

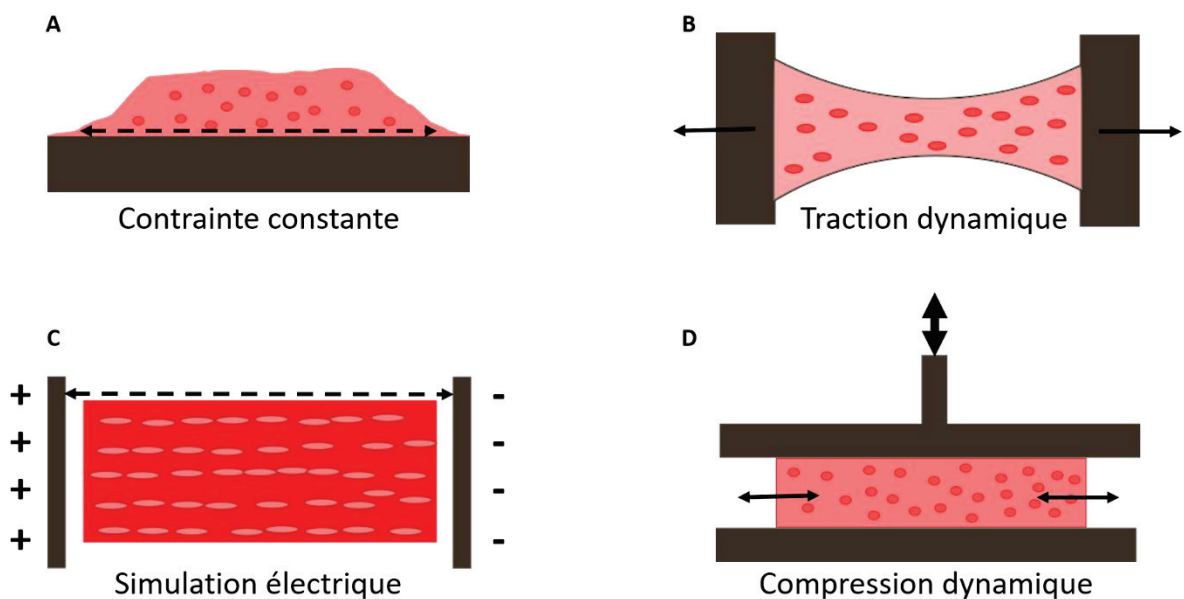


Figure 41. Bioréacteurs dynamiques en ingénierie tissulaire. A) Bioréacteur à contrainte constante. B) Bioréacteur à traction dynamique. C) Bioréacteur à simulation électrique. D) Bioréacteur à compression dynamique

Comme vu précédemment, il existe, dans le corps humain, un éventail de rigidité/élasticité de tissus (Figure 42) alors que les mises en forme par bioimpression sont limitées par les hydrogels utilisés qui ont eux, des élasticités sensiblement équivalentes²⁰³.



Figure 42. Modules d'Young des différents tissus non-osseux présents dans le corps humains, exprimés en kPa.

De nombreuses études montrent que l'utilisation de facteurs de croissance permet de générer une induction de la synthèse matricielle et ainsi induire la mise en place d'un microenvironnement favorable^{137,143}. Ils sont cependant insuffisants pour l'obtention d'une matrice extracellulaire avec des propriétés d'élasticité similaires à celles d'un tissu humain. Une des solutions permettant de lever ce verrou repose sur l'utilisation de stimulation physique par le biais de bioréacteurs dédiés décrits dans ce paragraphe.

V. Conclusions

Dans cette première partie, plusieurs thématiques ont été abordées en commençant par la présentation des différentes techniques de bioimpression 3D. Les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients qui, lorsqu'elles sont utilisées conjointement permettent la bioimpression 3D d'un grand nombre de structures et de compositions. Ces techniques nécessitent l'utilisation de biomatériaux déjà couramment utilisés en ingénierie tissulaire. Leurs modifications et leurs mises en forme 3D ont été appréhendées afin de comprendre les enjeux de leur utilisation dans une bio-encre. Ces techniques et ces biomatériaux ont ouvert un nouveau champ de recherche, la bioimpression 3D, qui permet désormais la fabrication de tissus en trois dimensions avec des perspectives de complexifications pour arriver à des tissus toujours plus proches du *in vivo*.

CHAPITRE 2 : PROTOCOLES

La méthodologie générale de ce projet de thèse a été exécutée dans le but de fabriquer *in vitro* des substituts tissulaires fonctionnels. Cette partie décrit l'ensemble des techniques et des méthodes utilisées lors de mes travaux de recherche. Tout d'abord, un tableau des réactifs décrit l'ensemble des produits utilisés lors des expérimentations. Ensuite, le protocole de préparation de la bio-encre, qui a largement évolué depuis les premiers essais, est décrit dans sa version finale d'utilisation avec un aperçu synthétique de la culture en 2D des cellules utilisées. Puis toute l'étape de bioimpression est décrite avec une précision importante : les objets bioimprimés au cours de cette thèse et présentés dans ce manuscrit sont de deux types : des cubes tests de taille 1x1x0,5 cm et des objets de grande taille de 2x2x2 cm. Sont abordés pour finir le suivi post-impression et les méthodes de caractérisation des tissus.

I. Tableau des réactifs

Tableau 2. Tableau des réactifs nécessaires en fonction des étapes de la bioimpression.

Etapes	Désignation produit	Fournisseur	Référence	Concentration initiale (m/v)	Solvant
Bio-encres	Gélatine	Sima-Aldrich	G1890-500G	20%	DMEM sans calcium
	Alginate	Alpha Aesar very low viscosity	A18565	4%	DMEM sans calcium
	Fibrinogène	Sima-Aldrich	F8630-10G	8%	DMEM sans calcium
Polymérisation	CaCl ₂	Sima-Aldrich	C5670-100G	3%	Eau stérile
	Thrombine	Sima-Aldrich	T4648-10KU	500 U/mL	Eau stérile
Culture 2D et maturation 3D	Acide ascorbique	Sima-Aldrich		50 mg/mL	DMEM
	DMEM, high glucose, Glutamax	Gibco	31966021	/	/
	DMEM, sans calcium	Gibco	21068-028	/	/
	EGM-2	PromoCell	C-22011	/	/
	Amphotéricine	Gibco	15290-026	/	/
	Pénicilline-Streptomycine	Gibco	15140122	/	/
	Sérum de Veau Foetal	Gibco	10270-106	/	/
	Trypsine (EC 3.4.21.4)	Gibco	15400054	/	/
	PBS	Gibco	14190185	/	/
	Collagénase (EC 3.4.24.3)	Roche	10103586001	/	/

II. Préparation de la bio-encre

La préparation de la bio-encre est un élément essentiel de la bioimpression de tissus. Seront présentés ici la préparation des solutions mères et brièvement les protocoles de culture des cellules en 2D.

II.1 Préparation des solutions mères

Les solutions mères ont été préparées systématiquement la veille de l'expérimentation, puis placées à l'incubateur, 37°C, 5% CO₂ et saturé en humidité, pour une solubilisation complète et homogène, dans des Falcon 50. Toutes les solutions ont été préparées dans du milieu de culture DMEM sans calcium (Thermofisher, 21068-028) :

- Gélatine à 20% m/v (Sigma-Aldrich, France, CAS No. 9000-70-8),
- Alginate à 4% m/v (Alpha Aesar, France, CAS No. 9005-38-3),
- Fibrinogène à 8% m/v (Sigma-Aldrich, France, CAS No. 9001-32-5).

Les solutions de gélatine et d'alginate nécessitent une forte agitation manuelle au moment de la préparation afin d'éviter la formation d'agrégats solides non dissous. A l'inverse, pour le fibrinogène, il suffit de tapoter légèrement le Falcon afin que le milieu de culture s'immisce partout.

II.2 Sources cellulaires utilisées et condition de culture 2D

II.2.1 NIH 3T3 eGFP

Les cellules ont été obtenues chez Cell Biolabs Inc, (San Diego, USA) et cultivées dans du DMEM (ThermoFisher Scientific, France, 11995065) supplémenté avec 10% v/v de SFV (Sérum de Veau Fœtal), 1% v/v de pénicilline-streptomycine et 0,5% v/v de fungizone. Les cellules ont été cultivées en flasque T75, le milieu changé tous les 2-3 jours, puis une fois à 80% de confluence, trypsinées (1200 rpm pendant 5 minutes) et comptées. Après centrifugation, elles ont été soit réensemencées, soit utilisées dans la bio-encre à la concentration souhaitée.

II.2.2 Fibroblastes

Ils proviennent d'échantillons de peau normale humaine issus de donneurs anonymes au Laboratoire de substituts cutanés de Lyon (Hôpital Edouard Herriot). Les résidus chirurgicaux ont été prélevés conformément à la réglementation française en vigueur (DC n° 2014-2281) et avec l'accord du consentement écrit du patient. Ils ont ensuite été dissociés et purifiés pour n'obtenir que des fibroblastes. Ces derniers ont pu être cultivés en flasque T75 dans du DMEM (ThermoFisher Scientific, France, 11995065) supplémenté avec 10% v/v de SFV (Sérum de Veau Fœtal), 1% v/v de pénicilline-streptomycine et 0,5% v/v de fungizone, le milieu était changé tous les 2-3 jours. Une fois à 80% de confluence, ils ont été trypsinés (1200 rpm pendant 5 minutes) et comptés. Après centrifugation, ils ont été soit réensemencés, soit utilisés dans la bio-encre à la concentration souhaitée. Les fibroblastes ont été utilisés entre les passages 4 et 13.

II.2.3 HDMEC

Les HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cell) nous ont été fournis par le CEA (Grenoble, France) et cultivés dans du DMEM (ThermoFisher Scientific, France, 11995065) supplémenté avec 10% v/v de SFV (Sérum de Veau Fœtal), 1% v/v de pénicilline-streptomycine et 0,5% v/v de fungizone. Les cellules ont été cultivées en flasque T75, le milieu changé tous les 2-3 jours, puis une fois à 80% de confluence trypsinées (1200 rpm pendant 5 minutes) et comptées. Après centrifugation, elles ont été soit réensemencées, soit utilisées dans la bio-encre à la concentration souhaitée.

II.2.4 HUVEC

Les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) ont été obtenus chez PromoCell GmbH (Heidelberg, Allemagne) et cultivées dans de l'EGM-2 (PromoCell, C-22011). Les cellules ont été cultivées en flasque T25, le milieu changé tous les 2-3 jours, puis une fois à 80% de confluence trypsinées (1200 rpm pendant 5 minutes) et comptées. Après centrifugation, elles ont été soit réensemencées, soit utilisées dans la bio-encre à la concentration souhaitée.

II.2.5 CSM

Les CSM (Cellule Souche Mésoenchymateuse) ont été isolées de la moelle osseuse humaine après une chirurgie de remplacement de la hanche, en collaboration avec le CHRU de Nancy. La moelle osseuse héparinisée a été diluée dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) puis centrifugée à 1600 tr/min pendant 5 min. Le culot dilué dans le milieu de culture a été ensemencé dans des boîtes de Pétri à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules/T75 et le milieu inchangé pendant les 3 premiers jours. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par changements séquentiels de milieu. Au cours de l'expansion en monocouche, les CSM ont été cultivées avec du milieu Eagle modifié de Dulbecco avec faible taux de glucose (DMEM-LG, 31885, Gibco) additionné de 10% v/v de SVF (FBS, Sigma), 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi), 2 mM de glutamine (Gibco) et de la pénicilline-streptomycine (Gibco). Le milieu a changé deux fois par semaine. Lorsque les cellules adhérentes ont atteint environ 80% de confluence, elles ont été trypsinées et étalées à une densité de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/T75. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Lors du dernier passage (P3) avant l'ensemencement dans la bio-encre, une étape de pré-différenciation chondrogénique a été réalisée. Des CSM ont été cultivées avec un milieu de différenciation composé de DMEM (4,5 g/mL de glucose) supplémenté avec du pyruvate de sodium (110 µg/mL, Gibco), du bFGF (1 mg / ml, Miltenyi), de la pénicilline-streptomycine et des suppléments chondrogéniques: proline (40 µg / ml, Sigma), acide L-ascorbique-2-phosphate (50 µg/mL, Sigma) et dexaméthasone (10^{-7} M, Sigma).

III. Impression

III.1 Préparation de la seringue

Une fois les solutions préparées et dissoutes de manière homogène, il suffit de les mélanger suivant les proportions suivantes, pour une seringue de 8 mL :

- 4 mL de gélatine,
- 2 mL d'alginate,
- 2 mL de fibrinogène + les cellules en culot.

Le mélange se fait dans cet ordre grâce à une pipette à liquide visqueux (P1000) dans un Falcon 50. Les cellules d'intérêt sont ajoutées, une fois trypsinées, à la bonne concentration et en culot, dans les 2 mL de fibrinogène, suivant la concentration souhaitée. Le mélange est

homogénéisé par des aspirations douces successives grâce à la pipette (pas plus d'une vingtaine pour ne pas induire de stress cellulaire). La bio-encre ainsi formulée a été coulée dans une seringue de 10 mL (Nordson EDF) préalablement autoclavée et fermée par un bouchon stérile d'un côté, et de l'autre (une fois la bio-encre dans le corps de la seringue) bouchée par un piston, stérile lui aussi. Ensuite, un bref dégazage a été réalisé par simple retournement de la seringue et débouchage avec une pression du piston pour éviter toutes bulles d'air lors de l'impression.

La seringue ainsi remplie subit un protocole d'homogénéisation de température afin d'atteindre la rhéologie souhaitée. Elle passe 20 minutes à 21°C puis 30 minutes à 28°C.

Il suffit alors d'enlever le bouchon et de connecter une buse d'impression tronconique ayant une ouverture de 400 μm . La seringue est alors chargée dans l'emplacement prévu à cet effet, dans la bioimprimante.

III.2 Utilisation du logiciel Repetier

L'imprimante Tobeca® est pilotée grâce à un logiciel nommé Repetier. Après avoir conçu, grâce à un logiciel de dessin 3D, le ou les objets à imprimer, il suffit de les charger sur Repetier. La procédure est ensuite divisée en quatre étapes :

1. La disposition sur le plateau d'impression

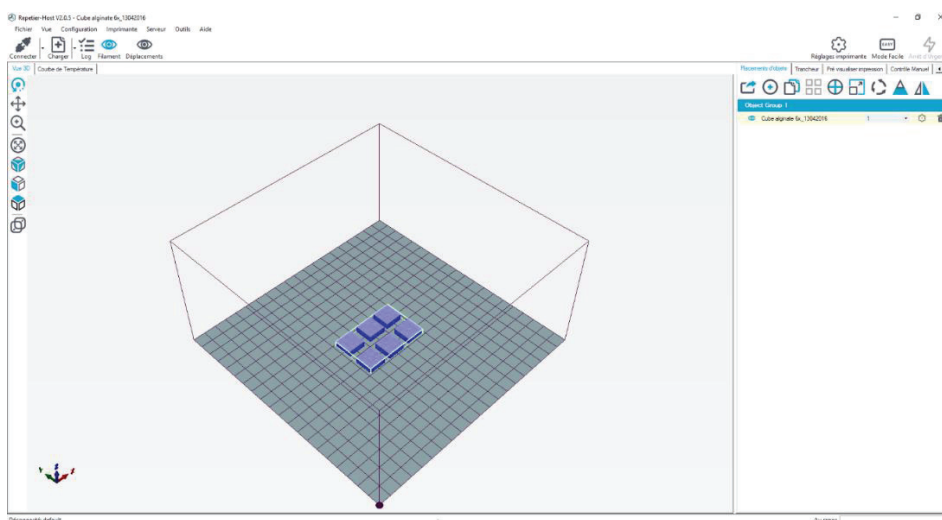


Figure 43. Les six cubes tests sont chargés sur le plateau d'impression.

2. Le choix des paramètres d'impression tels que la hauteur des couches, le type de remplissage, la vitesse d'impression, le diamètre du cône....

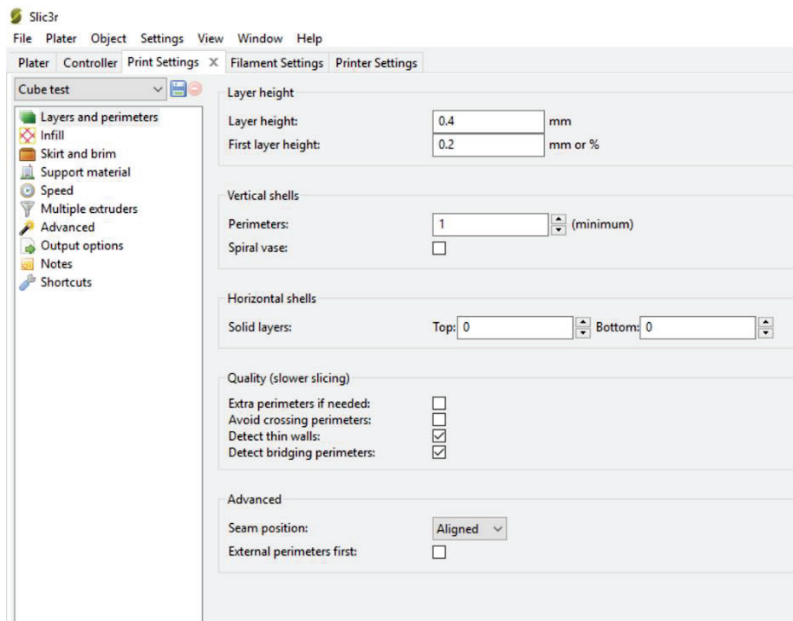
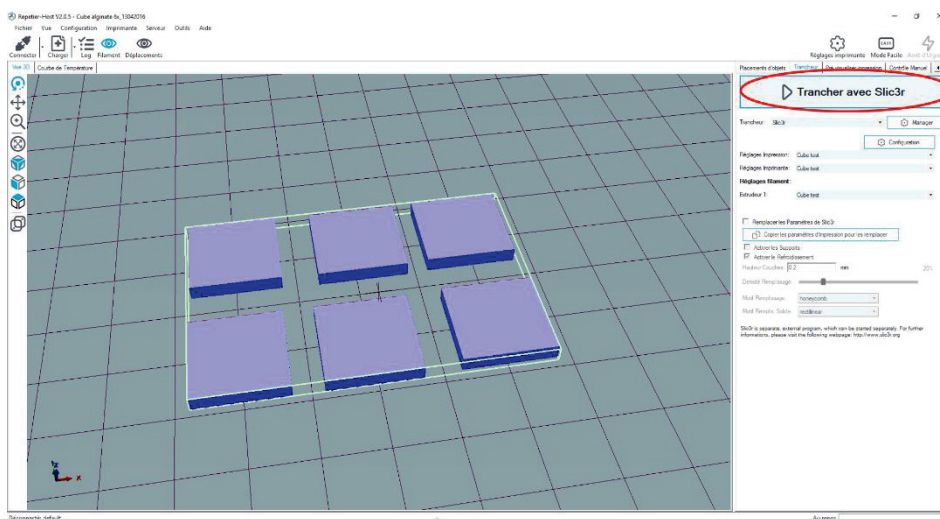
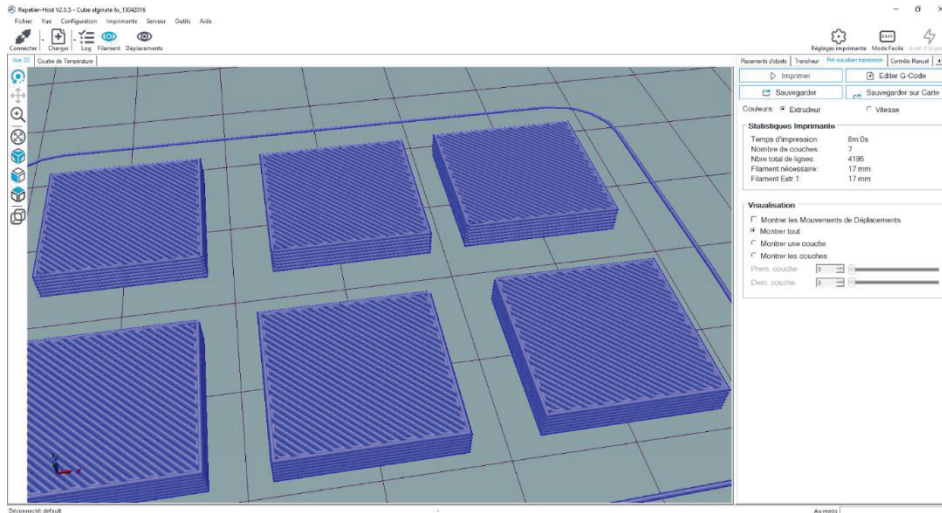


Figure 44. Ouverture du logiciel Slic3r pour déterminer les paramètres d'impression.

3. Le tranchage qui gère (toujours avec Slic3r) le découpage des objets en couches successives





4. Le lancement de l'impression.

III.3 L'étape de polymérisation

Une fois les objets bioimprimés, vient l'étape de polymérisation. Cette étape est essentielle afin de polymériser l'objet que l'on vient d'imprimer afin de pouvoir le faire maturer à 37°C. La préparation de cette solution se fait conjointement à l'étape d'impression. C'est une solution de CaCl_2 à une concentration de 3% m/v auquel il faut ajouter extemporanément un aliquot de thrombine à 500 U/mL. La procédure à suivre dépend des objets 3D qui viennent d'être imprimés (Tableau 3) :

Tableau 3. Tableau de correspondance entre les objets bioimprimés et la procédure de polymérisation à suivre.

Objets 3D	Volume de solution total (mL)	Volume de thrombine (μL)	Contenant	Temps de contact
6 cubes (~ 2 mL de bio-encre)	10	200	Boîte de pétri 10	1H
12 cubes (~ 4 mL de bio-encre)	20	400	Boîte de pétri 10	1H
Gros objet (~ 6 mL de bio-encre)	20	400	Falcon 50	1H30

En ajoutant la solution de polymérisation, il faut s'assurer que tous les objets sont décollés de leur surface d'impression afin que la polymérisation soit la plus homogène possible. Après le temps imparti, les objets doivent avoir une couleur plus opaque qui doit là aussi être homogène.

Et pour finir, les objets sont rincés par du PBS puis répartis dans des plaques 6 puits (pour les cubes) ou dans le bioréacteur. Le milieu de culture peut ensuite être ajouté de manière à ce qu'il recouvre totalement les objets bioimprimés.

III.4 Gestion de la température

Pour récapituler, le respect des températures, pour la préparation de la bio-encre, l'impression et la polymérisation, est primordial (comme on le verra dans le chapitre 3). Voici donc un schéma représentant les étapes majeures de la bioimpression de tissus et les températures correspondantes à respecter.

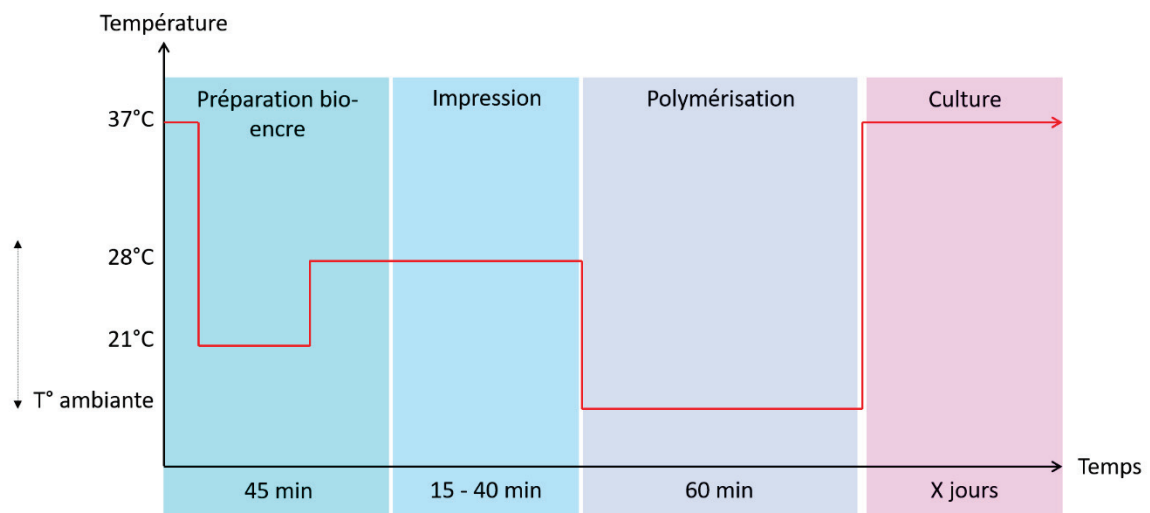


Figure 45. Graphique récapitulatif des changements de températures appliqués à la bio-encre puis à l'objet bioimprimé.

IV. Suivi post-impression

Les consommables utilisés sont pour la plupart identiques à ceux de la culture cellulaire classique. Par rapport à la culture cellulaire en 2D, la maturation des objets bioimprimés nécessitent un traitement spécifique. Pour les deux cas de figure qui suivent, un changement complet de milieu de culture est fait à J+1 afin d'éliminer les traces de gélatine liquéfiée et d'alginate non polymérisé.

IV.1 Cubes test

Le suivi post-impression des cubes test se réalise suivant plusieurs indications :

- Tous les jours (pour les cubes contenant des fibroblastes) avec l'ajout d'acide ascorbique à une concentration finale de 50 µg/mL,
- Tous les 2-3 jours par l'aspiration de la moitié du milieu de culture et l'ajout de milieu frais,
- Si le milieu est trop acide (jaune), surtout en fin d'expérimentation (après 21 jours), un changement de plaque peut être effectué. Un certain nombre de cellules se détachent du cube pour adhérer sur le fond de la plaque ce qui acidifie considérablement le milieu de culture.

IV.2 Gros objets

Pour les gros objets dans le bioréacteur, là aussi plusieurs étapes sont à réaliser tous les jours :

- Sortir le plateau de l'incubateur sur lequel est fixé le bioréacteur,
- Prélever 1 ou 2 mL de milieu de culture pour les dosages futurs,
- Mettre 1 goutte sur une lame pour vérifier la non-contamination du milieu,
- Injecter, via la seringue branchée sur le système, 2 à 5 mL (en fonction des prélèvements) de milieu frais supplémenté avec de l'acide ascorbique (pour une concentration finale de 50 µg/mL),
- Replacer le plateau à l'incubateur.

V. Méthodes de caractérisation

V.1 Microscopie optique et suivi de la GFP

Dans le cas de tissus contenant des cellules fluorescentes exprimant la GFP, le suivi de ces cellules se déroule par microscopie optique à fluorescence avec un filtre laissant passer uniquement les ondes à 395 nm (longueur d'onde de la GFP).

Plusieurs microscopes ont été utilisés au cours de cette thèse :

- Microscope optique Olympus IX51,
- Microscope optique Nikon Micro TS2 FL,
- Microscope optique Leica DMD 108 (pour les images de cartilage),
- Microscope électronique à transmission Jeol JEM 1400 (pour l'ultrastructure de la peau totale).

V.2 Méthode destructrice

V.2.1 Rhéologie

Un rhéomètre rotationnel à contrainte imposée (DHR2, instruments TA, USA) a été utilisé pour caractériser le comportement rhéologique de la bio-encre à l'aide d'une géométrie cône-plan (40 mm, 2°) afin d'assurer une homogénéité du taux de cisaillement subit par l'échantillon.

Deux tests ont été réalisés :

- Un test de balayage en fréquence à 28°C (mode dynamique), qui est la température de bioimpression, afin de caractériser le comportement viscoélastique de la bio-encre.
- Un test de rampe en contrainte à 28°C (mode continu), afin de mesurer la contrainte seuil de la bio-encre.

Le débit volumique Q_v constant peut être calculé grâce à l'équation suivante :

$$Q_v = \frac{v}{Mv}$$

Avec v = la vitesse d'extrusion de la bio-encre en fonction du temps (en g/s) et Mv la masse volumique de la bio-encre de 1,14 g/cm³. Soit un débit obtenu de 117 µL/s.

V.2.2 Histologie et immunohistochimie

Une fois les objets bioimprimés et matures, plusieurs possibilités d'analyse se présentent. L'histologie consiste à fixer les tissus dans des blocs de paraffine puis à les couper (5 µm) et à effectuer des colorations ou des marquages immunohistochimiques suivant un protocole établi :

- Dans une Falcon 50, préparer une solution de PFA (ParaFormAldéhyde) à 4 % v/v en ajoutant 48 mL de DPBS puis 2 mL de PFA,
- Immerger les cubes/objets bioimprimés directement dans la solution de PFA,
- Incuber suivant l'épaisseur des objets entre 12 à 24 h à 4°C,
- Transférer les objets dans les cassettes histologiques appropriées,
- Immerger les cassettes dans l'éthanol 70 % v/v,
- Effectuer l'inclusion dans la paraffine puis les coupes grâce à un microtome, les montages sur les lames, le déparaffinage et les colorations ou marquages.

V.2.2.1 Les colorations de routine : histologie

Voici la liste des différentes colorations utilisées au cours des différentes expérimentations de bioimpression de tissus (Tableau 4).

Tableau 4. Liste des différentes colorations utilisées.

Nom du colorant	Cible	Couleur attendue
HE Hématoxyline-éosine	Noyaux Cytoplasme	Bleu/violet Rose/rouge
HPS Hématoxyline phloxine Safran	Noyaux Cytoplasme Fibres de collagène	Bleu/violet Rose Rose-orangé
Trichrome de Masson	Noyaux Cytoplasme Fibres de collagène	Violet foncé Rouge-rosé Vert
Bleu alcian	Glycosaminoglycanes sulfatés	Bleu
Rouge Sirius	Fibres de collagène	Rouge-rosé

V.2.2.2 Les différents marquages utilisés : immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode de localisation des protéines dans les cellules d'une coupe grâce à la détection d'antigène (présents dans les tissus biologiques et plus ou moins spécifique d'un certain type de protéines) par les anticorps. Ce type de marquage peut être visualisé par la conjugaison anticorps/enzyme qui catalyse une réaction produisant un composé coloré (IHC) par l'utilisation d'anticorps marqués par une sonde fluorescente (IF) (FITC, Alexa Fluor...). Pour réaliser des IF, les tissus sont le plus souvent congelés (-80°C) en inclusion dans une résine (OCT Compound par exemple) afin d'éliminer tout bruit de fond lié à la présence de PFA.

V.2.2.2.1 Peau

Pour des raisons de confidentialité, les anticorps utilisés et leurs conditions d'utilisation en immunofluorescence (IF) de la peau ne seront pas détaillés ici. Seule la liste des protéines marquées est disponible :

- Pour l'épiderme : cytokératine 10, filagrine, loricrine,
- Pour la jonction dermo-épidermique : laminine 332, collagène VII,
- Pour le derme : collagène I, collagène V, fibrilline, élastine.

V.2.2.2.2 Cartilage

Une seule immunohistochimie (IHC) a été réalisée afin d'identifier clairement le collagène II. Elle a été réalisée grâce au kit LSAB[®]+ (HRP, Dako) sur la base des techniques d'avidine-biotine. Un anticorps monoclonal primaire spécifique du collagène II (Labvision, France) a été utilisé. Les coupes de 5 µm ont été déparaffinées, traitées avec de la pepsine (0,4 % m/v) pendant 30 minutes à température ambiante et incubées dans une solution de peroxyde d'hydrogène pendant 5 min pour bloquer la peroxydase endogène. Le collagène II sécrété par les cellules apparaît avec une coloration marron.

V.2.2.2.3 Endothélium vasculaire

En ce qui concerne l'endothélium vasculaire deux marqueurs immunohistochimiques ont été utilisés. Ils ont été utilisés en inclusion en paraffine pour une observation dans le visible et en immunofluorescence. Ils sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5. Tableau présentant les spécificités deux marqueurs utilisés en immunohistochimie de l'endothélium vasculaire

Nom du marqueur	Cible spécifique	Source	Fournisseur	Dilution	Longueur d'onde du marqueur fluorescent
Anticorps anti-endothélium [EN4]	CD31	Monoclonal Espèce : souris	Abcam	1/20	495
Anticorps anti-Von Willebrand facteur [VWF]	Corps de Weibel Palade	Monoclonal Espèce : souris	Abcam	1/50	495

V.2.3 Microscopie Electronique à Transmission

L'ultrastructuration des peaux bioimprimées a été étudiée grâce à des analyses au microscope électronique à transmission. La procédure a été de les fixer avec un tampon cacodylate de sodium à 0,1 M contenant 2% v/v de glutaraldéhyde et un pH de 7,5 à 4°C pendant une nuit et ensuite post-fixé avec 1% v/v de tétroxyde d'osmium. Après déshydratation, les échantillons ont été incorporés dans une résine époxy polymérisée pendant 3 jours à 56°C. Les coupes ont ensuite été contrastées successivement avec une solution à 7% v/v d'acétate d'uranyle, puis avec du citrate de plomb. Les images ont été effectuées au centre d'imagerie de Laënnec (Lyon, France) à l'aide d'un microscope électronique à transmission Jeol JEM 1400.

V.2.4 Suivi de croissance cellulaire

Afin de déterminer la croissance cellulaire dans les cubes test, une procédure a été créée pour la dissociation d'un cube et la numération des cellules à l'intérieur de ce dernier :

- Préparer une solution de Trypsine-EDTA diluée 1/10 (0,5 mL dans 5 mL de PBS),
- Préparer une solution de collagénase à 3% (0,3 g dans 10 mL de DPBS),
- Mettre au bain-marie le milieu complet, le DPBS, la trypsine-EDTA diluée au 1/10 et la collagénase 3% m/v pendant 15 min avant de commencer l'expérience,
- Peser et noter le poids d'un tube Falcon 15 mL vide,
- Prélever le fragment de tissu bioimprimé et le déposer dans le tube Falcon 15 mL,
- Peser et noter le poids du tube Falcon 15mL contenant le tissu,
- Ajouter 1 mL de trypsine-EDTA diluée au 1/10 dans du PBS et incuber dans le bain-marie 5 min à 37°C,
- Ajouter 1 mL de milieu DMEM complet et centrifuger 5 min à 1200 rpm,
- Vider le surnageant et re-suspendre dans 5 mL de PBS,
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm puis vider le surnageant,
- Re-suspendre dans 0,5 mL de collagénase 3% et incuber dans le bain marie 10 min à 37°C,
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm,
- Vider le surneageant et re-suspendre avec 1 mL de DPBS ; la re-suspension se fait ici en faisant des allers-retours doux successifs avec une pipette de 1 mL,
- Observation microscopique pour numération.

V.3 Méthodes non-invasive : dosages enzymatiques

Afin d'évaluer la croissance des cellules sans avoir besoin de détruire les échantillons, et dans l'optique d'effectuer un suivi de croissance au sein d'un bioréacteur, nous avons essayé de mettre en place deux méthodes de dosage, du glucose et du lactate présents dans le milieu de culture. Les différents dosages reposent sur des mesures d'absorbances qui ont été réalisées sur un lecteur de plaque Infinite® 200 PRO (Tecan).

V.3.1 Glucose

Le glucose est l'une des principales sources de carbone et d'énergie de la cellule. Afin de suivre la consommation par les cellules de glucose présent dans le milieu de culture, un kit (GLUCOSE GOD-PAP, Biolabo) de dosage quantitatif est utilisé. Ce dosage fonctionne selon une double réaction enzymatique : dans la première, la glucose-oxydase (GOD) oxyde le glucose en acide gluconique en présence d'oxygène, alors réduit en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est pris en charge par une seconde enzyme, une peroxydase, qui oxyde un substrat chromogénique, l'o-dianisidine, en un produit coloré qui absorbe à 500 nm. La formation de ce produit est suivie par spectrophotométrie.

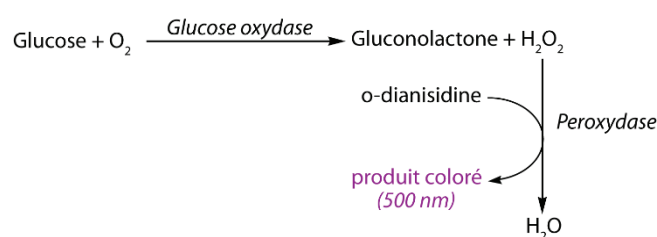


Figure 46. Représentation schématique du fonctionnement réactionnel du dosage du glucose par spectrophotométrie grâce au kit GLUCOSE GOD-PA, Biolabo.

Le milieu de culture dans lequel mature le tissu bioimprimé est prélevé tous les quatre jours, afin de quantifier le glucose potentiellement consommé.

Une gamme d'étalonnage de concentrations connues en glucose a été réalisée dans le DMEM. L'équation de la droite étalon ($\text{Abs} = 0,096 \times [\text{glucose}] + 0,2186$) a été utilisée pour déterminer la concentration en glucose dans les échantillons prélevés.

Les prélèvements de milieu sont dilués au 1/10ème dans du NaCl 9 g/L. Pour chaque échantillon, 10 µL sont mélangés à 200 µL du mélange de réactifs (100 µL de R1 : (Tampon phosphate (150 mmol/L), Glucose oxydase (GOD) (>20 000 UI/L), Peroxydase (POD) (> 1000 UI/L), 4-Amino-antipyrine (PAP) et 100 µL de R2 : Chloro-4-phénol (2 mmol/L)) dans le puits d'une plaque 96 puits à fond plat, en triplicat. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 500 nm est mesurée et la valeur d'absorbance du blanc réactif est soustraite à celle de l'échantillon. La concentration en glucose du milieu est ensuite obtenue grâce à la courbe d'étalonnage

V.3.2 Lactate

Afin de suivre la production de lactate, un kit de dosage (L-Lactic Acid Assay Kit, Megazyme) est utilisé. Ce dosage nécessite deux étapes : la première fait intervenir la lactate déshydrogénase, qui oxyde le lactate en pyruvate en présence de NAD⁺. L'équilibre de cette réaction tend vers la formation du lactate, c'est pourquoi une deuxième enzyme est utilisée, la D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT) : celle-ci convertit le pyruvate en alanine en présence d'un excès de glutamate produisant du 2-oxoglutarate. La production de NADH lors de la première réaction est suivie par spectrophotométrie à 340 nm.

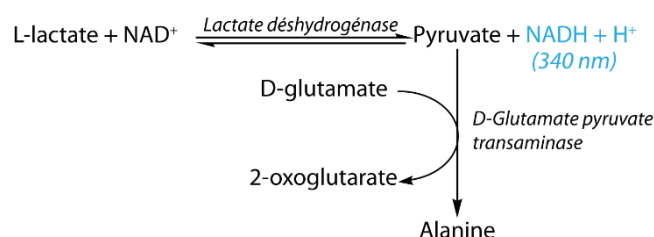


Figure 47. Représentation schématique du fonctionnement réactionnel du dosage du lactate par spectrophotométrie grâce au kit L-Lactic acid assay kit, Megazyme.

Le milieu de culture dans lequel mature le tissu bioimprimé est prélevé tous les quatre jours, afin de quantifier le lactate potentiellement produit.

Une gamme d'étalonnage de concentrations connues en lactate a été réalisée dans le DMEM. L'équation de la droite étalon ($\text{Abs} = 0,584 \times [\text{lactate}] - 0,0193$) a été utilisée pour déterminer la concentration en lactate dans les échantillons prélevés.

Pour chaque échantillon, 10 μL sont mélangés à : 150 μL d'eau distillée, 50 μL de solution 1 (Buffer (25 mL, pH 10) plus D-glutamate and sodium azide (0,02% m/v)), 10 μL de solution 2 (NAD⁺/PVP) puis 2 μL de solution 3 (D-Glutamate-pyruvate transaminase suspension) en triplicat dans un puits d'une plaque 96 puits à fond plat. Une première lecture (A1) est faite à 340 nm après 3 min. La réaction est initiée en ajoutant 2 μL de la solution 4 (L-Lactate déshydrogénase). Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 340 nm est mesurée et l'absorbance A1 est soustraite à A2, puis la différence d'absorbance (A2-A1) du blanc réactif est soustraite à celle de l'échantillon. La concentration en lactate du milieu est ensuite obtenue grâce à la courbe d'étalonnage.

CHAPITRE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA FORMULATION D'UNE BIO-ENCRE

Ce chapitre a pour but de présenter l'évolution de la formulation de la bio-encre pour arriver jusqu'à celle définitive utilisée dans toutes les expérimentations de tissus bioimprimés. Certains facteurs limitants ont pu être déterminés et optimisés afin d'obtenir plus de reproductibilité dans notre procédé de bioimpression. L'utilisation d'un inhibiteur de la thrombine a été étudiée dans le but d'une utilisation dans la polymérisation homogène d'un objet de grande taille (épaisseur supérieure à 1 cm). Puis plusieurs caractérisations par étude de la rhéologie ont été conduites afin de s'assurer que les contraintes de cisaillement pendant l'étape de bioimpression n'endommageaient pas les membranes cellulaires. Et pour finir, plusieurs suivis de viabilité cellulaire ont été réalisés afin de caractériser la maturation tissulaire grâce à différentes méthodes destructives ou non-destructives (dosages enzymatiques).

I. Evolution de la stratégie de bioimpression 3D

I.1 Fils d'alginate

Le premier objectif est de réussir à extruder un fil d'alginate dans une solution de calcium afin d'obtenir un fil polymérisé. Comme indiqué dans l'étude bibliographique, l'alginate est un biomatériau biocompatible et largement utilisé en ingénierie tissulaire, ce qui en a fait un candidat de choix pour débiter ces premiers essais.

Une seringue d'alginate à une concentration de 4 % m/v a été préparée et extrudée petit à petit dans un bain de calcium à une concentration de 1 % m/v. Avec cette configuration, l'alginate sortant remonte à la surface, ne permettant ni la formation d'un fil, ni l'adhésion des fils entre eux dans le but de former un objet en trois dimensions. L'alginate étant préparé dans l'eau, sa densité est égale à celle du bain de calcium, il a fallu trouver un additif afin d'augmenter la densité du mélange extrudé. Du glycérol a été choisi afin d'augmenter la densité du fil d'alginate. Les fils alors extrudés ne flottent plus et sont parfaitement homogènes en diamètre mais ils n'adhèrent toujours pas entre eux.

Le résultat est l'obtention d'un filament qui se polymérise en temps réel. Cependant, aucune adhésion entre les couches n'est observée ce qui est un critère indispensable à la réussite de la bioimpression.

I.2 Fils d'alginate/gélatine

Il a été décidé, pour augmenter l'adhésion des filaments entre eux, de s'affranchir d'une phase liquide pendant l'étape de bioimpression. Une des exigences est que la bio-encre puisse « tenir » sur le plateau dans le temps de l'impression, en terme rhéologique : avoir un seuil suffisant. La gélatine a été sélectionnée pour sa disponibilité, sa facilité de préparation et sa modulation en fonction de sa concentration (de très liquide à un hydrogel compact). La gélatine étant un biomatériau thermosensible, avec une température de transition liquide/gel qui va dépendre de sa concentration et de son degré Bloom, il a été décidé de la préparer à une concentration de 20 % m/v et de la solubiliser pendant 6 heures à 37°C. Elle a ensuite été ajoutée à l'alginate dans la proportion 2 : 1 (Gélatine : Alginate).

Cet ajout permet un dépôt continu par bioextrusion directement sur le plateau d'impression. Les joncs de biomatériaux adhèrent entre eux, et supportent le poids des couches suivantes.

1.3 Progression du protocole

Désormais, la gélatine et l'alginate sont préparés indépendamment dans du DMEM, afin d'apporter aux cellules les nutriments nécessaires pendant l'étape de préparation et d'impression, et ainsi réduire leur mortalité. Puis, ces biomatériaux, préparés suivant les concentrations finales de gélatine de 10 % m/v et d'alginate de 1 % m/v, ont été mélangés avec les cellules NIH 3T3 eGFP (100 000 cellules/mL en moyenne) pour être imprimés en une seule étape. L'obtention rapide de plusieurs petits cubes (0,5 cm³) a été un succès. Une fois les cubes bioimprimés, ils ont été immergés dans une solution de calcium (3 % m/v) pendant 30 minutes puis ils ont été mis en culture.

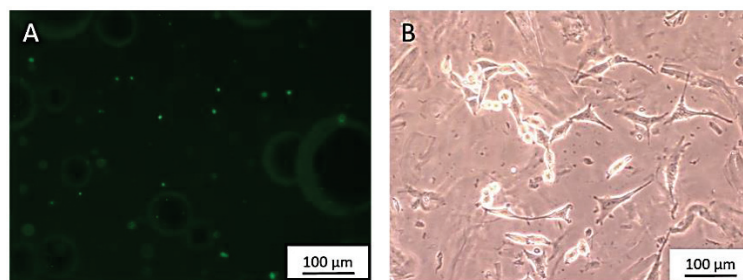


Figure 48. A) Observation par microscopie de fluorescence des cellules NIH 3T3 eGFP à l'intérieur du cube après 1 jour de maturation. B) Observation par microscopie de ces mêmes cellules accrochées au fond de la boîte de pétri après 5 jours de maturation. Barre d'échelle : 100 µm.

L'observation par microscopie de fluorescence après 1 jour de maturation indique une répartition homogène des cellules à l'intérieur de l'objet (Figure 48-A). Cependant, après 5 jours de maturation, il apparaît très compliqué de les observer par microscopie de fluorescence. L'objet imprimé auto-fluoresce énormément ne laissant que très peu de visibilité. La seule observation possible est celle du fond de la boîte de pétri dans laquelle les cellules qui se détachent du pourtour de l'objet viennent s'accrocher (Figure 48-B). Leur forme allongée est caractéristique de ce type cellulaire en 2D indiquant l'absence d'effet cytotoxique des biomatériaux.

Après 3 semaines de maturation, l'objet a été détruit manuellement afin d'observer s'il restait des cellules à l'intérieur. La présence de plusieurs cellules rondes et fluorescentes a été constatée. Cette fluorescence indique que leurs membranes cellulaires sont encore intactes

ce qui signifie qu'elles sont encore vivantes. De plus, leur viabilité après 3 semaines de maturation permet de conclure que le procédé de bioimpression en préserve un nombre suffisant pour garantir leur survie. En effet, en dessous d'une certaine densité (dépendant du type cellulaire), les cellules se retrouvent trop éloignées les unes des autres, dans l'impossibilité de communiquer entre-elles, ce qui provoque leur mort par apoptose.

L'information importante à extraire est l'absence de cellules de forme allongée, c'est-à-dire adhérentes, à l'intérieur d'un cube signifie que le mélange de biomatériaux ne permet pas leur adhésion à l'intérieur de ce cube.

I.4 Ajout de motifs d'adhésion cellulaire

La composition finale de la bio-encre est désormais de 10 % m/v de gélatine et de 1 % m/v d'alginate. Les étapes suivantes consistent en l'incorporation au sein de cette bio-encre de motifs d'adhésion cellulaire qui vont permettre aux cellules de se développer en un réseau²⁰⁴. Pour cela, trois biomatériaux ont été ajoutés et testés en parallèle : la fibronectine, l'alginate RGD et le fibrinogène.

I.4.1 Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire d'un grand nombre de tissus. Elle a été incorporée à la bio-encre à une concentration de 1 mg/mL et les fibroblastes à une concentration de 200 000 cellules/mL. L'utilisation de fibroblastes primaires est corrélée aux débuts de notre collaboration avec LabSkin Creations et notre volonté de construction de modèle de peau physiologique.



Figure 49. Observation macroscopique de l'objet bioimprimé 1 semaine après l'impression. Barre d'échelle : 500 µm.

Quelques heures seulement après la fin de l'impression, des cellules de formes allongées (et réfringentes) ont pu être observées à l'intérieur de l'objet imprimé. Cependant, l'objet s'est rapidement dégradé en une semaine (Figure 49), ne laissant pas la possibilité de l'observation de la création d'un réseau cellulaire. Cette dégradation est liée à la faible tenue mécanique du cube à 37°C, conséquence directe de la liquéfaction de la gélatine. Théoriquement, c'est l'alginate qui apporte toute sa structure au cube en maturation. Cependant, seul, il ne suffit pas à maintenir l'intégrité de la structure pendant l'étape de maturation.

1.4.2 Alginate RGD

L'objectif avec l'alginate RGD est d'ajouter un réseau de polymère supplémentaire afin de renforcer la structure de l'objet pendant la maturation des cellules tout en apportant des motifs d'adhésion pour ces dernières. Il a été ajouté à la bio-encre à une concentration finale de 1 % m/v (Novapatch MVG, Novamatrix). La concentration théorique de RGD dans un cube est de 52 nmol/cm³.

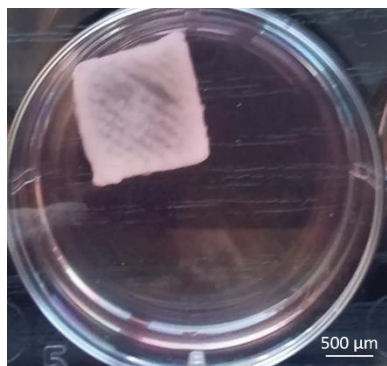


Figure 50. Observation macroscopique du cube après 2 semaines de maturation. Barre d'échelle : 500 µm.

Le cube a été conservé à l'incubateur pour l'étape de maturation pendant 2 semaines. Sa structure apparaît comme préservée avec un pourtour plus opaque témoin d'un réseau dense d'alginate. Cependant, il n'est pas possible de distinguer les cellules. Les seules que l'on peut voir se trouvent au fond de la boîte de pétri, bien adhérentes et allongées. L'objet reste en culture pendant deux semaines sans trouver de possibilité d'observation des cellules.

1.4.3 Fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine présente dans la circulation sanguine (chapitre 1) et très utilisée en ingénierie tissulaire. Elle a été solubilisée dans du DMEM à une concentration de 80 mg/mL et incorporée à la bio-encre avec les NIH 3T3 eGFP (100 000 cellules/mL). La concentration théorique de RGD est de 3700 nmol/cm³. Après impression, une solution de calcium à une concentration de 3 % m/v a été utilisée avec une solution et de thrombine à 20 U/mL. Différents temps de contact ont ainsi pu être évalués (partie suivante, 1.5).

Une des premières preuves de concept vient de l'observation de la croissance des NIH 3T3 eGFP après 5 jours de maturation (Figure 51).

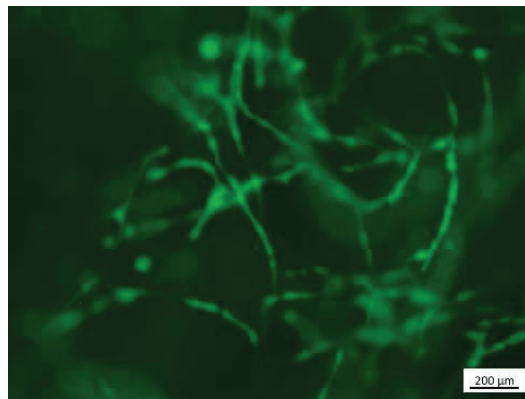


Figure 51. Observation par microscopie de fluorescence des NIH 3T3 eGFP à l'intérieur d'un cube bioimprimé avec la formulation finale de la bio-encre. Barre d'échelle : 200 µm.

Les cellules forment un réseau dense en 3D, sont de formes allongées et connectées entre elles. Cela démontre leur intégration à la bio-encre et leur développement en 3D. Quant au cube, il semble conserver sa structure pendant au moins 2 semaines prouvant que le réseau de biomatériaux apporte une stabilité suffisante au cube en maturation. La bio-encre polymérisée est capable de maintenir les cellules en vie, et de provoquer leur attachement par le biais de motifs d'adhésion cellulaire.

Pour résumer, l'évolution de la formulation s'est faite en gardant comme objectif la création d'un tissu par bioextrusion (Tableau 6).

Tableau 6. Récapitulatif des différentes formulations testées et des problématiques rencontrées.

Formulation (concentration finale des biomatériaux en m/v)	Remarques
Alginate seul	Pas imprimable par bioextrusion
Gélatine (10 % m/v) Alginate (1% m/v)	Pas de motifs d'adhésion cellulaire donc pas de formation tissulaire
Gélatine (10 % m/v) Alginate (1 % m/v) Fibrinogène (2 % m/v)	Formulation finale

Ces premiers essais ont permis la création d'un protocole dédié à la bioimpression de tissu (chapitre 2, II) avec l'identification des points les plus importants pour la formulation de cette bio-encre :

- La solubilisation homogène des solutions mères avec la mise en place d'une préparation la veille de l'expérimentation,
- La température de ces solutions mères doit être à 37°C afin de faciliter le mélange avec les cellules en minimisant la formation de bulles problématiques pour les contrôles de débit d'impression notamment,
- L'influence du temps de polymérisation.

1.5 Influence du temps de polymérisation

L'étape de polymérisation va former un hydrogel par auto-assemblage des brins de fibrine après hydrolyse par la thrombine et par chélation du calcium par l'alginate. Ceci permet de stabiliser l'objet imprimé pendant la phase de maturation à 37°C. Cette étape est donc cruciale en regard de la formation d'un tissu. Différents temps de contact entre le cube test et la solution de polymérisation ont été testés : 10 minutes, 25 minutes et 45 minutes.

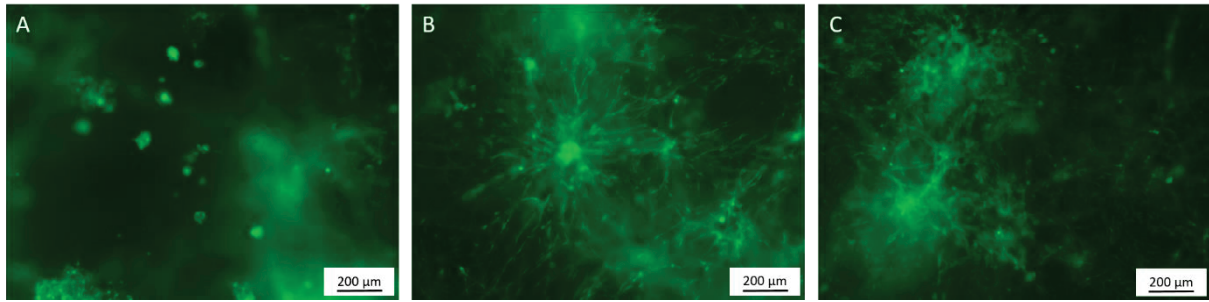


Figure 52. Différence de développement des cellules NIH 3T3 eGFP après 5 jours de maturation suite à un temps de polymérisation de A) 10 min, B) 25 min, et C) 45 min, barre d'échelle : 200 μm .

Ces résultats permettent d'identifier qu'un temps de contact inférieur à 45 minutes induit la formation de sphéroïdes à l'intérieur même du cube test. En effet, un temps de polymérisation trop court va entraîner une polymérisation partielle de l'hydrogel, rendant sa tenue plus fragile et pouvant expliquer l'apparition de sphéroïdes. Les cellules ne pouvant pas adhérer à la microstructure du gel, celles-ci se regroupent entre elles et forment ainsi des sphéroïdes.

Pour la bioimpression 3D d'un tissu, le résultat espéré est la formation homogène d'un tissu en 3D. Un temps de contact de l'objet bioimprimé avec la solution de polymérisation d'au moins 45 minutes est nécessaire pour l'obtention d'une répartition cellulaire et d'une maturation homogène.

II. Utilisation d'un inhibiteur de thrombine

La solution de polymérisation agit par diffusion jusqu'à l'intérieur du cube. La création potentielle d'un gradient de diffusion ne pose pas de problème si un temps de contact d'au moins 45 minutes (chapitre 3-1.5) est respecté et si la taille du cube est standardisée, soit 1 x 1 x 0,5 cm. En cas de taille supérieure, ce gradient n'étant pas caractérisé, sa diffusion peut alors être limitée dans la profondeur de l'objet. Afin d'outrepasser ces éventuels problèmes de diffusion de la solution de polymérisation à l'intérieur d'un objet imprimé de taille plus importante (qu'un cube test), un inhibiteur de thrombine sensible à la lumière a été utilisé. Initialement le but est d'incorporer la thrombine inhibée dans la bio-encre. Après l'étape d'impression et en même temps que la polymérisation par le calcium, l'inhibition de la

thrombine est levée par exposition à la lumière visible engendrant alors la polymérisation du fibrinogène.

L'inhibiteur de thrombine (appelé IT), le p-Amidinophényl-(E)-4-diéthylamino-2-hydroxy-alpha-méthylcinnamate a été synthétisé par le Dr Joseph et le Dr Fournet de l'ICBMS, à partir de la publication de Porter *et al.*²⁰⁵. Cet inhibiteur se fixe de manière covalente au groupement hydroxyle d'une sérine du site actif de la thrombine (Figure 53). Une longueur d'onde de 366 nm provoque une réaction de lyse²⁰⁶ permettant la libération du site actif de la thrombine conduisant au clivage du fibrinogène et son auto-assemblage en fibrine.

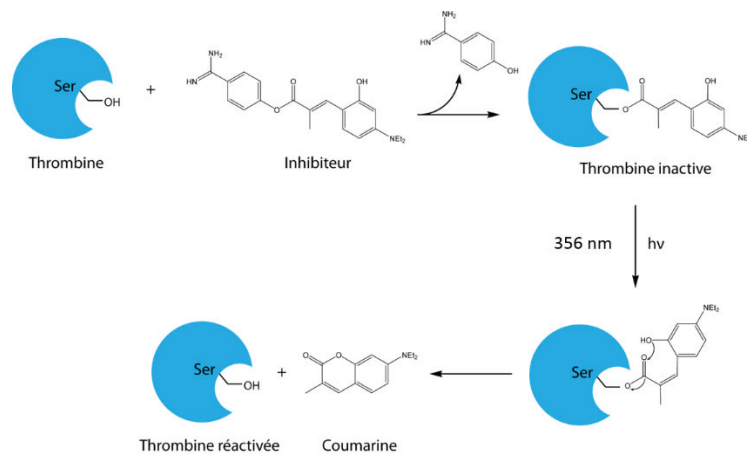


Figure 53. Représentation schématique de l'action de l'inhibiteur de thrombine et de sa réactivation par la lumière. Adapté de²⁰⁵

Toutes les expérimentations ont donc été réalisées dans l'obscurité et les phases d'exposition à la lumière ont été effectuées grâce à la lumière visible²⁰⁵ du PSM (Poste de Sécurité Microbiologique équipée d'un néon de 35 Watt situé à 50 cm de l'objet).

II.1 Cinétique d'inhibition

II.1.1 Test colorimétrique en présence d'un substrat chromogénique

La réaction catalysée par la thrombine a été étudiée en présence d'un substrat chromogénique de la thrombine. Ce substrat est un peptide (Alanine-Glycine-Arginine) sur lequel est greffé un chromophore (p-nitroanilide). L'action de la thrombine libère le p-nitroanilide dont la longueur d'onde maximale d'absorbance est de 405 nm.

La première étape a été d'étudier l'efficacité de l'inhibition de la thrombine par l'IT. L'activité de la thrombine a été mesurée après différents temps de contact entre la thrombine et l'inhibiteur et les vitesses de formation du produit de réaction ont été mesurées (Figure 54).

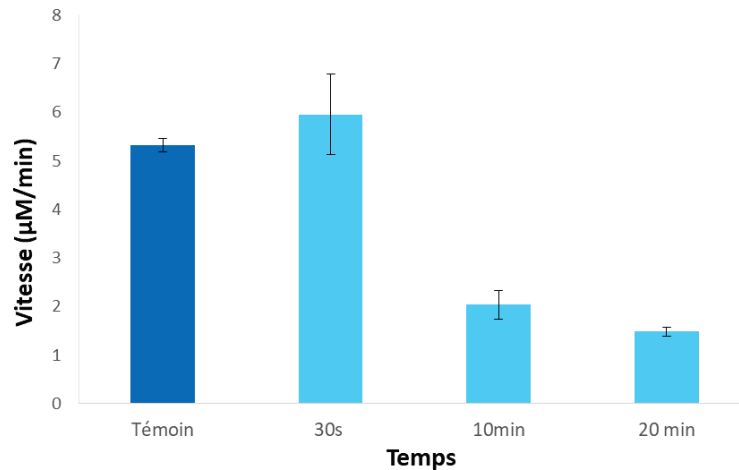


Figure 54. Influence du temps de contact entre l'inhibiteur et la thrombine sur l'activité enzymatique de la thrombine (20 U/mL). Le témoin correspond à l'activité de la thrombine en absence d'inhibiteur.

Après 30 secondes de contact entre l'IT et le substrat chromogénique, aucune différence d'activité significative n'a été constatée par rapport au témoin (thrombine seule). En effet, l'ordre de grandeur de l'activité mesurée est similaire, respectivement de 5,32 µM/min et de 5,94 µM/min. En revanche, au bout de 10 minutes de contact (toujours dans l'obscurité) une inhibition de l'activité apparaît, la vitesse de formation passe alors à 2,03 µM/min soit une diminution de l'activité de plus de 60 %. Après 20 minutes de temps de contact, une inhibition encore plus importante est mesurée 1,48 µM/min soit un pourcentage d'inhibition de 70 %.

Dans le contexte de l'utilisation d'un substrat chromogénique, ce pourcentage d'inhibition peut paraître encore trop faible cependant, il a été décidé que pour notre application finale (avec le fibrinogène et les cellules) il était suffisant puisqu'il permet son incorporation dans la bio-encre et l'impression d'un objet sans polymériser prématurément le fibrinogène (Chapitre 3, II.2).

Ensuite, le temps de réactivation de la thrombine par exposition à la lumière a été étudié à l'aide cette même méthode spectrophotométrique (Figure 55).

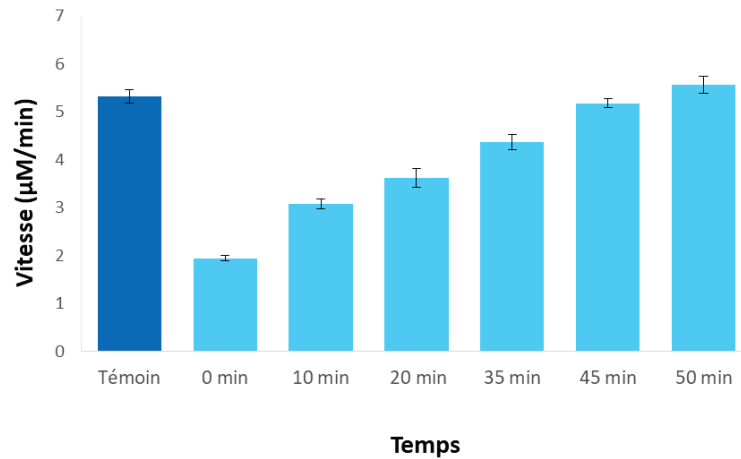


Figure 55. Influence du temps d'exposition à la lumière sur la réactivation de la thrombine inhibée par contact avec IT.

La réactivation de la thrombine par la lumière se fait dès les premières secondes. Après 10 minutes d'exposition à la lumière, la thrombine a retrouvé plus de 50 % de son activité (3,07 µM/min). Au bout de 45 minutes, la vitesse de formation d'un composé coloré mesurable est de 5,18 µM/min ce qui correspond à 97 % de l'activité de la thrombine.

Les conditions retenues pour l'inhibition de la thrombine par l'IT sont donc de 20 minutes de contact dans l'obscurité, et de 45 minutes de réactivation à la lumière.

II.1.2 Test de turbidité en présence de fibrinogène

L'objectif est d'utiliser l'IT dans la bio-encre, sa cinétique d'inhibition a donc été conduite sur son substrat d'origine, le fibrinogène. Ce dernier ne libérant pas de composant coloré ou de molécules détectables par spectrophotométrie, il a été décidé de mesurer la turbidité du mélange fibrinogène/thrombine/IT.

Dans un premier temps, l'influence de la concentration de la thrombine a été étudiée afin de déterminer avec quelle concentration de thrombine, les mesures de turbidité sont les plus représentatives.

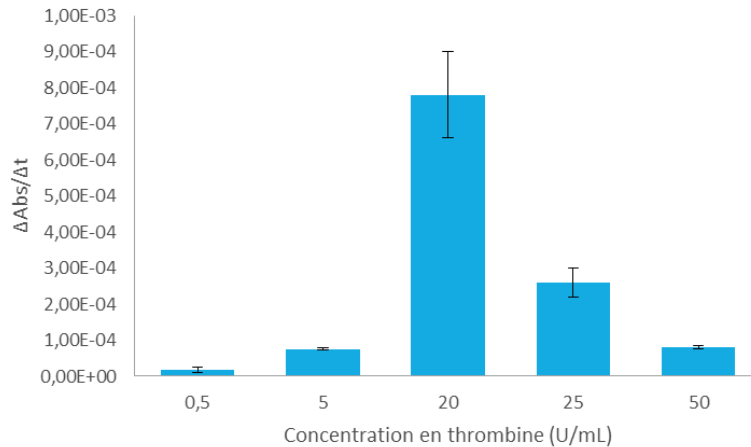


Figure 56. Influence de la concentration en thrombine sur la mesure de turbidité par la formation de fibrine. Le substrat étant le fibrinogène à une concentration de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comme observé très clairement sur la Figure 56, c'est avec de la thrombine à une concentration de 20 U/mL que la vitesse d'apparition de la turbidité est la plus élevée. Cette concentration est justement celle utilisée en routine dans la solution de polymérisation avec le calcium. L'hypothèse est qu'avec des concentrations plus fortes, la formation de fibrine s'initie trop rapidement en formant un gel très dense où l'absorbance est alors difficile à évaluer.

Afin de pouvoir utiliser cet inhibiteur dans la bio-encre, une dernière vérification est à effectuer. Il faut vérifier que la thrombine inactivée peut retrouver toute son activité afin de pouvoir enclencher la formation de fibrine *in situ*. Il s'agit alors, comme précédemment, de réaliser son inhibition par l'IT à l'obscurité pendant 20 minutes. Ensuite, le mélange de thrombine inactivée est exposé à la lumière et mis en contact du fibrinogène pour une première mesure, c'est notre premier point à $T = 0$. La thrombine inactivée (mais exposée à la lumière donc en phase de réactivation) va être prélevée et mise en contact du fibrinogène à des temps de 11, 23, 35, 45, et 60 minutes afin de vérifier le retour d'une activité identique à celle du témoin. Les mesures de turbidité représentent alors les vitesses de quantité de fibrine formée et par conséquent sa vitesse de formation liée à la réactivation de la thrombine (Figure 57).

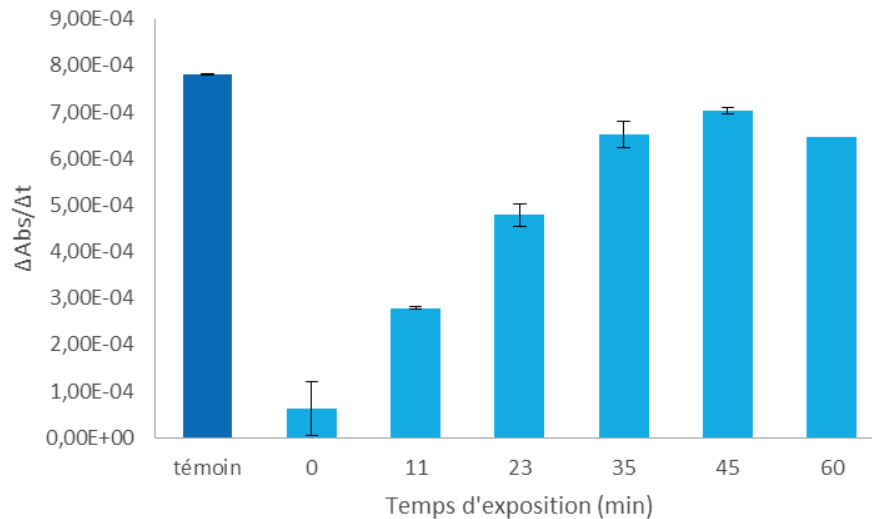


Figure 57. Influence du temps d'exposition à la lumière du mélange IT/thrombine sur la réactivation de la thrombine par mesure de turbidité provoquée par la formation de fibrine.

Il a été observé une nette augmentation de la turbidité en fonction des temps d'exposition à la lumière à partir de 23 minutes (Figure 57) où la turbidité mesurée atteint 50% de la valeur du témoin. Après 35 minutes d'exposition un palier est observé avec des valeurs similaires à celle du témoin, signe que la thrombine inactivée a retrouvé toute son activité permettant ainsi la formation de fibrine.

Les étapes d'inactivation de la thrombine par l'IT, de son incorporation au fibrinogène suivi d'une phase d'exposition à la lumière permettent la formation de fibrine démontrant ainsi la réactivation de la thrombine.

II.2 Essai avec la bio-encre

L'objectif principal est son utilisation au sein de notre bio-encre. Sans l'aide de cet inhibiteur, il est très compliqué de polymériser de manière homogène un objet bioimprimé comprenant des épaisseurs dépassant 1 cm. Cette distance correspond à la limite de diffusion critique identifiée pendant un temps de polymérisation de 45 minutes. L'IT a été utilisé pour l'impression d'un objet grand format : une oreille de taille humaine avec des épaisseurs dépassant 1 cm.

Comme pour les manipulations précédentes, il a fallu inhiber la thrombine (20 U/mL) pendant 20 minutes. Le mélange inactivé d'IT/thrombine a été incorporé à 4 mL de

fibrinogène (à une concentration de 80 µg/mL). L'absence de turbidité à l'obscurité a confirmé que le fibrinogène ne s'auto-assemblait pas. Ensuite, les cellules (NIH 3T3 eGFP) ont été reprises dans le fibrinogène/IT/thrombine puis la gélatine et l'alginate ont été ajoutés dans les proportions habituelles (chapitre 2) et l'impression lancée. Toutes ces manipulations ont eu lieu dans l'obscurité et les Falcon/seringues ont été protégé grâce à du papier d'aluminium.

A la fin de l'impression, l'oreille a été exposée à la lumière visible du PSM (source la plus directe, puissance de 35 Watt, située à 50 cm de l'objet) et plongée dans une solution de calcium (pour la chélation de l'alginate) à une concentration de 3 % m/v. L'oreille a pu être mise en présence de DMEM et placée à l'incubateur pour une durée de 2 semaines.



Figure 58. Photographie représentant une oreille de taille humaine bioimprimée à l'aide d'un inhibiteur de thrombine.

L'étape de bioimpression s'est déroulée aisément et la structure 3D a été conservée suivant le dessin 3D original (Figure 58). Dû à une épaisseur importante l'observation des cellules a été compliquée, certaines ont cependant pu être observées au bout de deux semaines (Figure 59).

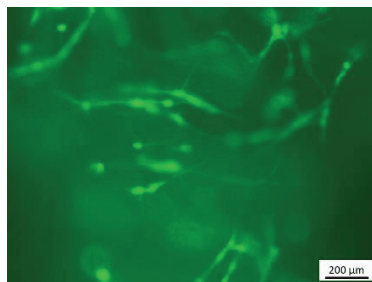


Figure 59. Cellules NIH 3T3 eGFP à l'intérieur de l'oreille après 2 semaines maturation.

La conservation de la structure pendant une durée de 2 semaines démontre que la polymérisation s'est faite efficacement. Cependant malgré certaines zones cellularisées (Figure 59), d'autres semblent complètement dépourvues de cellules. De plus, le comportement mécanique de l'oreille après deux semaines de maturation est très faible : l'objet immergé conserve sa forme mais il est impossible de le sortir du milieu liquide sans le détruire totalement.

L'hypothèse mise en avant concerne le manque de diffusion des nutriments et des gaz. En effet, au-delà d'une certaine épaisseur (500 μm en moyenne) les cellules n'ont plus accès aux échanges de nutriments et gazeux ce qui provoquent leur apoptose.

L'idée de polymériser un objet bioimprimé directement de l'intérieur, et par simple exposition à la lumière, afin d'éviter les hétérogénéités était un bon postulat de départ. Cependant, son utilisation avec des cellules a ses limites : là où la solution de polymérisation ne peut pas diffuser, le milieu de culture ne diffusera pas non plus, induisant une mort cellulaire prématurée.

III. Etude rhéologique : recherche des conditions optimales d'impression

Cette partie a pour objectif de définir la capacité d'un matériau, ici la bio-encre, à être imprimable. L'imprimabilité est dans notre cas défini comme la capacité de la bio-encre à présenter un comportement rhéologique adapté, permettant son dépôt et le maintien de l'objet imprimé, tout en garantissant la survie des cellules contenues dans la bio-encre.

III.1 Imprimabilité, dépôt et maintien de l'objet bioimprimé

Le comportement rhéologique de la bio-encre a été étudié à travers un test de balayage en fréquence (mode dynamique) à contrainte imposée (Figure 60). Celui-ci permet d'étudier le comportement viscoélastique de la bio-encre, au regard de la variation des parties élastiques et visqueuses représenté par le module de conservation (G') et le module de perte (G''), respectivement. Il est important de noter qu'une validation du domaine linéaire fut préalablement réalisée, permettant de définir la valeur de la contrainte imposée.

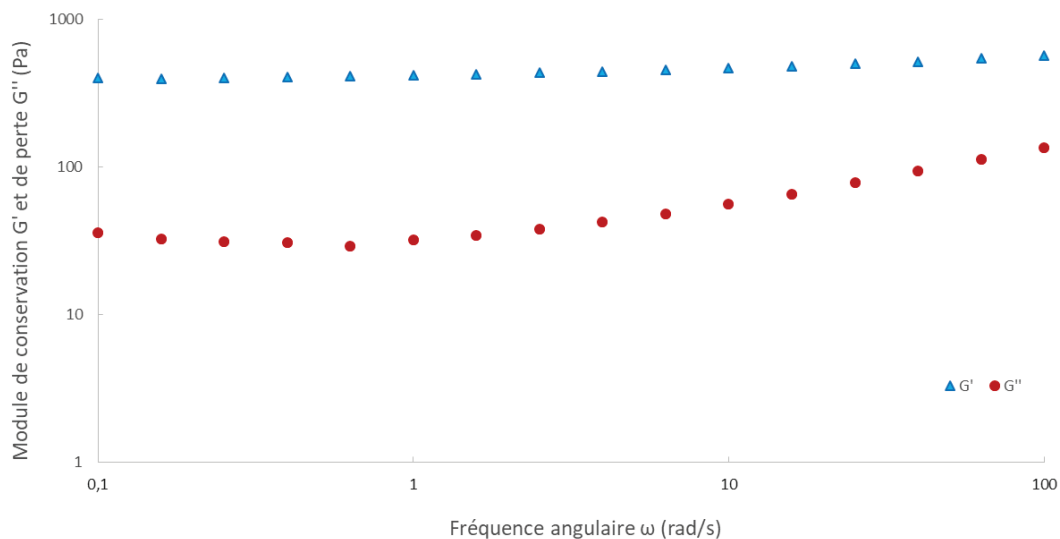


Figure 60. Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' en fonction de la fréquence angulaire ω de la bio-encre à 28°C.

La supériorité de G' sur G'' montre que la partie élastique de la bio-encre prédomine sur la partie visqueuse, ce qui indique que la bio-encre se comporte comme un gel.

A partir de ces mêmes résultats, une autre caractérisation du comportement viscoélastique de notre bio-encre peut-être réalisée au regard de la viscosité complexe en fonction de la fréquence angulaire (Figure 61). Dans ce cas, nous cherchons à savoir si la bio-encre a un comportement newtonien, (la viscosité est indépendante de la fréquence angulaire), un comportement rhéoépaississant (la viscosité augmente avec la fréquence angulaire) ou alors un comportement rhéofluidifiant (la viscosité diminue avec l'augmentation de la fréquence).

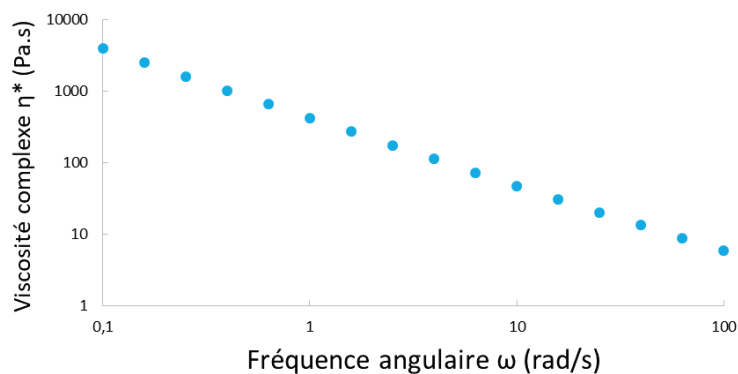


Figure 61. Comportement rhéofluidifiant de la bio-encre à 28°C. Viscosité complexe η^* (Pa.s) en fonction de la fréquence angulaire ω (rad/s).

Les résultats rhéologiques obtenus sur la bio-encre démontrent un comportement rhéofluidifiant, puisque plus la fréquence angulaire ω appliquée augmente, plus la viscosité η^* diminue. C'est un comportement qui va faciliter l'impression 3D puisque la bio-encre (soumise à la pression du piston) se fluidifie lorsqu'elle passera à travers des sections fines telles que la buse. Ce phénomène peut s'expliquer par une réorganisation des chaînes de polymères sous l'effet de la contrainte. Il est important de remarquer que ce comportement est susceptible de diminuer la contrainte de cisaillement subie par les cellules lors du procédé d'impression, et par conséquent, de maximiser leur viabilité après dépôt. Cette capacité sera étudiée dans la partie suivante (III.2).

La dernière étude rhéologique de la bio-encre porte sur la présence ou non d'une contrainte seuil (σ_y). La contrainte seuil (σ_y) est définie comme la pression minimale à exercer sur le matériau pour l'écouler. En dessous de cette valeur, le matériau garde un caractère solide qui s'oppose à l'écoulement.

La contrainte seuil s'obtient classiquement par réponse du taux de cisaillement induit par une contrainte de cisaillement imposée. L'interprétation graphique de la courbe $\dot{\gamma} = f(\sigma_y)$ permet d'accéder à la contrainte seuil à travers l'intersection des tangentes tracées aux faibles et aux fortes contraintes (Figure 62).

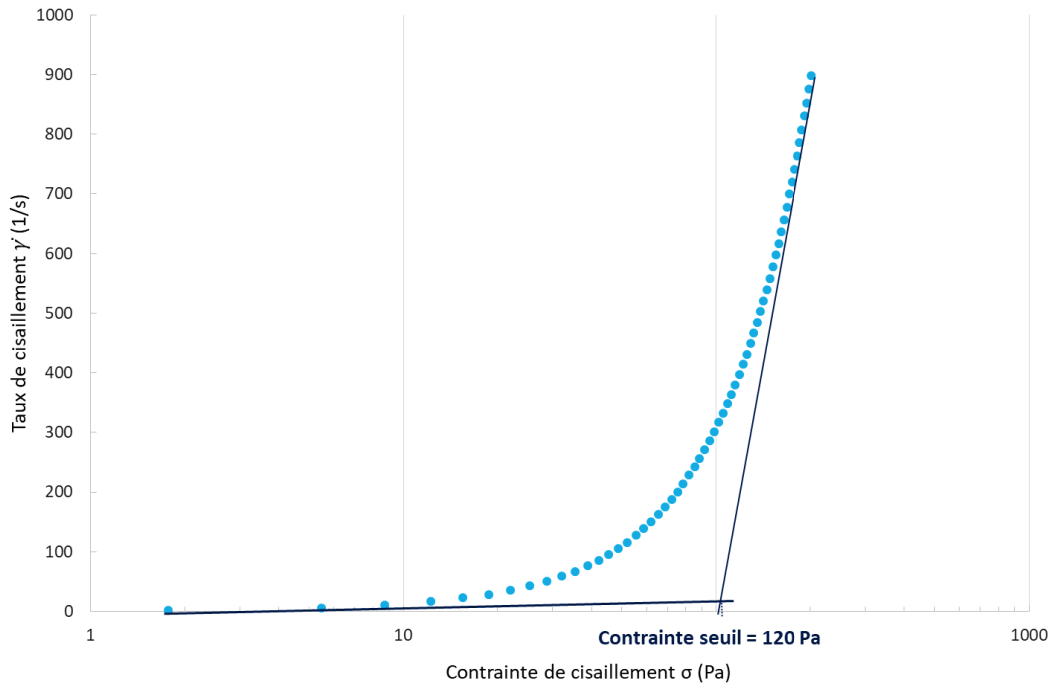


Figure 62. Détermination de la contrainte seuil de la bio-encre à 28°C. Taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ en fonction de la contrainte de cisaillement σ .

La contrainte seuil nous indique la pression à appliquer à la bio-encre pour arriver à l'extruder au moment de l'impression. La présence de cette constante peut aussi être reliée à la pression que peut supporter la bio-encre, c'est-à-dire le nombre de couches capable d'être supporté avant que l'objet imprimé en 3D ne s'effondre.

III.2 Imprimabilité au regard de la survie cellulaire : utilisation du logiciel FlowTips

Après avoir démontré la potentialité de notre bio-encre par l'impression 3D par dépôt, nous allons maintenant nous intéresser à sa capacité de préservation des cellules. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel FlowTips créé par le Dr Courtial de la plateforme 3d.FAB. C'est un logiciel libre d'accès qui nous permet de calculer les contraintes de cisaillement subit par la bio-encre au sein du procédé²⁰⁷. De nombreuses études scientifiques montrent que la contrainte de cisaillement est un paramètre majeur pour expliquer la survie cellulaire lors de

la phase d'impression⁸⁸. Il a notamment été démontré qu'une valeur de contrainte supérieure à 5000 Pa impactait directement la viabilité cellulaire des fibroblastes^{34,38}.

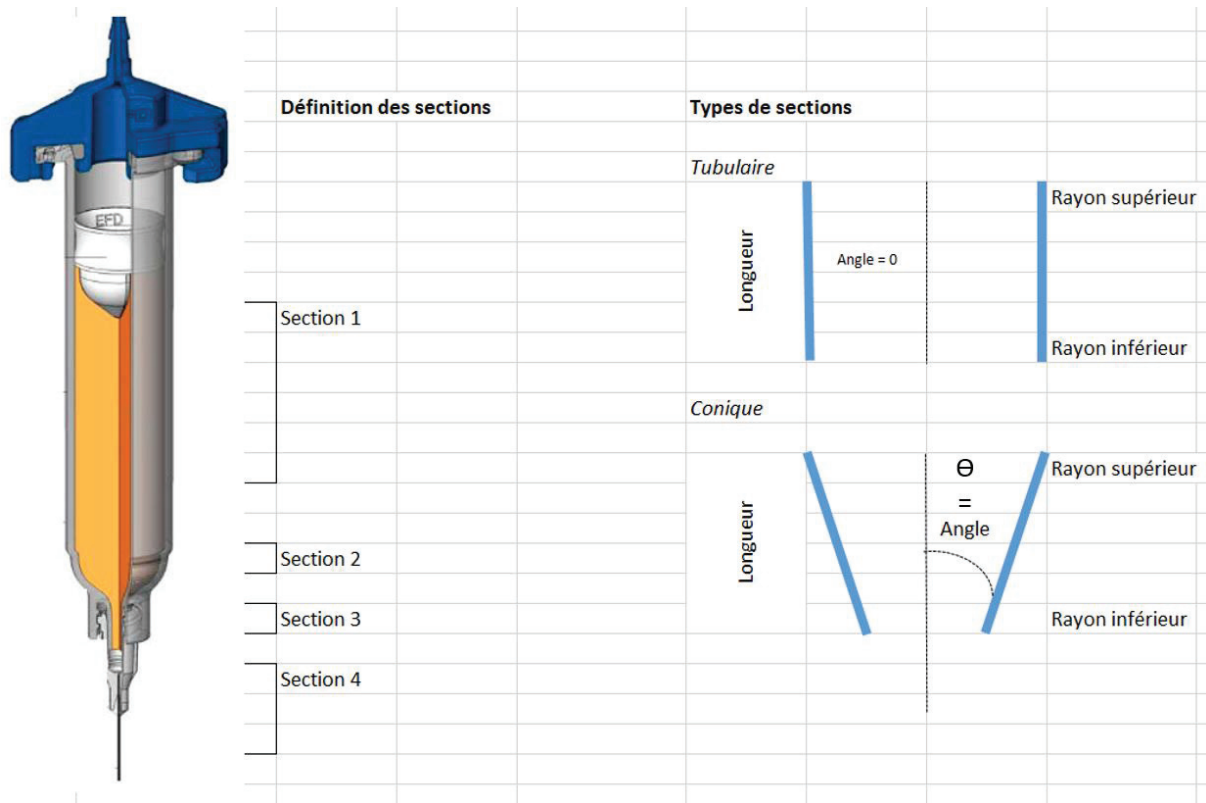


Figure 63. Représentation schématique des différentes sections à l'intérieur d'une seringue Nordson EDF ainsi que les différents types de sections (tubulaire ou conique). (<http://www.nordson.com>).

Pour utiliser le logiciel FlowTips, il est nécessaire de renseigner le rhéogramme de la bio-encre obtenu précédemment (viscosité complexe en fonction de la fréquence angulaire), de déterminer le nombre de section, dans notre cas 4, puis le débit de matière déposé : 117 $\mu\text{L/s}$. Pour chaque section, un ensemble de paramètres géométriques doivent être indiqués comme le rayon (supérieur et inférieur), la longueur et l'angle de réduction Θ (Figure 63). Une fois l'ensemble des paramètres implémentés, le calcul peut être lancé.

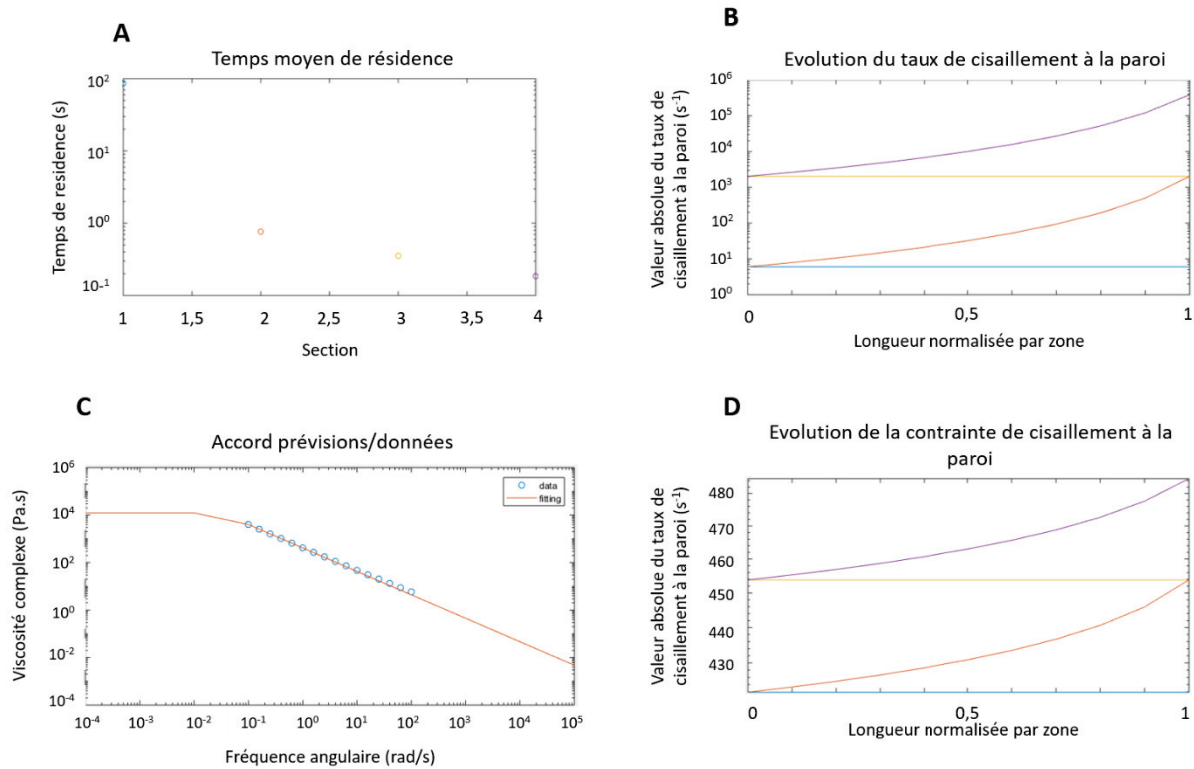


Figure 64. Représentations graphique de A) du temps moyen de résidence (d'une molécule) à l'intérieur de chaque section, B) de l'évolution du taux de cisaillement à proximité des bords de la seringue, C) de l'accord entre la simulation et les données expérimentales, D) de l'évolution de la contrainte de cisaillement à proximité des bords de la seringue.

Dans un premier temps, FlowTips fait apparaître des résultats généraux (Figure 64). La Figure 64-A représente le temps moyen de séjour de la bio-encre en fonction des différentes sections. Ensuite, la Figure 64-B indique l'évolution du taux de cisaillement à proximité de la paroi (de la seringue ou de la buse) où l'on remarque qu'il est le plus important dans la section 4 (buse, courbe violette) et que les sections tubulaires 1 et 3 sont représentées par une droite. La Figure 64-C représente la validation de l'ensemble des résultats à travers la courbe rhéologique précédemment obtenue (cercle bleu). Celle-ci est comparée à une modélisation (courbe orange) basée sur un calcul de rétro-ingénierie qui en cas de concordance, démontre l'exactitude des résultats obtenus. Pour finir, la Figure 64-D, représente l'évolution de la contrainte de cisaillement à la paroi. Dans le cas d'une zone tubulaire, on retrouvera une droite puisque cette contrainte est directement liée au diamètre dans lequel passe la bio-encre : la droite bleue correspondant à la section 1 (corps de seringue) et la droite jaune à la section 3 (de plus petit diamètre avec une contrainte donc plus importante). Dans le cas d'une buse tronconique, la contrainte de cisaillement augmentera progressivement au fur et à mesure que le diamètre diminuera : la courbe orange correspond à la section 2 et la courbe violette correspond à la buse d'extrusion.

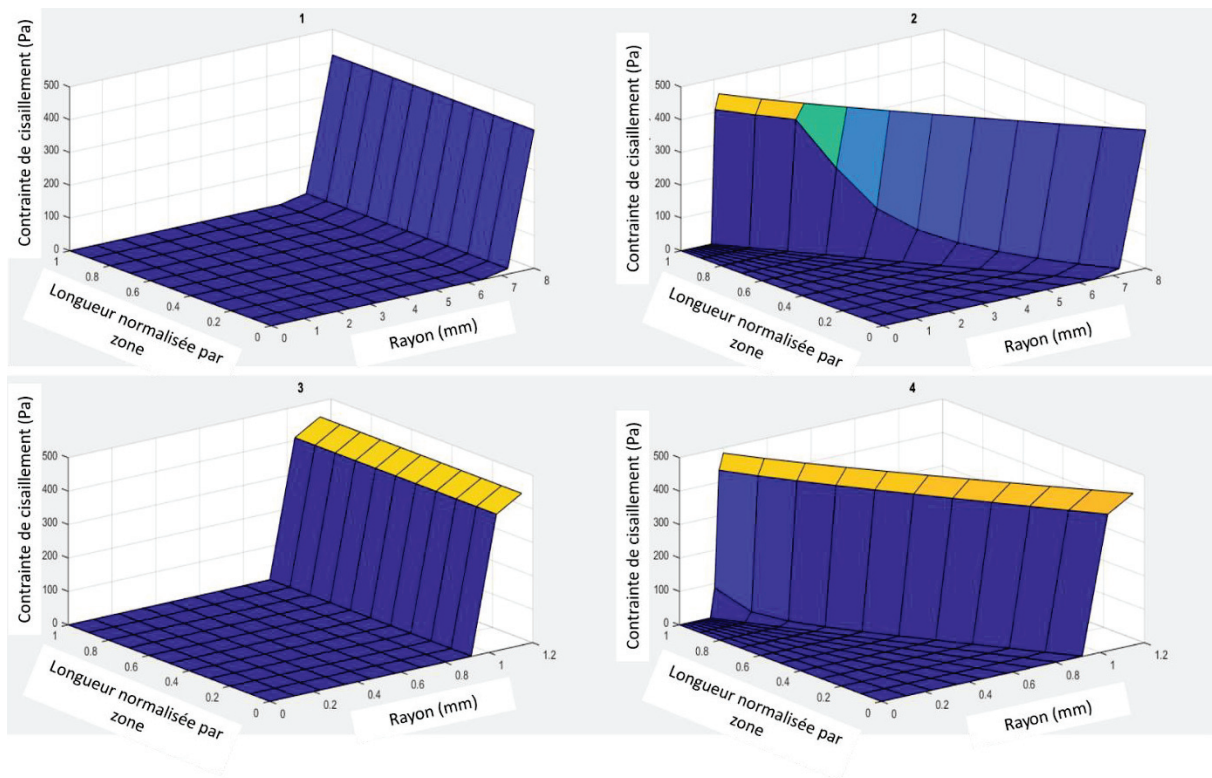


Figure 65. Evolution surfacique de la contrainte de cisaillement subit par la bio-encre ($T = 28^{\circ}\text{C}$, débit : $117 \mu\text{L/s}$) au sein des quatre sections définies dans notre étude.

Premièrement, nous pouvons remarquer sur ces graphiques que la contrainte de cisaillement est maximale à la paroi de chacune des sections. Dans les zones tubulaires (Figure 65-1 et 3), cette valeur de contrainte est constante dans la longueur. Dans les zones tronconiques (Figure 65-2 et 4) la contrainte de cisaillement augmente lorsque le rayon de la section diminue. Dans notre configuration, les contraintes de cisaillement sont maximales dans la section 4 et plus particulièrement à l'extrémité de la buse (500 Pa).

Le logiciel FlowTips permet donc d'anticiper les phénomènes de mort cellulaire. Dans les conditions que nous avons utilisées, l'écoulement de la bio-encre au travers du système de dépôt (seringue, buse) n'est pas dommageable pour les cellules puisque les contraintes maximales restent extrêmement faibles au regard de ce que peuvent subir les cellules avant d'être altérée (500 Pa contre 5000 Pa).

IV. Suivi de viabilité et maturation cellulaire

Afin de pouvoir caractériser et quantifier plus précisément le développement cellulaire des fibroblastes à l'intérieur des cubes tests, plusieurs suivis de viabilité cellulaire ont été

conduits. Tout d'abord avec des tests commerciaux de type live/dead (Kit Live/Dead™ Thermofisher) pour dénombrer les cellules vivantes et les cellules mortes. Un comparatif visuel est ensuite présenté afin d'appréhender la maturation qui est directement reliée aux phénomènes de rétractation grâce à la sécrétion matricielle. Puis, une caractérisation chiffrée avec une numération plus précise des cellules à l'intérieur des cubes a été conduite. Enfin, seront présentés des tests non-destructifs s'appuyant sur la consommation en glucose des cellules et leur production de lactate afin de déterminer leur activité métabolique.

Toutes ces quantifications ont été effectuées sur des cubes de 0,5 cm³ contenant des fibroblastes qui en mûrissant sécrètent leur propre matrice extracellulaire et aboutissent à la formation d'un derme (qui sera caractérisé dans le chapitre 5).

IV.1 Viabilité cellulaire

Afin d'avoir une première idée de la mortalité cellulaire pendant l'étape de bioimpression de nos premiers cubes tests, des tests commerciaux bicomposants ont été utilisés :

- Les cellules vivantes se distinguent par la présence d'une activité estérase intracellulaire qui va être déterminée par la conversion enzymatique de la calcéine AM (AM= acétoxyméthyle) (non fluorescente), en calcéine fluorescente verte.
- Les cellules mortes sont identifiées grâce à l'iodure de propidium qui ne pénètre que dans les cellules présentant des membranes endommagées. En effet, les membranes cellulaires intactes sont imperméables à cette molécule. Dans ces cellules mortes la fluorescence rouge est générée lors de la liaison de l'iodure de propidium à l'ADN génomique.

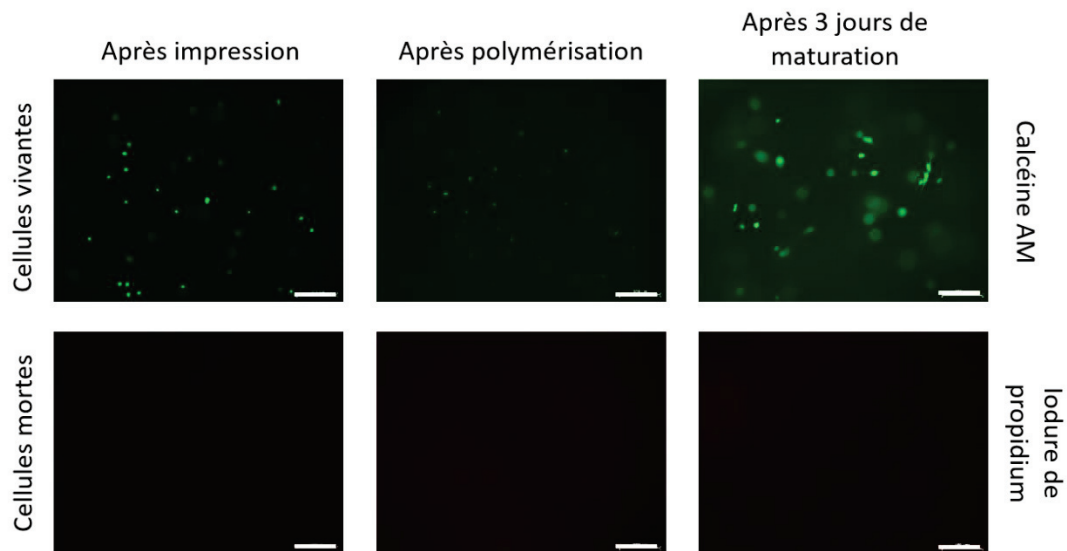


Figure 66. Observation par microscopie de fluorescence des cellules vivantes et mortes après l'impression, après la polymérisation et après 3 jours de maturation. Barre d'échelle : 200 μm .

Après l'étape d'impression (Figure 66), les cellules vivantes et vertes semblent être réparties de manière homogène dans le cube test. De plus, il n'a pas été détecté de cellules mortes dans la bio-encre par le biais de cette méthode.

Après l'étape de polymérisation (Figure 66), les cellules vivantes ont une intensité moins importante, ce qui peut s'expliquer soit par une diffusion de la calcéine dans le cube pendant la durée de la polymérisation, soit par une opacification du cube dû notamment à la transformation de fibrinogène en fibrine. De même que précédemment, il n'a pas été détecté de cellules mortes dans le cube après l'étape de polymérisation.

Après un nouveau marquage réalisé après 3 jours de maturation (Figure 66), les cellules vivantes s'accrochent par le biais de pseudopodes aux composants de la bio-encre et notamment la fibrine. L'absence de détection de cellules mortes indique que le procédé mis en place pour la bioimpression des cubes n'est pas dommageable pour les cellules.

IV.2 Rétractation

Pendant la phase de maturation, les fibroblastes sécrètent leur propre matrice extracellulaire (caractérisée dans le chapitre 5). Comme vu précédemment (chapitre 1), l'organisation des fibrilles de tropocollagène en fibres de collagène provoque une traction⁷⁶ à l'intérieur du cube. La conséquence directe est la rétractation de l'hydrogel contenant des

fibroblastes. Les cubes tests après impression ont des dimensions bien connues qui sont celles données par leur dessin en 3D de 1 x 1 x 0,5 cm. Après 21 jours de maturation et avec une simple observation visuelle, la rétractation est évidente et la mesure (à l'aide d'une règle graduée) indique 0,6 cm par côté, autrement dit une perte de 40 % de taille initiale (Figure 67). Cette réduction de taille indique par contrôle visuel la formation d'un tissu avec une sécrétion matricielle importante ce qui est un excellent indicateur de la maturation tissulaire.

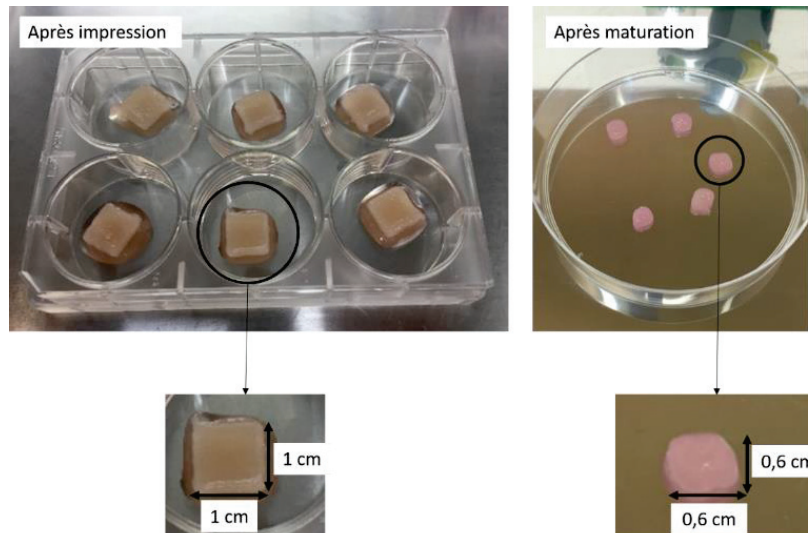


Figure 67. Comparaison de la taille des cubes bioimprimés après l'étape de bioimpression et après une maturation de 21 jours.

IV.3 Courbe de croissance

L'objectif de ce suivi de croissance est de pouvoir quantifier, grâce à une numération précise, la prolifération des fibroblastes dans un cube bioimprimé. La première problématique vient de la dissociation des cubes qui doit être complète sans endommager les cellules. Afin de minimiser l'impact de cette dissociation sur la viabilité cellulaire, qui sera par la suite évaluée grâce au bleu Trypan (permettant l'identification des cellules mortes par pénétration dans la cellule morte d'un colorant azoïque), le protocole établi utilise deux enzymes avec chacune un rôle bien défini (chapitre 2) :

- La trypsine qui détache les cellules de leur matrice extracellulaire par clivage de leurs protéines membranaires d'adhérence,
- La collagénase qui a pour action la réduction de la taille des fibres de collagène synthétisées par les fibroblastes.

L'évolution de la croissance cellulaire est représentée par le nombre de cellules par cube de tissu dissocié.

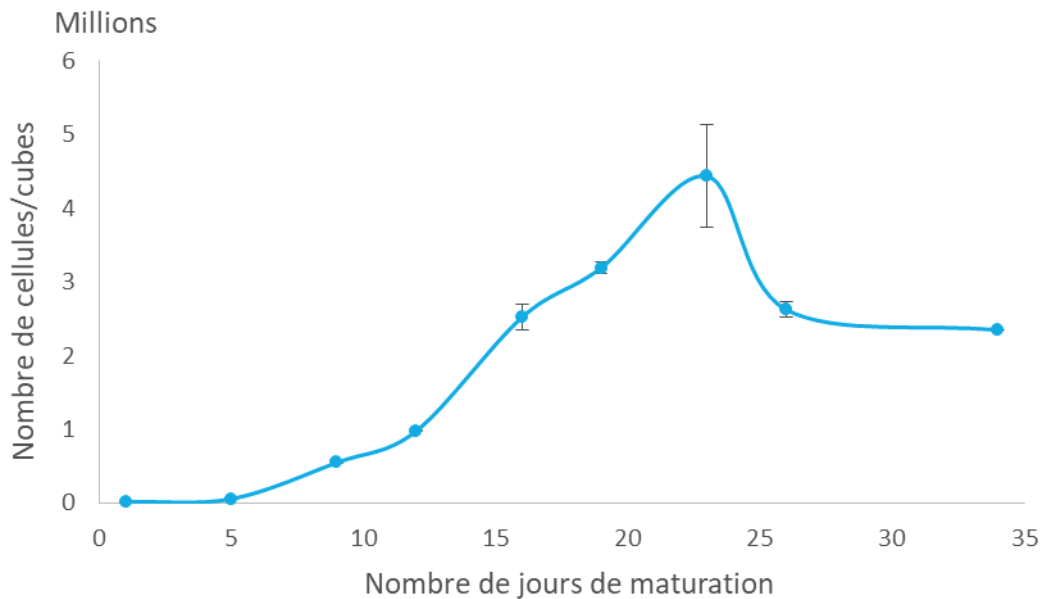


Figure 68. Evaluation de la croissance cellulaire exprimée en nombre cellulaire par cube de derme bioimprimé. (n=3).

Sur ce graphique, plusieurs phases peuvent être identifiées :

- De 0 à 5 jours, où la croissance cellulaire semble faible, la vitesse de croissance cellulaire est de $9,7 \cdot 10^3$ cellules/jours. Les fibroblastes fraîchement bioimprimés possèdent une phase de latence qui correspond au moment à partir duquel ils adhèrent à la bio-encre avant de pouvoir proliférer. Cette phase en condition classique 2D est de 4 jours (après trypsination par exemple), ici dans un environnement tridimensionnel sa durée semble être du même ordre de grandeur.
- De 6 à 23 jours, une forte prolifération cellulaire est mise en évidence avec une population cellulaire qui atteint $4,5 \cdot 10^6$ cellules/cubes et une vitesse de croissance de $2,4 \cdot 10^5$ cellules/jours.
- De 24 à 35 jours, une diminution de la quantité de cellules est observable avec une vitesse de croissance négative, $-3,5 \cdot 10^5$ cellules/jours, ce qui indique un arrêt de la croissance et plusieurs hypothèses sont envisagées. La première est que la sécrétion matricielle reliée directement à la rétractation importante (50 %) après 24 jours de culture induit une mort cellulaire en emprisonnant les cellules dans un réseau plus hermétique dans lequel les nutriments et les gaz diffusent de manière moins efficace. La deuxième hypothèse porte sur une mort prématurée due à une étape

supplémentaire dans le protocole de dissociation. Cette étape supplémentaire a été nécessaire afin d'obtenir des agrégats de tailles équivalentes aux jours de maturation précédents. La troisième hypothèse la plus probable concerne le cycle de croissance cellulaire. En 2D comme en 3D, les cellules sont soumises après une phase de croissance, à une phase dite stationnaire pendant laquelle les cellules arrêtent de se diviser lorsqu'elles sont arrivées à confluence, c'est ce qu'on appelle l'inhibition de contact.

Cette courbe de croissance nous indique des chiffres précis sur la vitesse et la prolifération cellulaire à l'intérieur d'un cube. Au départ, il y a 16 000 cellules par cube en moyenne, la population cellulaire atteint 1 million de cellules par cube après 12 jours de maturation, soit une multiplication de la population par 63.

IV.4 Dosage enzymatique par spectrophotométrie

Pour la maîtrise de la maturation des tissus, il est nécessaire de déterminer les paramètres qui influencent les mécanismes biologiques, tel que la prolifération cellulaire (grâce aux courbes de croissance), la production de matrice extracellulaire (grâce à l'histologie). Dans cette partie seront présentées l'évolution de la concentration en glucose et en lactate dans le milieu de culture par dosage enzymatique. Ces deux métabolites sont des indicateurs importants de la croissance et de l'efficacité du métabolisme cellulaire.

L'objectif de ces dosages est de quantifier la consommation de glucose par les cellules et leur production de lactate. La mise en place de ce suivi permettrait de s'assurer que la croissance et la maturation du tissu se déroule de manière physiologique, sans nécessité de destruction des cubes. Et à plus long terme, ce protocole pourrait être étendu lors de l'usage d'un bioréacteur dans lequel il y a une impossibilité de prélèvement en ligne.

IV.4.1 Suivi de la consommation du glucose

Le glucose est l'une des principales sources de carbone et d'énergie de la cellule. Afin de suivre sa consommation par les cellules, un kit (GLUCOSE GOD-PAP, Biolabo) de dosage quantitatif est utilisé. Un échantillon (2 mL) de milieu de culture dans lequel mature le tissu

bioimprimé est prélevé tous les quatre jours (avant le changement complet de milieu, chapitre 2), afin de quantifier le glucose potentiellement consommé par les cellules en quatre jours.

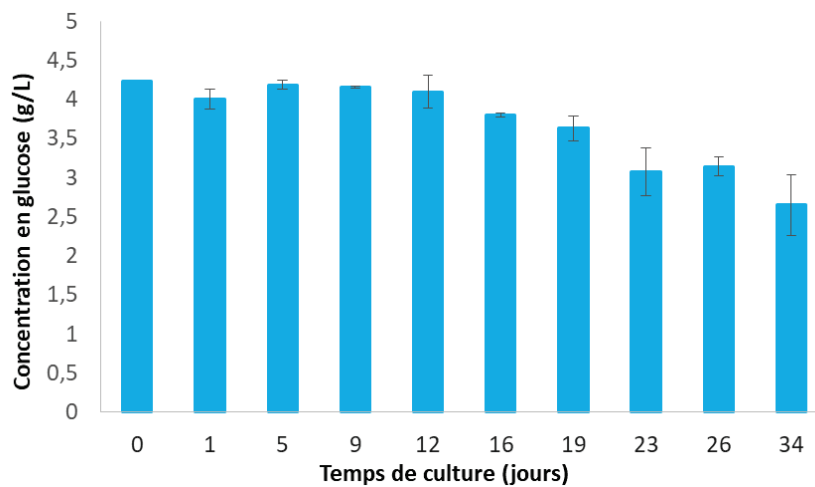


Figure 69. Représentation graphique de l'évolution de la concentration en glucose dans le milieu de culture d'un derme bioimprimé en fonction du temps (n=3).

La concentration initiale en glucose du milieu est de 4,5 g/L de glucose, et chaque cube est immergé dans 5 mL de milieu. Comme attendu, la concentration de glucose baisse au cours du temps et ce malgré des changements de milieu réguliers. La consommation sur la première semaine est peu visible, ce qui peut poser problème pour l'utilisation de ce test si les résultats sont attendus à court terme. Pour une utilisation de ce test sans changement de milieu, la diminution devrait être plus flagrante.

L'objectif final est l'intégration de prélèvements réguliers (mais sans renouvellement total du milieu) lors de la culture en bioréacteur afin de surveiller la croissance cellulaire par le biais de la composition du milieu de culture. Il faudra alors bien étudier la proportion de milieu de culture en fonction de la concentration cellulaire du tissu en maturation. Si ces proportions sont mal ajustées, les baisses de glucose seraient alors indétectables.

IV.4.2 Suivi de la production de lactate

Le milieu de culture a aussi permis de quantifier la production de lactate par les cellules. Le suivi de ce deuxième métabolite est un indicateur du maintien des cellules dans un environnement physiologique et sans induction de stress. Afin de suivre la production de lactate, un kit de dosage (L-Lactic Acid Assay Kit, Megazyme) est utilisé.

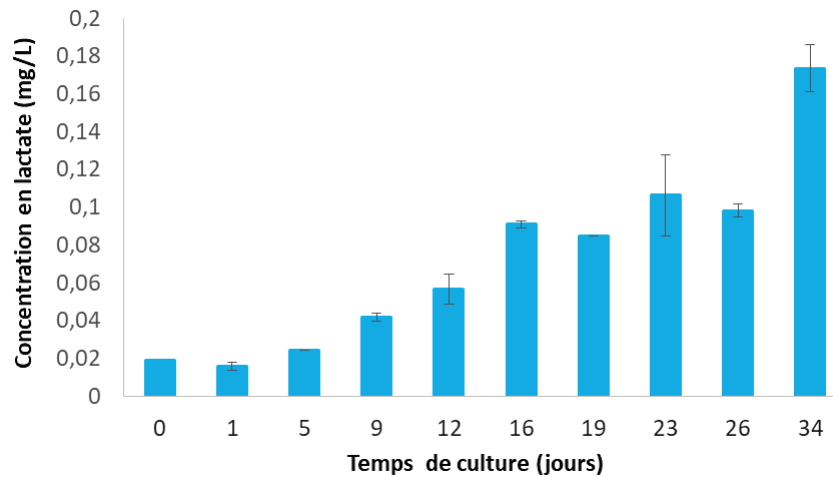


Figure 70. Représentation graphique de la production de lactate par les derms bioimprimés en fonction du temps de maturation des tissus (n=3).

La concentration initiale en lactate dans le milieu est proche de 0 et comme attendu. Une augmentation de la production de lactate est observable et quantifiable grâce à des prélèvements (2 mL) tous les quatre jours (suivis d'un changement de milieu). La production de lactate de plus en plus rapide, est corrélée à l'augmentation de la concentration de cellules dans un cube.

Comme pour le glucose, l'augmentation de lactate dans le milieu de culture est un bon indicateur du métabolisme cellulaire. L'utilisation de ce dosage permet de la relier directement à la croissance cellulaire sans avoir besoin de détruire le cube.

Le suivi de ces deux métabolites permet d'obtenir une indication générale du comportement des cellules. Malgré des changements de milieu réguliers, les évolutions sont détectables. La tendance de la courbe de croissance cellulaire est directement reliée à la diminution de la concentration du glucose et à l'augmentation de la concentration de lactate dans le milieu de culture. Ces différentes variations de concentrations sont de plus en plus importantes ce qui signifie que la consommation de glucose et la production de lactate deviennent plus rapide avec des temps de maturation plus long.

V. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié les étapes clés de la formulation définitive de la bio-encre utilisée pour la bioimpression de tissus. L'ajout de motifs d'adhérence grâce au fibrinogène a permis l'obtention d'une bio-encre répondant aux critères de biocompatibilité, de maintien de la viabilité cellulaire et de support pour la formation d'un réseau cellulaire en trois dimensions. Cette dernière a été caractérisée par rhéologie afin de déterminer si le procédé de bioimpression ne présentait pas de contraintes de cisaillement trop importantes pour les cellules en risquant de les endommager. Un inhibiteur de thrombine a été à l'étude pour envisager la bioimpression de structures plus épaisses (supérieure à 1 cm). Un suivi de la croissance cellulaire a été réalisé par destruction des cubes suivi d'une numération cellulaire avec la création d'un protocole dédié. Enfin, deux dosages enzymatiques ont été utilisés afin de contrôler de manière indirecte mais non-destructive, la consommation par les cellules de glucose et leur production de lactate. Cette dernière approche est à relier à l'utilisation d'un bioréacteur pour lequel la méthode de destruction des cubes n'est pas envisageable. Ces dosages constituent une alternative satisfaisante afin de caractériser la croissance cellulaire.

CHAPITRE 4 : ELABORATION D'UNE BIOIMPRIMANTE

Les besoins en ingénierie tissulaire ne se limitent plus à la seule compréhension des mécanismes cellulaires mais à une vision beaucoup plus globale de la régénération d'un organe entier. Les exigences se concentrent sur l'inclusion de plusieurs types cellulaires ainsi que de plusieurs biomatériaux différents, avec des dimensions centimétriques (ordre de grandeur d'un organe complet), tout en prenant en compte la logistique d'une maturation post-impression ajustable en fonction de l'organe ou du tissu visé. La bioimpression 3D offre ainsi de nouvelles voies de recherches innovantes pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, le coût des bioimprimantes au commencement de ce travail était un frein à l'utilisation exploratoire de la bioimpression dans le cadre de recherches préliminaires de preuve de concept. Les offres technologiques concernant la bioextrusion se limitaient à des systèmes de pousse-seringues montés sur une structure se déplaçant suivant des coordonnées cartésiennes.

Ce chapitre a pour but de présenter l'évolution technologique que nous avons apporté à une imprimante 3D FDM pour arriver jusqu'à une bioimprimante 3D permettant l'impression de plusieurs types cellulaires associés à leurs bio-encre respectives. Le point de départ a été d'adapter une technologie open-source (impression 3D de plastique PLA) à la bioimpression pour permettre l'inclusion de composants vivants, grâce au développement d'une machine ayant un coût de quelques centaines d'euros. Après de nombreuses preuves de concept, nous avons fait évoluer le cahier des charges de notre premier prototype V1 pour arriver à une version V2recherche. Cette dernière a été légèrement modifiée afin de répondre à des problématiques de production de peau *in vitro* chez LabSkin Creations (V3prod). La dernière évolution technologique s'est faite grâce à l'acquisition d'un bras robotique 6 axes qui nous a permis d'effectuer des bioimpressions sur des surfaces complexes

I. Transformation d'une imprimante FDM plastique en une bioimprimante V1

La problématique à laquelle nous avons essayé de répondre, en commençant à travailler sur cette nouvelle thématique qu'est la bioimpression 3D, est l'acquisition d'une bioimprimante 3D. Début 2015, aucune machine ne répondait à tous nos critères. La technologie n'était encore pas assez mature, et deux verrous avaient été identifiés : des bioimprimantes très onéreuses (Tableau 7) et des contraintes au niveau de la propriété intellectuelle. Ces contraintes concernent plusieurs points critiques :

- Les logiciels propriétaires très peu flexibles, ce qui nous a poussé à utiliser des logiciels libres de droits (= open-source),
- La conception « fermée » des machines alors que nous voulions justement pouvoir apporter librement tous types de modifications possibles (ajout d'une seringue supplémentaire par exemple).

Tableau 7. Liste des entreprises utilisant des bioimprimantes avec une technologie de bioextrusion en 2015.

Entreprise	Nom de la machine	Matériaux utilisables	Développement principal	Prix
Organovo	NovoGen MMX™	Hydrogels cellularisés	Bioimpression de cellules rénales pour l'industrie pharmaceutique	Non commercialisée
3D Bioprinting Solutions	FABION	Hydrogels et sphéroïdes	Bioimpression de tissu thyroïdien	Non commercialisée
RegenHU	3D Discovery 3D Biofactory	Bio-encres propriétaires	Développement technologique pour la bioimpression d'hydrogels cellularisés	200 000 \$
EnvisionTEC	3D Bioplotter	Hydrogels, silicone, hydroxyapatite	Scaffold pour les tissus osseux	200 000 \$
Aspect Biosystem	BioAssemblyBot®	Thermoplastiques Hydrogels Silice	Bras robotique multi-axes	200 000 €
Allevi (Biobot)	Biobot	Hydrogels cellularisés	Bioimprimante de « bureau »	10 000 \$
Ourobotics	Revolution 3D printer	Hydrogels	Multiplés têtes d'extrusion	12 500 €
Cellink	Inkredible	Leur propre bio-encre	Bioimprimante de « bureau »	10 000 €

*Données obtenues grâce au rapport sur l'impression 3D : porte d'entrée dans l'industrie du 21^{ème} siècle (<http://www.boostzone.fr/wp-content/uploads/2015/09/impression-3d-etude-1509.pdf>).

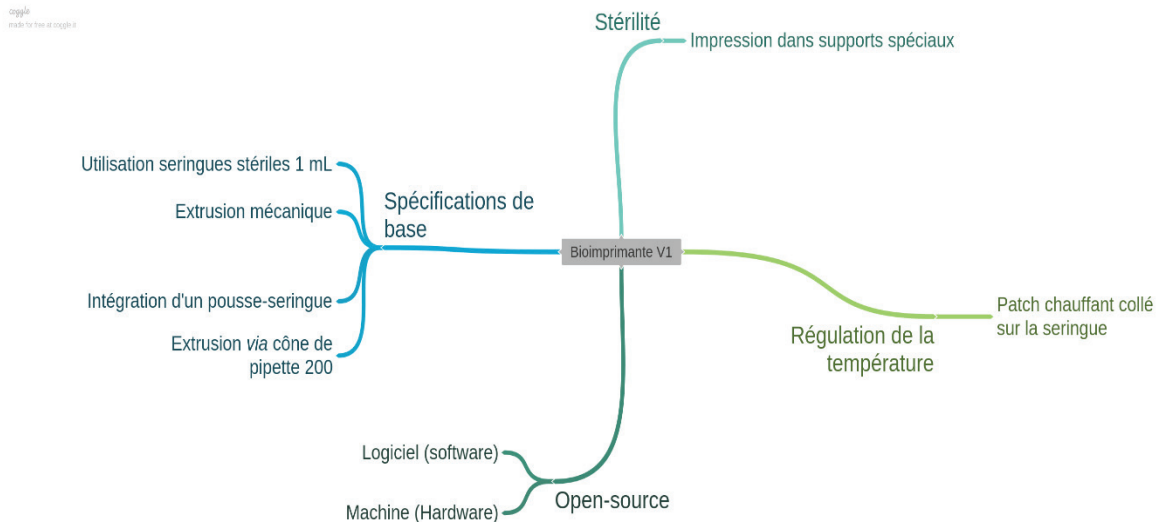


Figure 71. Carte mentale des spécifications de la bioimprimante V1.

Il a été rapidement décidé, plutôt que de faire l'acquisition d'une machine commerciale, que nous allions apporter des modifications sur l'imprimante 3D T2 commercialisée par Tobeca®. Une fois le cahier des charges établi (Figure 71), l'objectif principal fixé a été d'imprimer des cellules dans un hydrogel grâce à une bioimprimante open-source. Toutes les validations de performances de la bioimprimante ont été confirmées par la survie des cellules juste après l'impression, puis grâce au suivi de la fluorescence des cellules imprimées pendant le temps de leur maturation. Le développement d'un réseau cellulaire en 3D et une synthèse matricielle confirmée par histologie étaient les cibles privilégiées pour la validation des performances de notre imprimante (Chapitre 3).

I.1 Construction 3D d'un pousse-seringue

La première étape a été de substituer l'extrudeur plastique par un système compatible avec l'utilisation de biomatériaux et du matériel cellulaire. Un pousse-seringue sur-mesure (Figure 72) a été conçu puis imprimé en 3D grâce à une autre imprimante 3D Tobeca®. Il fonctionne grâce à un moteur pas à pas (NEMA 17). De manière simplifiée, le schéma de commande se déroule en plusieurs étapes :

- L'écriture du Gcode par le programme Repetier (position des axes, température de consigne, déplacements et vitesse),

- La carte Arduino (microcontrôleur) transforme ce Gcode en impulsion électrique,
- Le moteur pas à pas traduit cette impulsion électrique en mouvement angulaire (pas/min),
- Ce mouvement angulaire actionne la vis sans fin, ce qui va avoir pour résultat de pousser le piston de la seringue et d'extruder la matière sur le plateau d'impression.

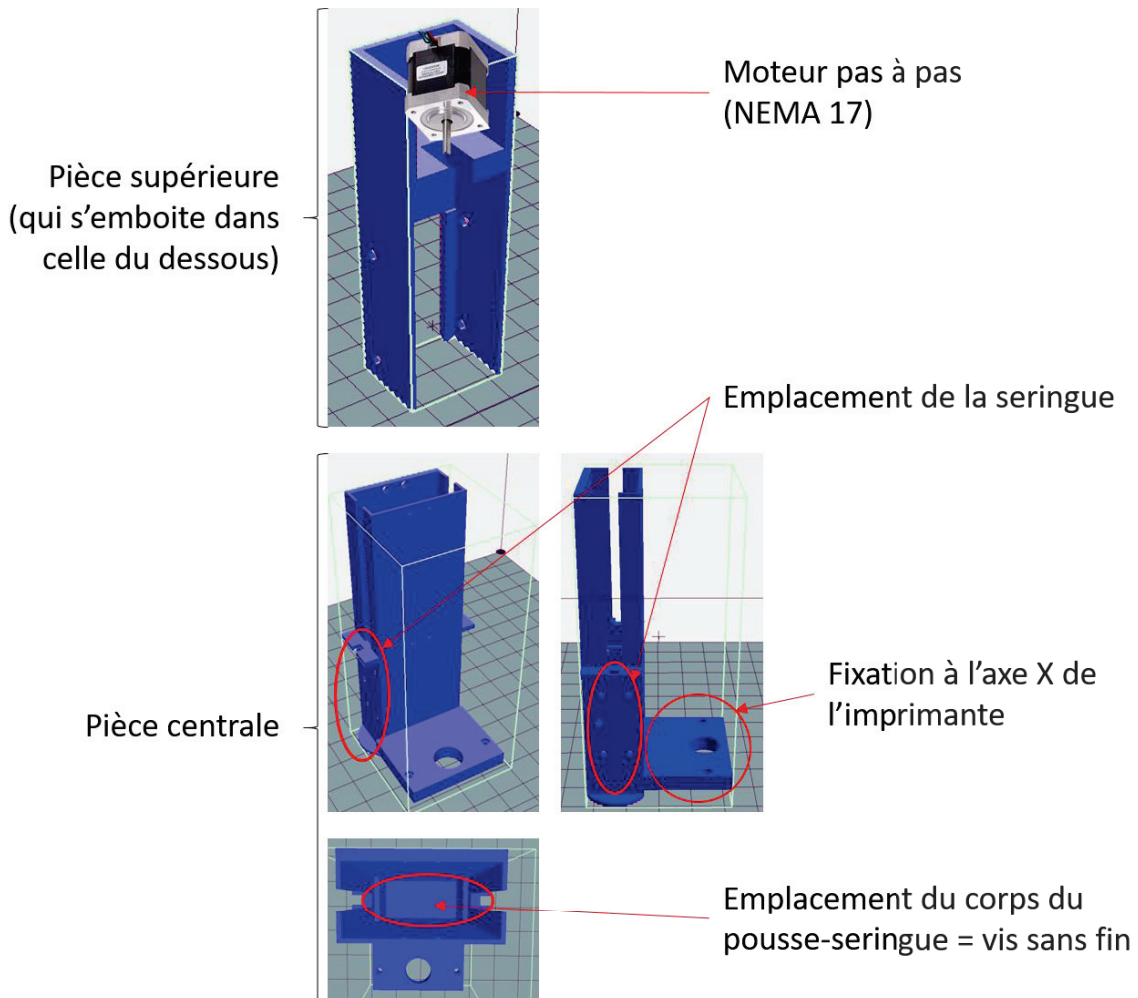


Figure 72. Schéma représentant, sous différents angles, la conception du pousse-seringue avant impression.

Un patch chauffant permettant la régulation de la température à l'intérieur de la seringue a lui aussi été installé et relié au circuit de chauffage de l'extrudeur. Ce dernier fonctionne grâce à un correcteur PID (= Proportionnel, Intégral, Dérivé) qui est un système de contrôle permettant d'améliorer les performances d'un asservissement. En automatique, l'asservissement est un système dont le but est d'atteindre le plus vite possible sa valeur de

consigne, en imposant un dépassement autorisé, et de la maintenir quelles que soient les perturbations externes. La réponse, qui dépend de la précision des capteurs de température, peut être représentée par une courbe qui suit (Figure 73) :

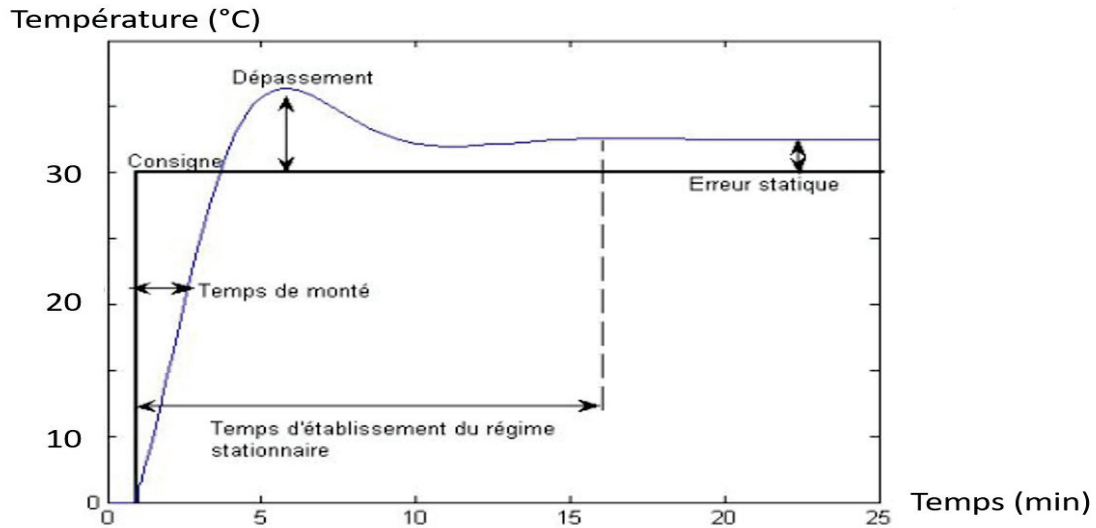


Figure 73. Courbe représentant l'évolution de la température en fonction du temps lors de la régulation PID du patch chauffant.

Une fois le pousse-seringue imprimé, il a été fixé sur l'axe X de l'imprimante. Le patch chauffant a ainsi pu être installé à son tour pour donner la version finale du prototype V1 (Figure 74).

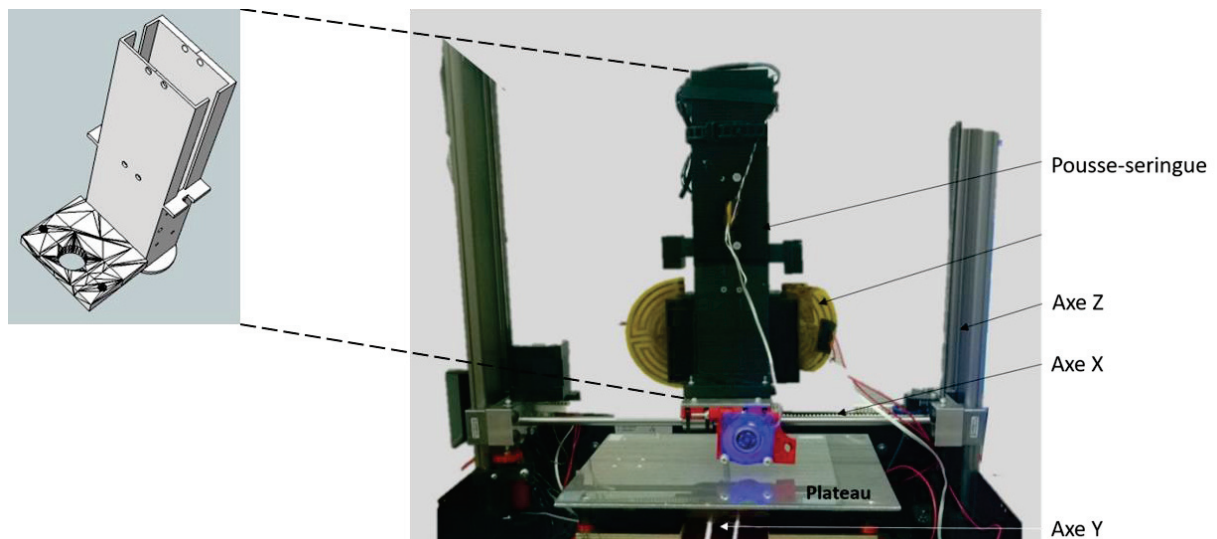


Figure 74. Photo du montage final. A gauche : image en 3D du pousse-seringue conçu sur SketchUp avant impression et à droite : son montage final sur le prototype V1 de la bioimprimante.

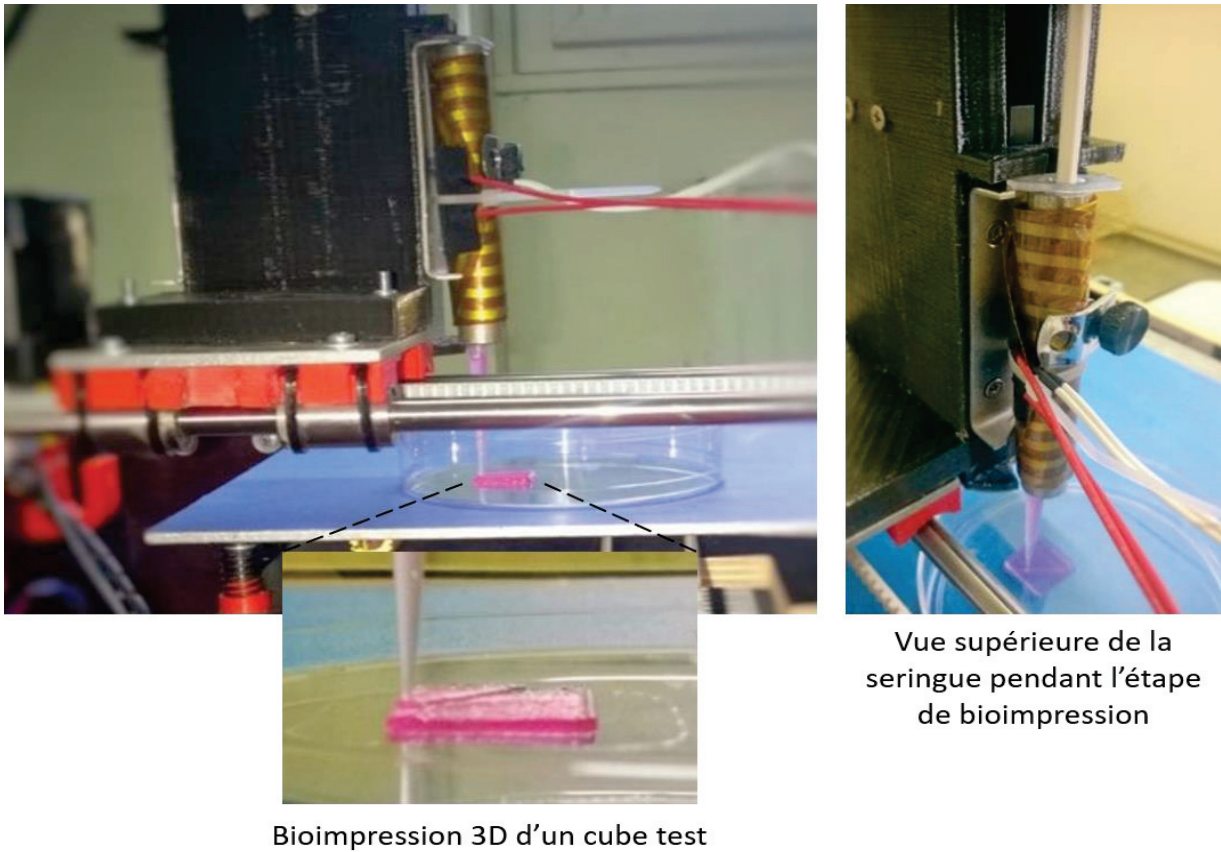


Figure 75. Photo de la bioimprimante pendant la bioimpression 3D d'un cube test.

Ce premier prototype V1 a été testé grâce à la bio-encre afin d'imprimer des cubes tests, ensuite mis en culture (Figure 75). Plusieurs tests de viabilité cellulaire (Chapitre 3) ont révélé qu'il n'y avait pas de mort cellulaire due à l'impression. Puis le réseau cellulaire se développant en 5 jours, il a été conclu, dans un premier temps, que le procédé n'entravait pas la survie cellulaire sur le long terme (Figure 76).

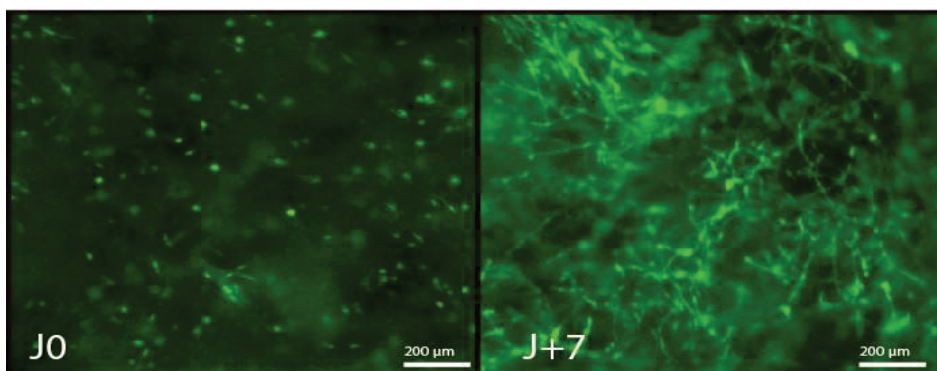


Figure 76. Image par microscopie optique de fibroblastes fluorescents (NIH 3T3 eGFP) juste après la bioimpression et 7 jours plus tard.

1.2 Construction d'un double extrudeur

De nombreuses publications utilisent un double extrudeur dans le but d'imprimer les biomatériaux et les cellules conjointement mais de préparer les seringues séparément^{52,208}. L'objectif étant d'obtenir une incorporation de cellule homogène dans les biomatériaux, au moment du dépôt.

Des impressions ont été testées sur ce principe de co-extrusion avec d'un côté un mélange de biomatériaux et de l'autre les cellules en suspension afin d'avoir un dépôt précis de celles-ci. Un double extrudeur (jaune) a été imprimé en 3D dans une résine acrylate photopolymérisable (Figure 77). Le procédé consiste à injecter dans le même temps le mélange de biomatériaux et les cellules pour que ces dernières se retrouvent associées aux biomatériaux au moment de l'impression.

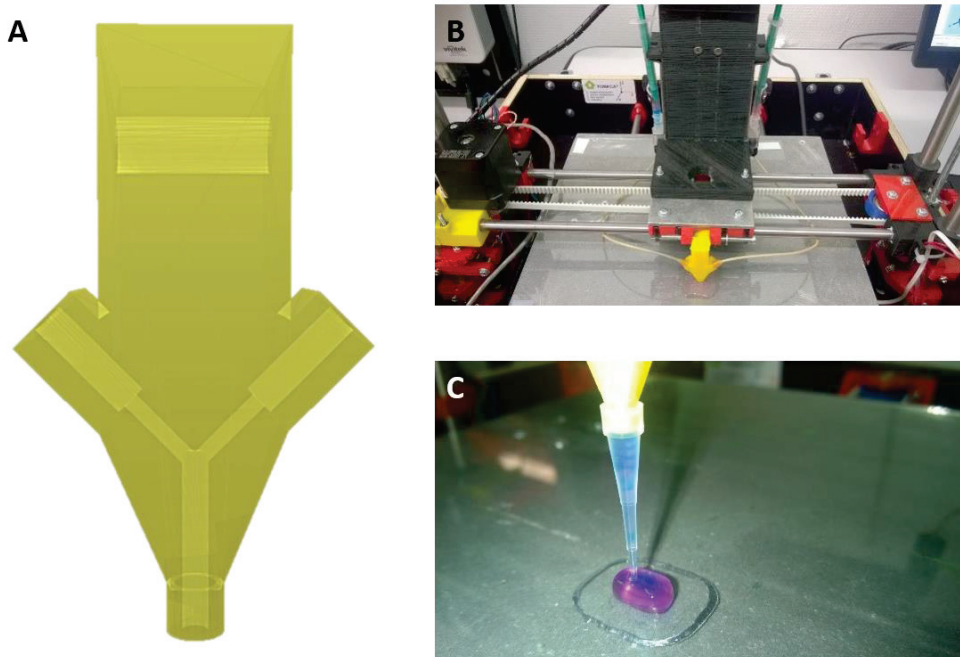


Figure 77. A) Dessin en 3D du double extrudeur avant son impression 3D. B) Photographie de la première version du double extrudeur monté sur le prototype V1 de la bioimprimante. C) Photographie durant une bioimpression à l'aide du double extrudeur.

Cette première version du double extrudeur permet l'impression d'un hydrogel mais celui-ci n'est pas homogène. De plus, le volume mort à l'intérieur de l'extrudeur est très important (au moins 1 mL), ce qui ne permet l'impression que d'un seul objet par expérimentation (les seringues utilisées pour cette manipulation sont des seringues de 1 mL).

I.3 Caractéristiques de la bioimprimante V1

Les caractéristiques principales de ce premier prototype V1 sont intrinsèquement liées à celles de la machine 3D FDM, avec :

- Une résolution des différents axes : 15 μm ,
- Une vitesse d'impression maximale : 200 mm/s,
- Un volume d'impression maximal : 20 x 20 x 25 cm,
- Plateau chauffant : température ambiante jusqu'à 90°C

Les caractéristiques que nous avons apportées grâce aux modifications sont inhérentes aux composants ajoutés :

- Un contrôle de la température grâce à un patch chauffant collé sur la seringue (plage de température : ambiante jusqu'à 70°C),
- Des consommables standards utilisés en culture cellulaire tels qu'une seringue stérile et des cônes de pipette (P200).

I.4 Limitations et solutions

La limitation principale de ce premier prototype V1 est l'absence d'enceinte close, ce qui rend la thermorégulation difficile et amène l'impossibilité d'imprimer dans des conditions stériles. Ensuite, le développement en parallèle d'une bio-encre thermosensible complique son utilisation avec ce prototype. Le contrôle de température, au moment du dépôt sur le plateau, est crucial si l'on veut conserver une bonne définition de l'objet. De plus, les matériaux de fabrication de cette machine, sont peu compatibles avec les exigences de l'utilisation de cellules. Le bois est difficilement nettoyable et les poussières s'accumulent et s'accrochent dans les nombreux recoins. Enfin, le pousse-seringue a été conçu pour des diamètres de seringues faibles (1mL) mais le protocole de préparation évoluant, le besoin d'utiliser des volumes plus importants (8mL) est apparu.

Dans le Tableau 8, sont résumées les limitations rencontrées avec V1 ainsi que les solutions à apporter sur le prochain prototype.

Tableau 8. Récapitulatif des limitations rencontrées avec cette version 1 et les solutions technologiques à mettre en place.

Limitations rencontrées sur V1	Solutions à apporter
Pas de thermorégulation de l'atmosphère	Enceinte thermostaté
Pas de possibilité d'imprimer en conditions stériles	+ Moyen de stérilisation entre chaque impression
Difficulté de contrôle de la bioimpression de biomatériaux thermosensibles	Plateau thermostaté : 4°C à 90°C
Matériaux de fabrication peu compatibles avec la culture cellulaire (bois)	Matériaux Inox ou de grades médicaux facilement stérilisables
Impossibilité de faire varier le volume des seringues (1mL)	Changer la configuration du pousse-seringue

II. Evolution du cahier des charges et prototype V2recherche.

Les capacités du prototype V1 même limitées, nous ont permis d'obtenir de solides preuves de concept (Chapitre 3). C'est pourquoi, rapidement, les attentes technologiques nous ont poussées à faire évoluer le cahier des charges afin de développer, en partenariat avec l'entreprise Tobeca®, un nouveau prototype V2recherche destiné à la recherche.

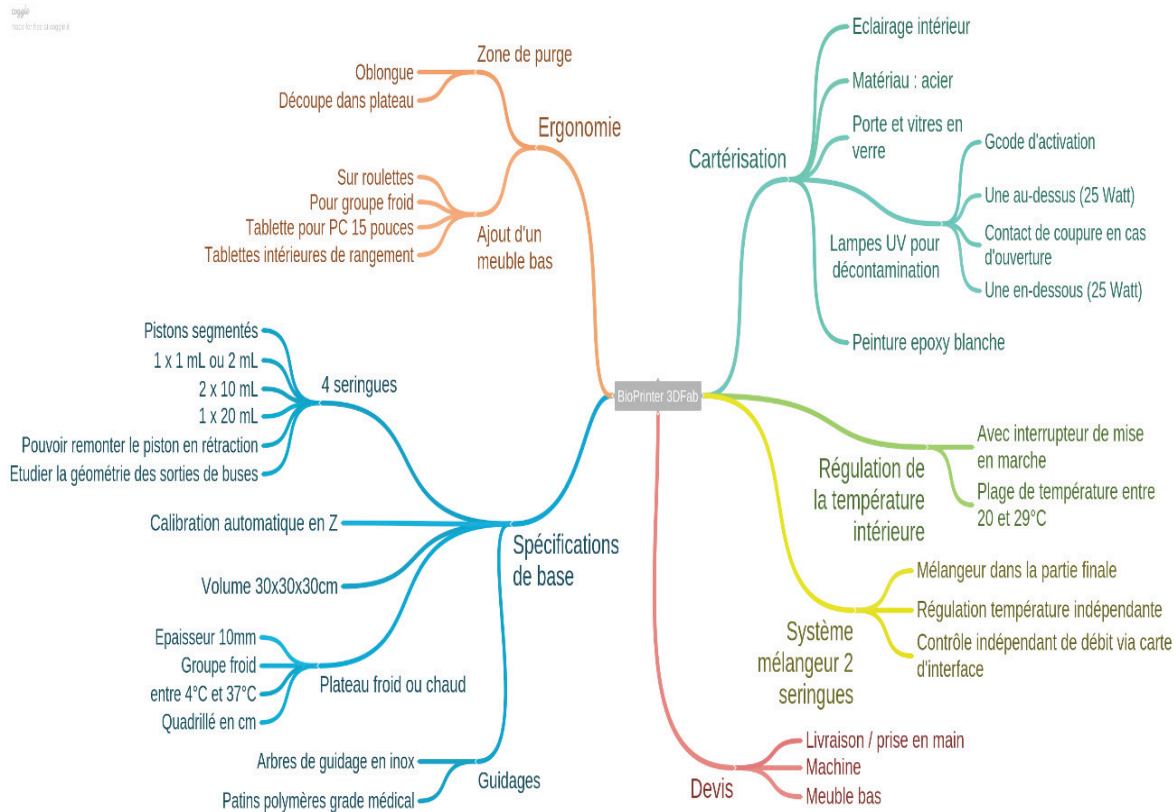


Figure 78. Carte mentale initiale du cahier des charges de V2recherche.

II.1 Caractéristiques de la machine V2recherche

La cartérisation de l'imprimante V2recherche a permis de travailler dans un environnement beaucoup plus propre (Figure 79). La stérilité ne pouvant être garantie que par un flux d'air stérile orienté, une manipulation minutieuse et attentive est toutefois nécessaire afin d'éviter une contamination directe des échantillons. Les matériaux de fabrication en Inox sont également beaucoup plus simples à nettoyer de toutes projections de matières organiques ou de poussière.

De plus, le plateau thermostaté (entre 4 et 90°C) permet d'avoir des impressions plus régulières. Grâce au refroidissement du plateau, le contrôle de la viscosité de la bio-encre se déroulait de manière plus reproductible. Cependant, si l'objet à imprimer fait plus de 1 centimètre de haut, il se trouve mal défini sur les dernières couches. En effet, le plateau étant refroidissant (4°C) et la température de l'enceinte fixée par la température ambiante, cela crée un gradient thermique entre le plateau et le haut de l'objet imprimé (hauteur Z de l'objet). Notre bio-encre étant thermosensible, ce gradient de température, même faible,

entraîne une hétérogénéité lors de l'impression d'un objet de plus de 1 cm de haut. Ces hétérogénéités étaient accentuées lorsque la température de la pièce dépassait les 25°C.



Figure 79. Photo du prototype V2recherche.

II.2 Extrusion par poussée pneumatique

La rhéologie de notre encre, caractérisée dans le chapitre précédent, a permis de mettre en lumière sa viscoélasticité. Ce type de comportement associé à une extrusion mécanique définie par le pas de vis fixe du pousse-seringue (pas/min) rend l'impression hétérogène en fonction des temps d'impression, des hauteurs des objets, des températures extérieures. Le déplacement mécanique imposé permet d'influencer le débit à la sortie de la seringue mais en aucun cas de contrôler la pression exercée à l'intérieure de la seringue. Ce déplacement permet de mesurer une quantité de matière (extrudée) par unité de temps mais celui-ci sera fonction de la viscosité de la bio-encre et donc de la perte de charge dans la buse.

C'est donc naturellement que le passage vers une poussée pneumatique a été décidée, afin d'obtenir des débits considérés reproductibles, quelques soit les variations de températures. L'inactivation de l'extrusion mécanique s'est réalisée par simple débranchement des moteurs concernés. Ensuite, le montage d'un tel système pneumatique s'est fait grâce au contrôleur ValveMAte™ de chez Nordson EFD fonctionnant indépendamment de la bioimprimante. De manière simple le schéma de montage comprend :

- La seringue de chez Nordson EFD, montée sur l'axe X de la bioimprimante, qui est reliée au contrôleur par un tuyau à air,
- Le contrôleur Nordson EFD qui règle la pression donnée,
- Ce dernier est branché directement sur le réseau d'air comprimé, également grâce à un tuyau à air.

II.3 Limitations et solutions

Parmi les spécifications définies par le cahier des charges du V2recherche, plusieurs éléments n'ont pas pu être mis en place. Notamment, l'auto-calibration en Z qui nécessitait l'ajout d'un module complexe, ainsi que le système de mélangeur pour deux seringues qui amenait un problème d'encombrement.

Les limitations de ce prototype V2recherche, concernent principalement les régulations de température, contrôlées par des régulateurs PID (enceinte, plateau et seringue). Les températures de consignes étant très proches de la température de changement de phase de notre bio-encre, il est complexe d'obtenir un protocole reproductible. En effet, à chaque changement de température de la pièce, il faut adapter les températures de consigne au risque de se retrouver avec une bio-encre beaucoup trop liquide ou au contraire impossible à extruder (Figure 80).

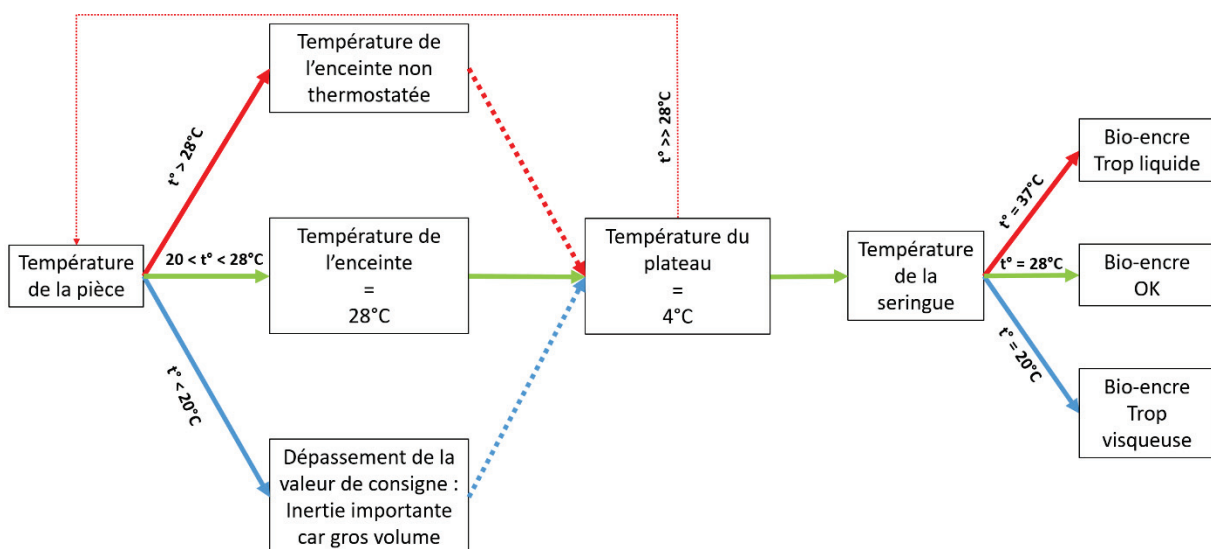


Figure 80. Schéma représentant les variations de températures et les conséquences sur la bio-encre.

Les températures de l'enceinte et de la seringue ne sont régulées que par chauffage (pas de refroidissement), par conséquent, si la température de la pièce est au-dessus de la valeur de consigne, aucune régulation ne sera possible. De plus, le plateau thermostaté peut refroidir de manière indépendante mais le système de refroidissement étant présent dans la même pièce que la machine, l'énergie calorifique rejetée pour le refroidissement contribue à faire augmenter la température de la pièce.

Dans le cas d'une température de la pièce inférieure à 20°C, il faut considérer que l'enceinte est volumineuse. Cela va entraîner une inertie importante de la plaque de chauffage dont le but est de chauffer l'enceinte afin que le capteur PID (situé sur l'axe X) atteigne la valeur de consigne. Le dépassement de la valeur de consigne peut alors être important et entraîner une hétérogénéité à l'intérieur même de l'enceinte.

De plus, un contrôle plus fin des températures pourrait être réalisé grâce à l'utilisation de régulateurs thermostatés qui, le cas échéant, serait en mesure de refroidir efficacement la seringue et l'enceinte.

Tableau 9. Récapitulatif des limitations rencontrées avec cette version 2 et les solutions technologiques à mettre en place.

Limitations rencontrées sur V2research	Solutions à apporter
Difficulté de calibration de l'axe Z manuelle	Calibration automatique (cellule optique)
Régulation de température de l'enceinte et de la seringue peu adaptée aux plages de températures utilisées	Pièce climatisée
Contrôle plus fin des températures	Régulateur thermostaté

III. Prototype V3prod

Le but de ce nouveau prototype V3prod est de prendre en compte les écueils des machines précédentes afin d'obtenir une machine destinée à une production soutenue de tissus. En effet, les optimisations précédentes nous ont permis de fixer les conditions d'impression idéales et en parallèle de mettre au point un procédé de fabrication reproductible.

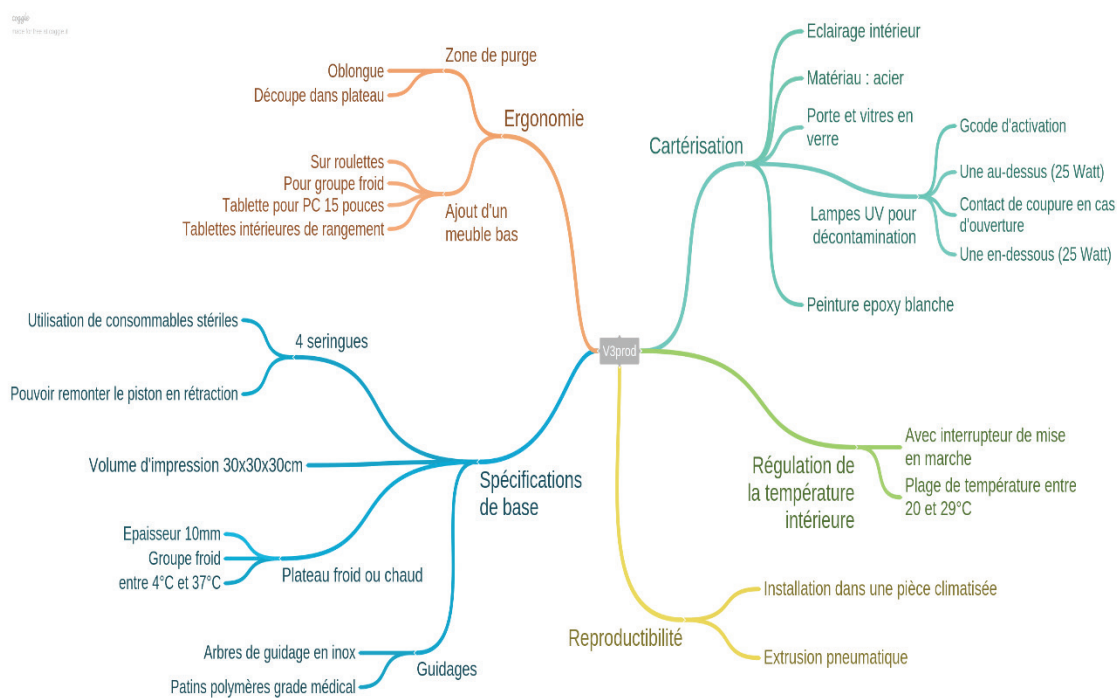


Figure 81. Carte mentale du cahier des charges du prototype de bioimprimante V3prod.

La carte mentale (Figure 81) nous indique que les spécifications de bases ne changent pas, c'est-à-dire qu'il faut toujours 4 portoirs pour les seringues, un plateau froid, des matériaux de grade clinique associés à une décontamination par rayonnement UV entre chaque impression. On apportera de la reproductibilité en fixant les températures de consigne à 28°C et en restant dans une pièce climatisée pour éviter tout changement de température et ainsi avoir un protocole fixe.

Ce prototype V3 a été validé par de multiples bioimpression 3D de derme et par le dépôt d'un brevet²⁰⁹ sur : « Le procédé de fabrication de substituts corporels par fabrication additive ». Un transfert de technologie vers l'entreprise LabSkin Creations a permis d'installer cette nouvelle bioimprimante dans ses locaux à l'hôpital Edouard Herriot. Elle est maintenant utilisée en routine par l'entreprise, pour la fabrication de substituts bioimprimés de peau totale (derme + épiderme).

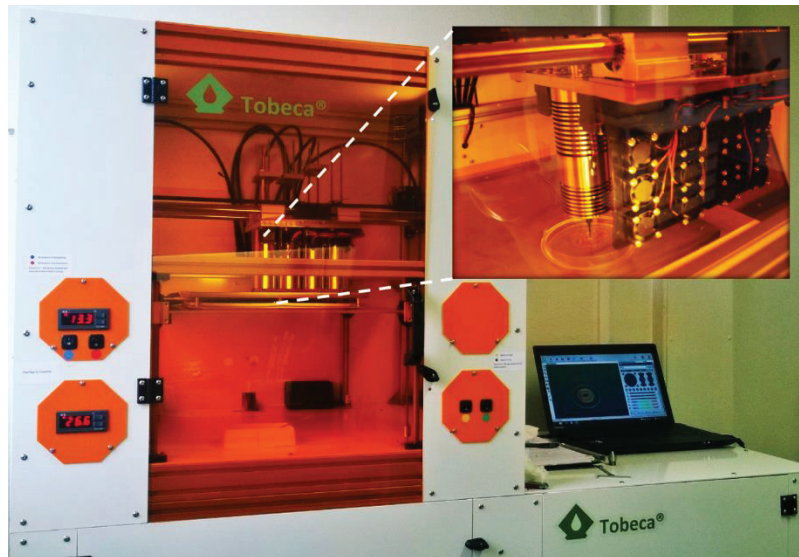


Figure 82. Photo du prototype V3 pendant une bioimpression dans une boîte de pétri.

IV. Le BAB : BioAssemblyBot®

Toutes les preuves de concept ayant été validées sur plusieurs machines et sur plusieurs tissus bioimprimés différents, l'acquisition d'un bras robotique à 6 axes nous a permis de passer les dernières limitations technologiques. Commercialisé par Advanced Solution depuis 2014, le BioAssemblyBot® est essentiellement composé d'un robot multiaxes conçu pour reproduire des assemblages de tissus en 3D (Figure 83). En plus de pouvoir imprimer en 3D, vient s'ajouter avec ce bras, la possibilité d'imprimer avec plusieurs bio-encres, non plus couche par couche, mais sur des surfaces courbes (Figure 84).

Cette imprimante 3D commerciale offre une large gamme de spécificités. Elle est capable d'imprimer des structures avec une résolution de 20 μm pour un volume de construction maximal de 30 x 25 x 15 cm. Cette machine offre aussi un échange automatisé de seringue

(parmi les 8 modules disponibles) et une calibration automatique en Z (hauteur). Les modules permettent un contrôle accru de la température avec un module chauffant, et un refroidissant. La pression est elle aussi contrôlée par la machine dans des gammes compatibles avec l'usage de cellules (de 1 à 85 psi c'est-à-dire de 0,07 à 6 bars).



Figure 83. Photo de la machine BioAssemblyBot® (<https://lifesciences.solutions/bioassemblybot/>)

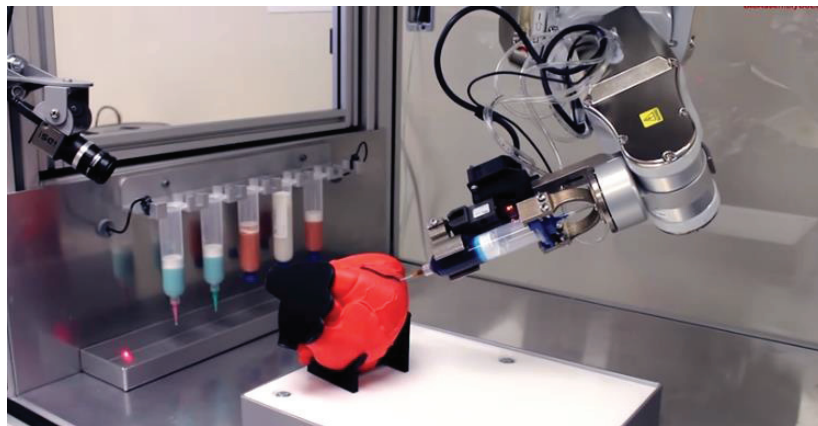


Figure 84. Bioimpression 3D sur une surface (courbe) d'un cœur (<https://lifesciences.solutions/bioassemblybot/>)

L'acquisition d'une telle technologie a fait partie d'un projet financé par la DGA (Direction Générale des Armées) (ASTRID : ANR-16-ASTR-0021) appelé BLOC-PRINT. Ce projet se propose

de traiter le problème de la disponibilité des greffons autologues notamment pour les greffes de peau et de cartilage, en utilisant, grâce à l'impression 3D, les cellules du patient provenant d'une biopsie. Les essais de cette nouvelle technologie ont débuté par l'impression d'une bio-encre (sans cellules) sur un modèle morphologique humain (Figure 85).

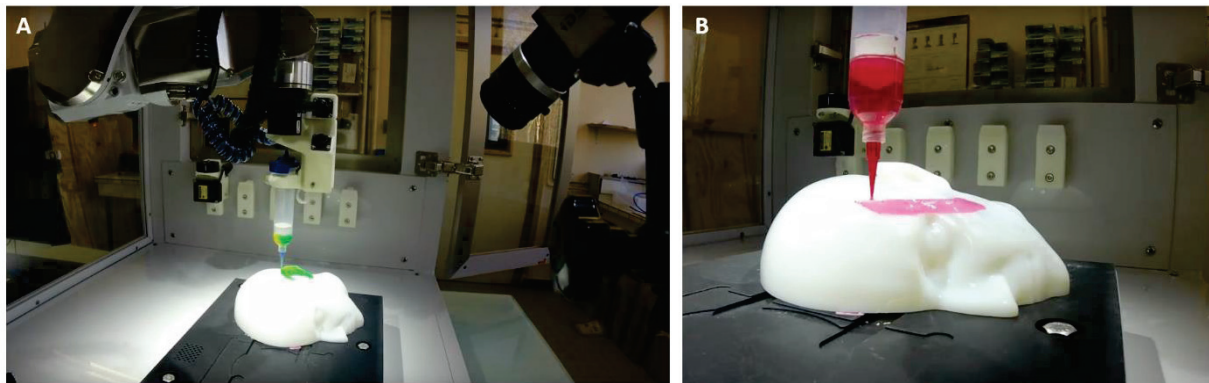


Figure 85. Bioimpression sur un modèle morphologique humain A) d'une oreille, B) d'un patch de peau.

V. Conclusion

Ce chapitre a traité de l'évolution technologique de la bioimprimante 3D utilisée au cours de cette thèse. Nous sommes partis d'une imprimante 3D FDM classique pour la transformer en bioimprimante 3D afin de permettre les premières preuves de concept de bioimpression 3D de tissus. Le cahier des charges a ensuite évolué pour aboutir, avec notre partenaire Tobeca®, à une machine beaucoup plus adaptée à nos besoins, la V2recherche. Cette dernière a évolué pour donner naissance à la V3prod destinée à notre partenaire LabSkin Creations. Ces évolutions nous ont enfin conduits à l'acquisition d'une bioimprimante 6 axes multi-têtes. Cette dernière va nous permettre de faire les premiers essais de bioimpression *in vivo* chez le petit animal, avec pour objectif : la bioimpression *in vivo* chez l'Homme.

CHAPITRE 5 : LA BIOFABRICATION *IN VITRO* DE TISSUS COMPLEXES ET FONCTIONNELS

Les chapitres précédents se sont concentrés sur l'étude de la bio-encre et le développement de la bioimprimante. Celui-ci est centré sur les caractérisations des tissus bioimprimés grâce à la méthode développée précédemment. Dans ce chapitre, différents tissus bioimprimés seront présentés avec :

- Le derme et sa maturation vers une peau totale,
- Le cartilage et la bioimpression de cellules souches mésenchymateuses,
- Un tissu microvascularisé avec l'incorporation de cellules endothéliales,
- Un tissu perfusable en utilisant une approche de culture dynamique en bioréacteur.

I. La bioimpression de derme

I.1 Contexte et objectifs

Bien que de nombreuses techniques d'ingénierie tissulaire aient déjà conduit au développement des premières générations de peau *in vitro*, de tels procédés sont généralement chronophages et limités à des géométries planes^{12,77}. Plusieurs recherches ont également démontrées le potentiel de la bioimpression de peau par jet d'encre^{132,210} et par laser^{98,211}.

L'étude présentée dans cette première partie est axée sur la bioimpression par extrusion et la caractérisation de systèmes épiderme/derme, appelés peau totale. Toutes les bioimpressions de dermes sont basées sur le même dessin 3D d'un cube de dimensions 1 x 1 x 0,5 cm.

Toutes les expérimentations se sont déroulées dans un contexte partenarial avec l'entreprise LabSkin Creations et plus spécifiquement avec le Dr Amélie Thépot PhD (PDG) et le Dr Marion Albouy. Ces expérimentations se sont développées suivant le calendrier présenté dans la Figure 86. Depuis le début de cette collaboration, un brevet²⁰⁹ et une publication¹³³ ont été produits.

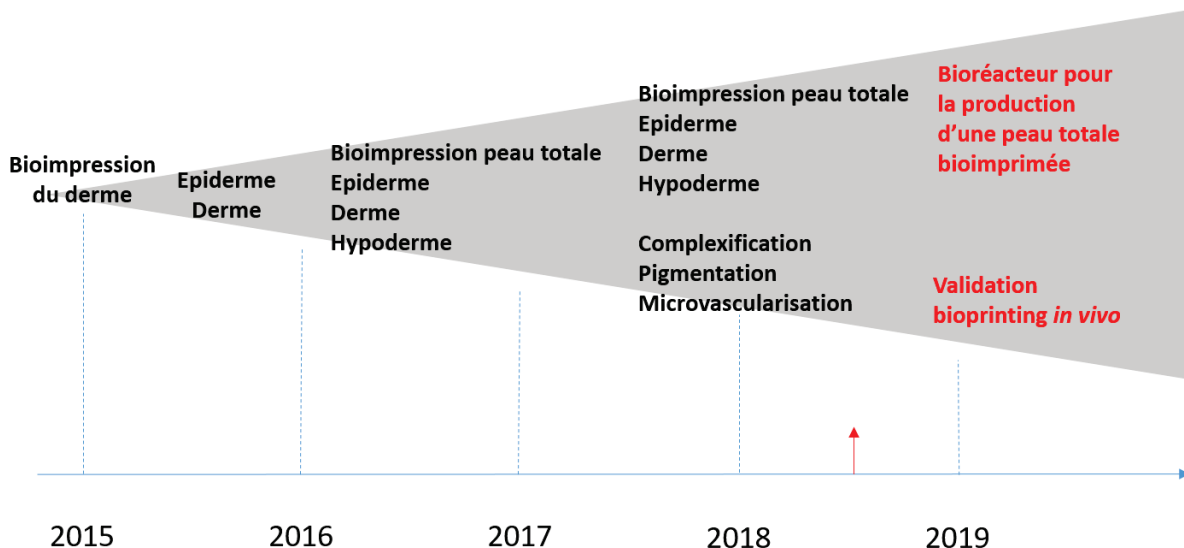


Figure 86. Calendrier des jalons à franchir jusqu'à la bioimpression de peau *in vivo* prévue en 2019.

I.2 Résultats

I.2.1 HPS

La coloration HPS (Hématoxyline Pholixine Safran) est utilisée en routine, c'est une coloration trichromatique dite topographique. Elle met en évidence le cytoplasme des cellules en rose (Pholixine), leurs noyaux en bleu (Hématoxyline) et les fibres de collagène en rose-orangé (Safran). Cette coloration permet d'apprécier l'organisation de notre tissu bioimprimé à différents temps de maturation.

I.2.1.1 Contrôle négatif sans cellule

Un contrôle négatif sans cellule a été réalisé. La préparation de la bio-encre, la bioimpression, la polymérisation et l'étape de maturation se sont déroulées suivant le protocole établi (chapitre 2). On ne remarque aucune coloration spécifique, excepté la présence d'amas marron foncés. Ces artéfacts granulaires disparaissent totalement lorsque les cellules sont présentes dans la bio-encre. Il apparait également sur cette coupe, des inclusions non colorées d'une cinquantaine de microns qui peuvent être liées soit à la dégradation de la bio-encre après 12 jours de maturation soit à l'inclusion de paraffine.



Figure 87. Caractérisation histologique par HPS de la bio-encre bioimprimée sans cellules, après 12 jours de maturation. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

La matrice bioimprimée est continue et ne présente pas de marquage ce qui signifie que ce marquage est spécifique et marquera ainsi uniquement les cellules bioimprimée et la matrice extracellulaire sécrétée.

1.2.1.2 Après 12 jours de maturation

Afin d'observer le développement de la maturation du derme bioimprimé, plusieurs cubes tests ont été fixés et analysés après 12 jours de maturation. Les fibroblastes bioimprimés sont distribués de manière homogène à l'intérieur du derme en formation, preuve de la cytocompatibilité de notre bio-encre. Ils ont la morphologie attendue, c'est-à-dire qu'ils sont bien allongés avec des pseudopodes très fins. Ils forment également une couche plus dense tout autour de l'objet bioimprimé, là où l'accès aux nutriments est direct, signe d'une prolifération efficace. Leur nombre important (1000 cellules/mm² estimation à l'intérieur du carré rouge) à l'intérieur même de l'objet (500 µm de profondeur), signifie que la diffusion de nutriments et des gaz est suffisamment efficace pour les maintenir en vie. Leur croissance ayant été quantifiée (chapitre 3), à ce stade de maturation la population de fibroblastes a doublé. L'émergence d'une légère coloration jaune-orangée est le signe de l'apparition de collagène dans la matrice extracellulaire (Figure 88, flèches rouges).

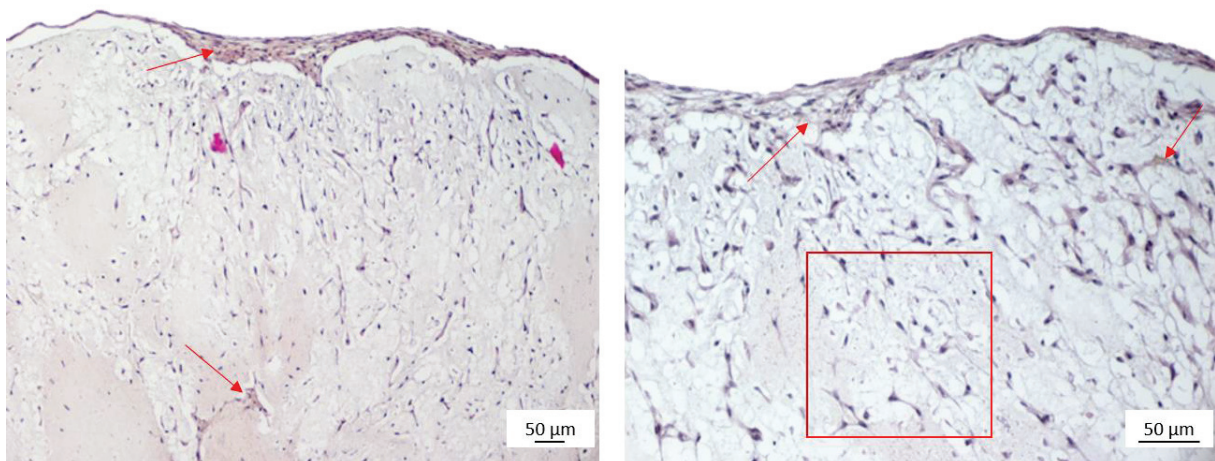


Figure 88. Caractérisation histologique par HPS du derme bioimprimé, après 12 jours de maturation. Les flèches rouges désignent une légère coloration jaune-orangée, signifiant la présence de collagène. À gauche, grossissement x10 et à droite x20. Coupe de 5 µm, barre d'échelle : 50 µm.

Il est également important de mentionner que ce derme bioimprimé présentant une accumulation de fibroblastes à l'interface entre l'objet imprimé et le milieu de culture sera un excellent substrat¹²² pour un ensemencement de kératinocytes afin de créer un épiderme différencié.

1.2.1.3 Ensemencement des kératinocytes

La survie et la prolifération des fibroblastes ayant été validées, les temps d'ensemencement des kératinocytes ont pu être évalués. Cet ensemencement, pour qu'il soit efficace, ne doit pas permettre aux kératinocytes de pénétrer en profondeur dans le derme en formation. Ce dernier doit donc agir comme un substrat. L'avantage d'une matrice formée de fibroblastes pour l'ensemencement des kératinocytes a été prouvé puisque les fibroblastes potentialisent la formation d'un épiderme sain grâce à des échanges dermo-épidermiques notamment de facteur de croissance¹³⁰.

L'obtention d'une peau totale nécessite des temps de culture très long. L'objectif ici était de constater si un ensemencement précoce (5 jours après la bioimpression du derme) des kératinocytes ne perturbait pas le bon développement de cette peau totale.

En ingénierie tissulaire de la peau, les ensemencements de kératinocytes se déroulent classiquement après 12 jours de maturation du derme, le temps pour les fibroblastes de sécréter une quantité suffisante de matrice extracellulaire afin de supporter la croissance des kératinocytes. Ici, deux temps différents d'ensemencement ont été défini : après 5 jours (Figure 89-A) et après 12 jours de maturation (Figure 89-B). Pour la préparation de ces peaux totales (derme + épiderme), des kératinocytes épidermiques humains (donneurs âgés de 1 an) ont été ensemencés, à une densité de 10 000 cellules/cm², sur les dermes maturés à 5 et 12 jours. Après 3 jours de culture submergée, les dermes épidermalisés ont été placés à l'interface air-liquide afin de déclencher la différenciation épidermique¹²⁴. Les échantillons ont enfin été récoltés et fixés, après 30 jours de maturation, dans une solution de formol à 4% puis inclus dans de la paraffine pour l'analyse histologique.

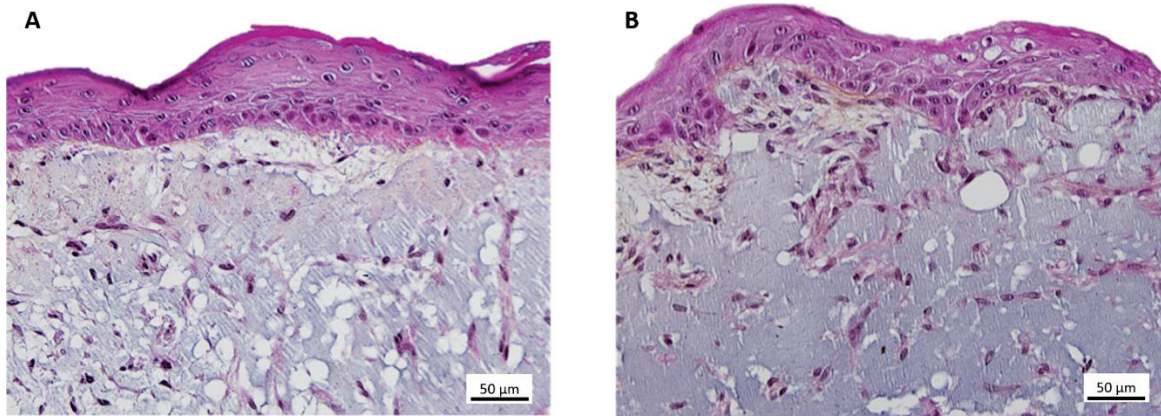


Figure 89. Coupe histologique de 5 µm par HPS d'une peau totale après 30 jours de maturation. A) avec ensemencement des kératinocytes à J5. B) avec ensemencement des kératinocytes à J12. Barre d'échelle : 50 µm.

Comme constaté sur la Figure 89, le développement kératinocytaire apparaît similaire dans les deux cas. De manière plus spécifique, la jonction dermo-épidermique semble plus continue sur la Figure 89-A et les fibroblastes du derme sont répartis de manière plus homogène. En effet, sur la Figure 89-B, ces derniers semblent regroupés en amas, ce qui peut entraîner une sécrétion hétérogène de matrice extracellulaire.

Afin d'accélérer au maximum les temps d'élaboration des peaux totales, il a été défini dans le protocole de bioimpression de peau totale d'inclure cet ensemencement précoce après 5 jours de maturation des dermes bioimprimés.

1.2.1.4 Après 38 jours de maturation

Les peaux totales ont été conservées en culture pendant 38 jours puis fixées et colorées afin d'en faire une analyse histologique. Sur la Figure 90, l'épiderme, la jonction dermo-épidermique et le derme semblent bien définis. Les cellules ont proliféré passant de 1000 cellules/mm² à 1500 cellules/mm².

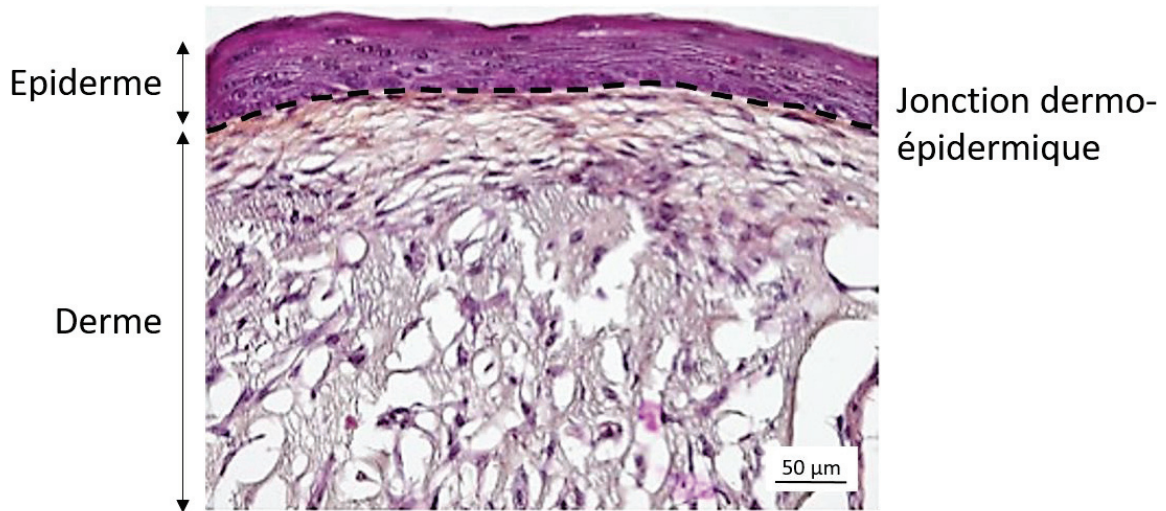


Figure 90. Caractérisation histologique par HPS d'une peau totale cultivée pendant 38 jours. Les pointillés noirs suivent la jonction dermo-épidermique. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

Ces derniers résultats nous montrent une synthèse dense de la matrice extracellulaire, un épiderme bien organisé en multicouche et une jonction dermo-épidermique cohésive. Cette coupe histologique nous indique également que les fibroblastes contenus dans le derme ont synthétisé leur propre matrice extracellulaire (coloration jaune orangée). Ce derme est capable de supporter le développement d'un épiderme différencié et stratifié, séparé du derme grâce à une jonction dermo-épidermique cohésive.

1.2.2 Trichrome de Masson

La coloration trichrome de Masson est utilisée afin de mettre en évidence les fibres de collagène. Elle associe trois colorants, un colorant nucléaire violet (hématoxyline), un colorant cytoplasmique rouge (fuchsine ponceau) et un colorant des fibres de collagène vert (vert lumière). Cette coloration va nous permettre d'évaluer la sécrétion du collagène néo-synthétisé par les fibroblastes pour corroborer les résultats obtenus avec la coloration HPS.

1.2.2.1 Contrôle négatif sans cellule

Comme pour la coloration par l'HPS, un contrôle négatif sans cellule a été réalisé. La préparation de la bio-encre, la bioimpression, la polymérisation et l'étape de maturation se sont déroulées suivant le protocole établi (chapitre 2).

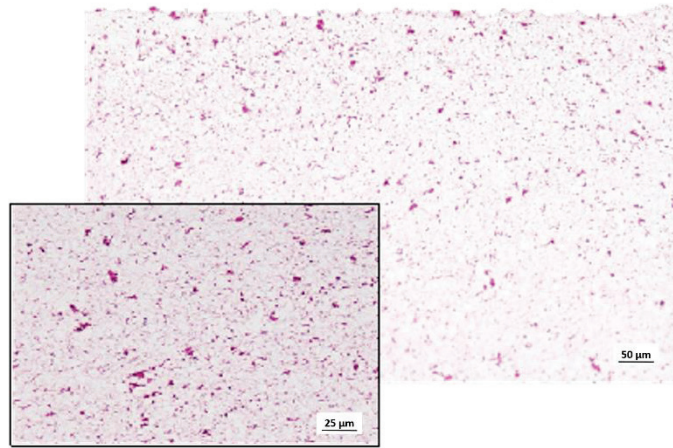


Figure 91. Caractérisation histologique par le trichrome de Masson de la bio-encre bioimprimée sans cellules, après 12 jours de maturation. Coupe de 5 μm , barre d'échelle 50 μm , et 25 μm dans le carré zoomé.

Comme pour le témoin négatif de la coloration HPS, en l'absence de fibroblaste, la coupe présente uniquement un bruit de fond de couleur rosée, preuve là aussi de la spécificité du marquage.

1.2.2.2 Après 12 jours de maturation

Après 12 jours de maturation, les fibroblastes se trouvent répartis de manière homogène à l'intérieur du cube test ce qui prouve la cytocompatibilité de notre bio-encre. De plus, la coloration verte montre une forte présence de matrice extracellulaire néosynthétisée et sécrété par les fibroblastes envahissant la totalité du derme bioimprimé (Figure 92).

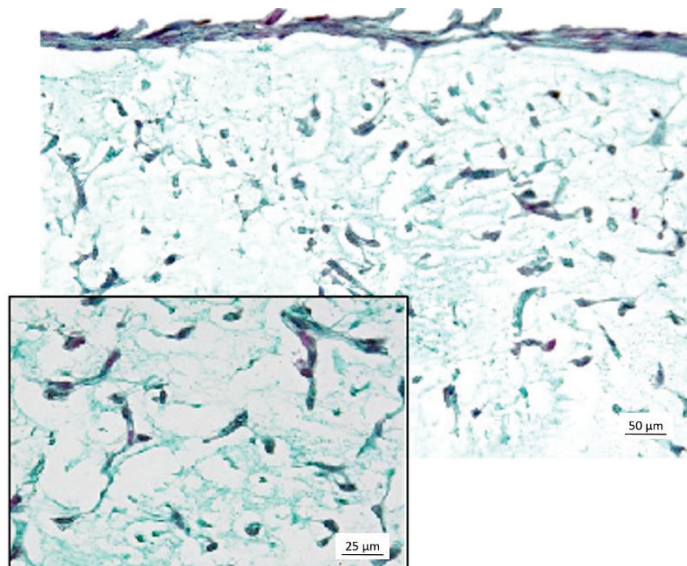


Figure 92. Caractérisation histologique par le trichrome de Masson du derme bioimprimé, après 12 jours de maturation. Barre d'échelle 50 μm , et 25 μm dans l'insert.

Visuellement, et sans avoir à détruire l'échantillon, une rétractation du derme de 20% de la taille initiale ainsi qu'une opacification de celui-ci ont été observées. Après l'analyse histologique, cela s'explique par la sécrétion massive de matrice extracellulaire. En effet, en proliférant, les fibroblastes sécrètent de plus en plus de matrice, remplaçant la bio-encre. Les fibrilles de collagène néosynthétisées, en s'associant en fibres vont induire une contraction des extrémités libre de l'échantillon¹²¹.

1.2.2.3 Après 38 jours de maturation

Les peaux totales ont été gardées en culture pendant 38 jours, puis la culture stoppée et les tissus fixés. Cette coupe histologique indique que l'ensemencement des kératinocytes au sommet des dermes se déroule de la manière attendue avec un niveau remarquable de stratification et de différenciation épidermique. La caractérisation histologique a démontré que la peau bioimprimée était morphologiquement et biologiquement représentative de la peau humaine normale. Le derme bioimprimé soutient la formation épidermique et potentialise sa prolifération afin de produire une peau totale d'une épaisseur physiologique. Néanmoins, une différence de coloration peut être observée entre la peau humaine normale et la peau bioimprimée. Cela est principalement dû au fait que les peaux bioimprimées présentent une matrice extracellulaire moins organisée que la peau humaine mature puisqu'elles ne contiennent que des fibroblastes et non un mélange complexe de plusieurs cellules (les cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales par exemple).

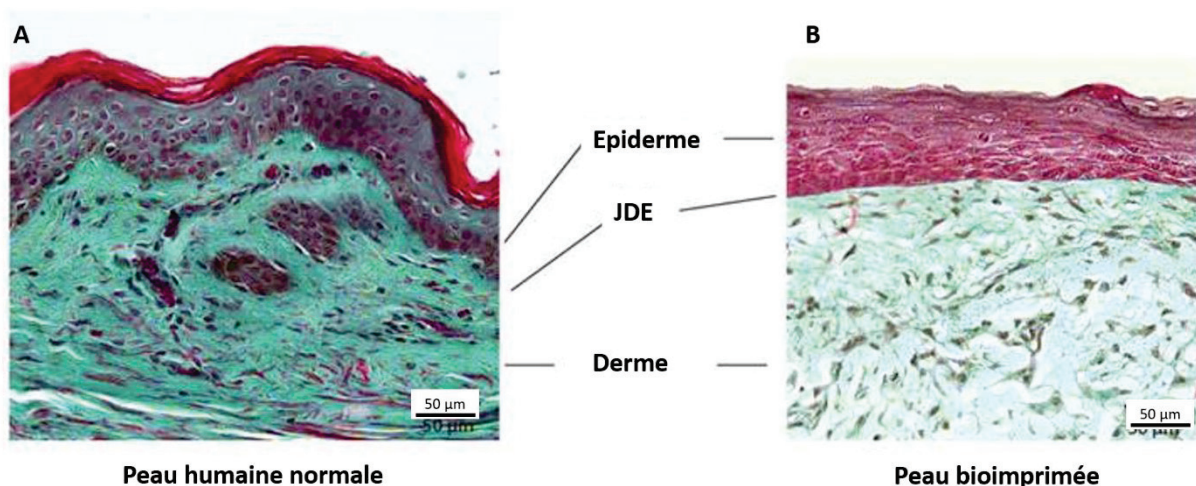


Figure 93. Caractérisation histologique par le Trichrome de Masson avec la mise en évidence de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique (JDE) et du derme. A) d'une peau humaine normale, B) d'une peau bioimprimée. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

Après ces 38 jours de maturation, l'obtention d'une peau totale est validée. Cependant, il a été constaté une réduction de près de la moitié de la taille des peaux totales. Comme précédemment, l'explication vient de la création d'un collagène mature qui tracte les extrémités du tissu, indiquant au passage l'obtention d'un réel tissu qui s'organise et non plus un simple hydrogel cellularisé.

1.2.3 Immunofluorescence

La technique d'immunomarquage a été également utilisée afin de confirmer la présence d'un certain nombre de protéines spécifiques de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et du derme, pour s'assurer de la reconstruction correcte de la peau totale bioimprimée.

1.2.3.1 Immunofluorescence des marqueurs de l'épiderme

L'épithélium obtenu est non seulement morphologiquement semblable à la peau humaine normale mais il exprime également un certain nombre de marqueurs spécifiques liés à la différenciation et la prolifération épidermique (Figure 94). Plus spécifiquement, ces marqueurs concernent :

- La cytokératine 10, témoin de la différenciation des cellules épithéliales¹⁰⁴,
- La filaggrine qui est une protéine se liant à la kératine qui est donc exprimée dans les kératinocytes des deux couches supérieures de l'épiderme, montrant ainsi la qualité de sa stratification¹⁰⁵,
- La loricrine représentative de la fonction de barrière cutanée car étroitement liée à la formation de la couche cornée¹⁰⁵.

La présence de ces marqueurs dans la peau totale reconstruite indique de manière précise une différenciation des kératinocytes et leur transformation en cornéocytes. Ces derniers sont le témoin d'une des fonctions primaires de la peau qui est la protection grâce à la formation d'une couche cornée fonctionnelle.

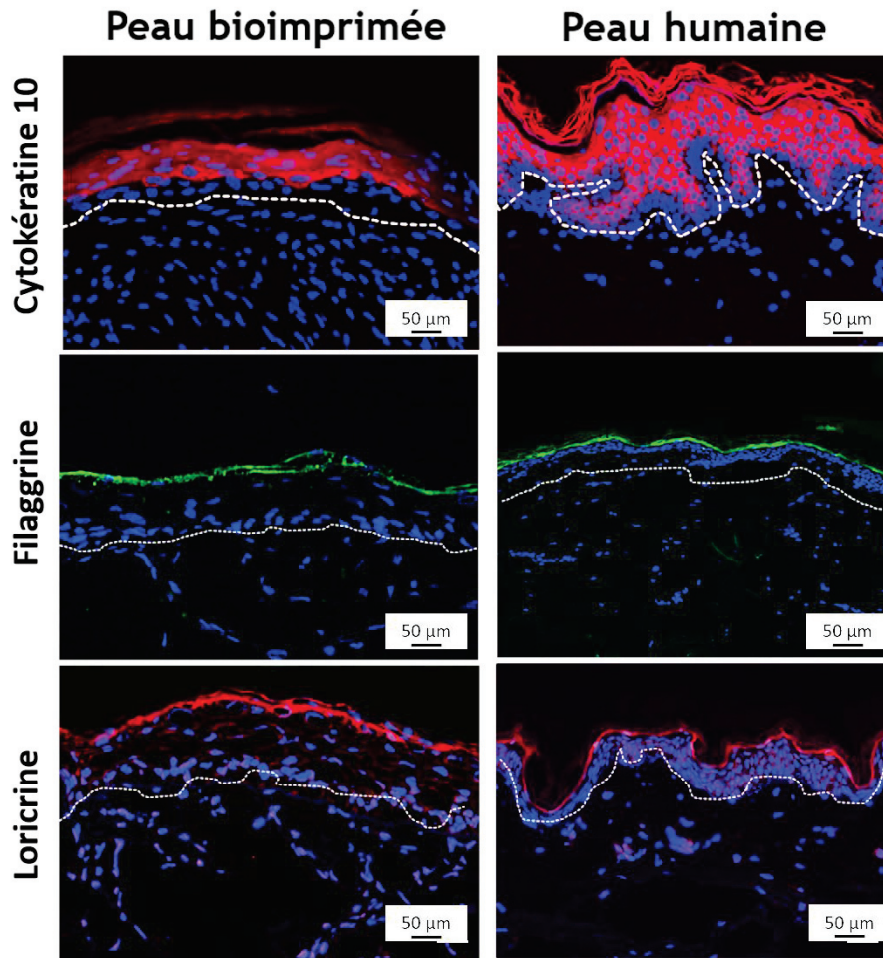


Figure 94. Caractérisation par immunofluorescence des protéines marqueurs de la différenciation et de la prolifération épidermique de la peau bioimprimée en regard de la peau humaine normale. Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (bleu), la cytokératine et la loricrine en rouge et la filaggrine en vert, la jonction dermo-épidermique est représenté par les pointillés blancs. Observation par microscopie de fluorescence. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

1.2.3.2 Immunofluorescence des marqueurs de la jonction dermo-épidermique (JDE)

Au niveau de la JDE, le marquage par immunofluorescence de la laminine 332 démontre la morphogénèse complète *de novo* de la couche la plus interne de l'épiderme pour l'obtention d'une JDE fonctionnelle²¹². La laminine est impliquée dans la cohésion des kératinocytes à la lame basale en déterminant leur orientation (polarité)¹³¹. Le marquage du collagène VII nous indique également l'organisation correcte de cette JDE avec une partie fibrillaire permettant l'ancrage des fibres de collagène du derme¹⁰⁶.

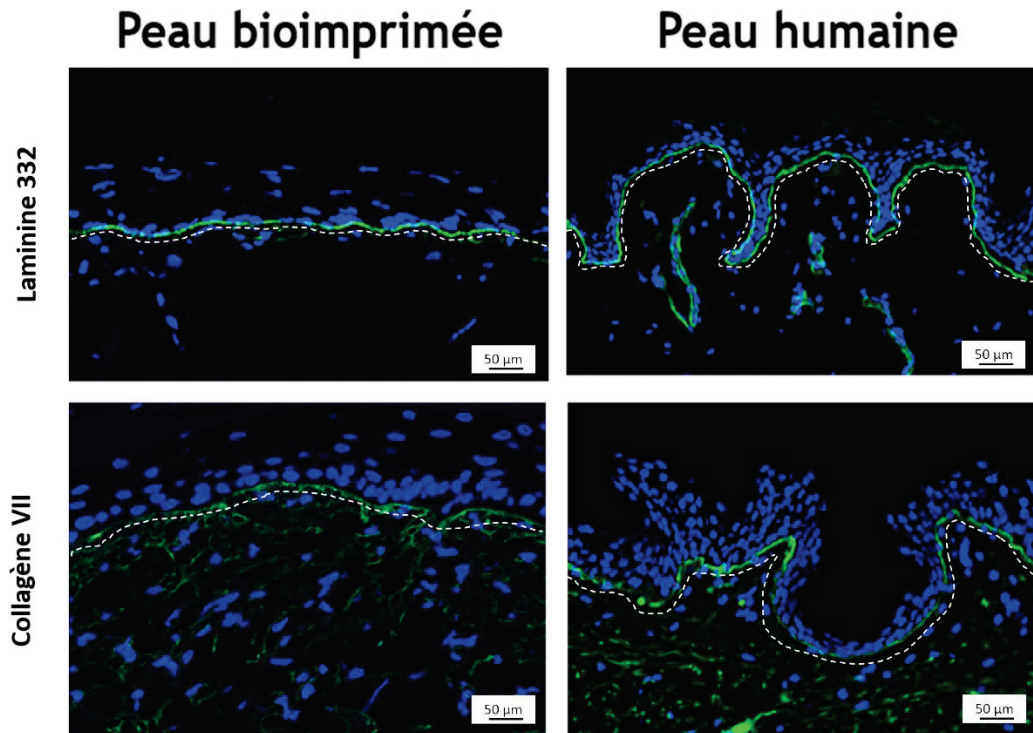


Figure 95. Caractérisation par immunofluorescence des protéines de la jonction dermo-épidermique de la peau bioimprimée en regard de la peau humaine normale. Le marquage des noyaux par le DAPI apparaît en bleu et les marquages spécifiques de la laminine 332 et du collagène VII apparaissent en vert. Pour plus de clarté, la jonction dermo-épidermique a été matérialisée, légèrement en dessous de sa réelle place, par des pointillés blancs. Observation par microscopie de fluorescence. Coupe de 5 μm , barre d'échelle 50 μm .

1.2.3.3 Immunofluorescence des marqueurs dermiques

L'analyse immuohistologique du derme a également montré l'expression d'un nombre important de protéines présentes dans la matrice extracellulaire du derme. Le collagène I et V, et la fibrilline sont abondamment exprimés (Figure 96). Il a aussi été démontré la présence d'élastine, en rouge sur la Figure 97. La présence abondante de ces protéines indique une reconstruction complexe et une réorganisation importante des peaux bioimprimées.

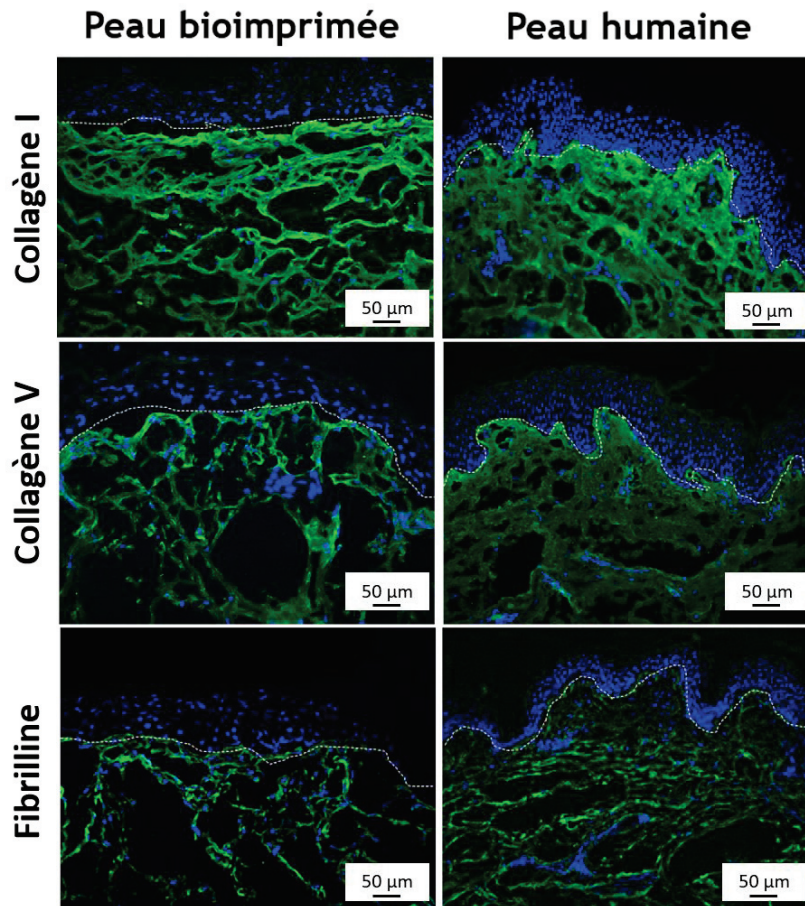


Figure 96. Caractérisation par immunofluorescence des protéines dermiques de la peau bioimprimée en fonction de la peau humaine normale. Le marquage des noyaux au DAPI apparaît en bleu et les marquages spécifiques du collagène I, du collagène V et de la fibrilline apparaissent en vert, la jonction dermo-épidermique est représenté par les pointillés blancs. Observation par microscopie de fluorescence. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

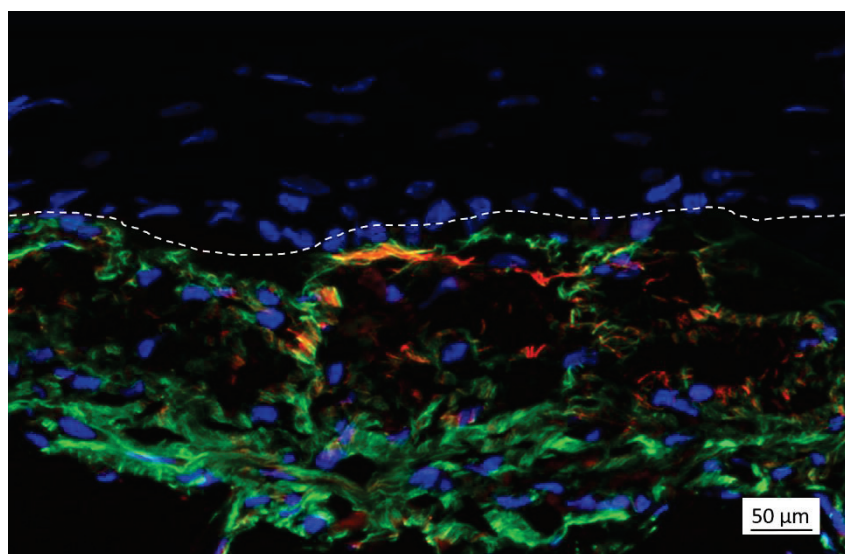


Figure 97. Caractérisation par immunofluorescence de l'élastine de la peau bioimprimée. Le marquage des noyaux par le DAPI apparaît en bleu et les marquages spécifiques du collagène I apparaît en vert et de l'élastine en rouge. Observation par microscopie de fluorescence. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

1.2.4 Microscope électronique à transmission

L'observation des peaux totales grâce à un microscope électronique à transmission nous a permis d'identifier de manière plus précise l'organisation ultrastructurale de la peau bioimprimée, en mettant en évidence l'organisation du collagène et des organites présents dans la JDE et l'épiderme.

Les granules de kératohyaline sont présents dans le stratum granulosum et le stratum corneum. Ces deux couches sont formées par l'association de 6 à 7 couches liées par des cornéodesmosomes (Figure 98-A et B). Les kératinocytes, dans la couche stratum spinosum, sont associés entre eux par de multiples desmosomes attachés à des filaments cytoplasmiques abondants (Figure 98-C). La présence de desmosomes entre les kératinocytes adjacents a mis en évidence des interactions cellulaires cruciales pour la formation de l'épiderme. Une membrane basale continue avec lamina lucida et lamina densa, typique des structures cutanées humaines normales, a également été observée avec les hémidesmosomes au niveau de la membrane basale des cellules basales (Figure 98-D). Ces hémidesmosomes semblent être liés aux filaments de kératine des kératinocytes basaux.

Ces observations révèlent également une organisation structurée de la matrice extracellulaire néosynthétisée, dans laquelle les fibrilles de collagène sont regroupées en un réseau de faisceaux (Figure 98-E et F). Entre ces faisceaux, il a été identifié un matériel fibrillaire abondant : de l'élastine (Figure 98-G).

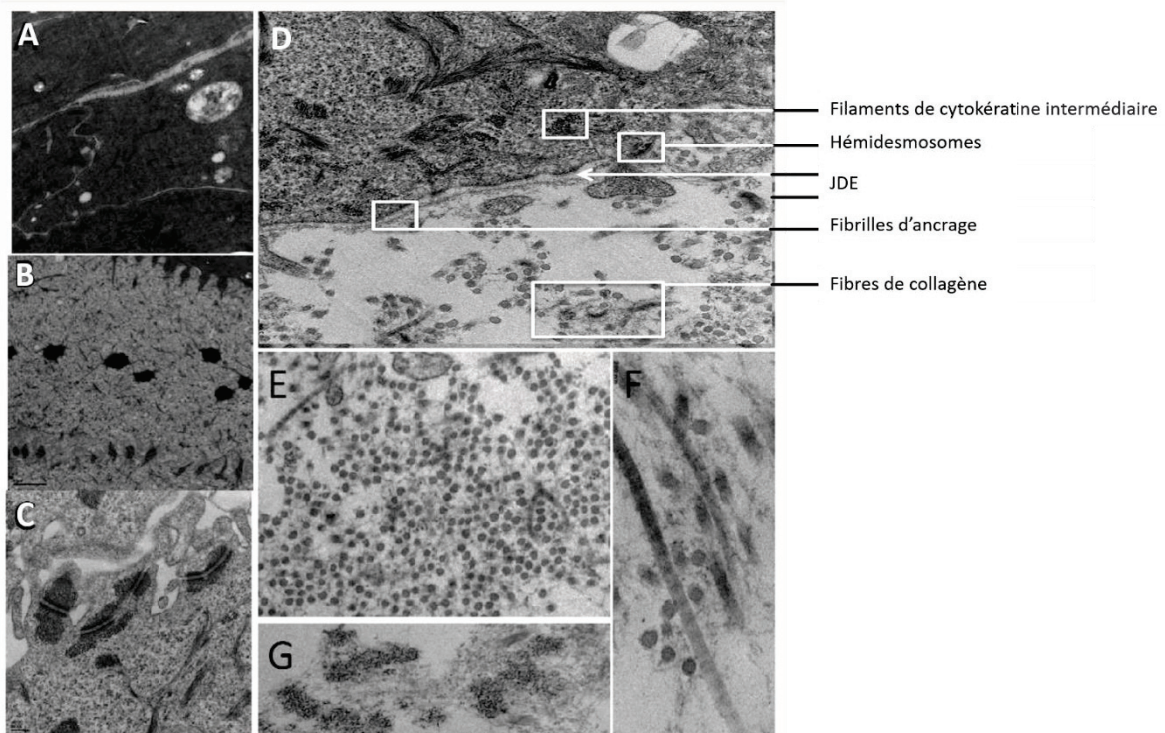


Figure 98. Images ultrastructurales de peau bioimprimée obtenues par analyse grâce à un microscope électronique à transmission. A) Le stratum corneum montrant les cornéodesmosomes. B) Les granules de kératohyalines dans le stratum granulosum. C) Les nombreux desmosomes dans le stratum spinosum. D) La zone membranaire de la JDE contenant de nombreux hémidesmosomes liés aux filaments de kératine. E,F) Les fibrilles de collagène organisées en fibres de collagène matures, regroupées en coupes transversale et longitudinale. G) Le dépôt d'élastine soluble se trouvant dans le derme.

1.3 Conclusion et perspectives de la bioimpression d'une peau totale

Notre stratégie de bioimpression sans échafaudage a permis la génération d'une peau totale conçue à partir de cellules primaires humaines et d'une épaisseur physiologique (5 mm). Le principal avantage est la rapidité de mise en œuvre avec seulement quelques minutes d'impression pour atteindre un derme viable de 5 mm d'épaisseur. De plus, les cellules sont réparties de manière homogènes dans un environnement en 3D ce qui induit une différenciation rapide du derme sur lequel il est aisé d'ensemencer l'épiderme. Avec l'utilisation d'éponges de collagène par exemple, il faut attendre 12 jours afin de pouvoir ensemencer les kératinocytes. Dans notre cas, cet ensemencement est réalisé après seulement 5 jours de maturation. De ce fait, la maturation de la peau totale a été réduite de plusieurs jours par rapport à d'autres méthodes plus classiques d'ingénierie tissulaire.

Cette approche de bioimpression offre donc des avantages significatifs grâce à un dépôt rapide de la bio-encre. Les résultats présentent de nombreuses similitudes biologiques avec

le derme *in vivo*. La présence d'un grand nombre de protéine et notamment d'élastine en fait un excellent modèle d'étude.

La complexification de ce premier modèle est toujours à l'étude. Récemment, l'épiderme a pu être ensemencé non plus manuellement mais grâce à une deuxième étape de bioimpression par jet d'encre, sur les dermes matures de 5 jours. L'automatisation de cette étape a permis l'intégration, avec succès, d'un nouveau type cellulaire : les mélanocytes qui sont responsables de la pigmentation de la peau (Figure 99).

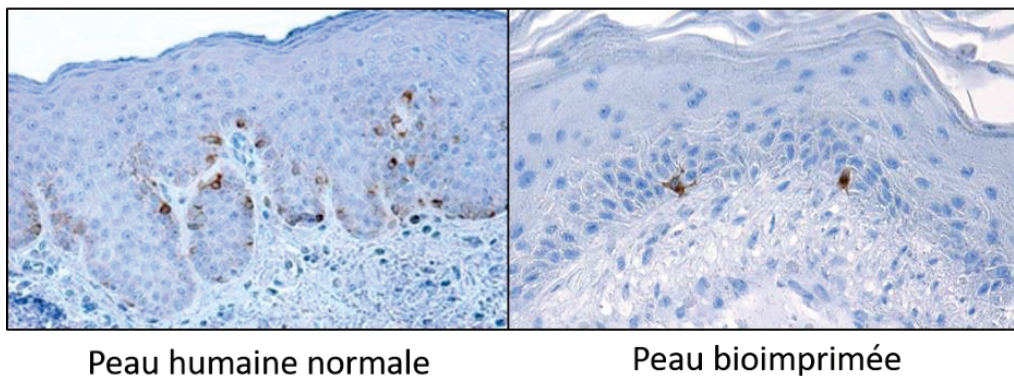


Figure 99. Caractérisation histologique par le Melan-A (marqueur de la différenciation mélanocytaire) sur une peau normale humaine et sur une peau bioimprimée. Les mélanocytes sont marqués en marron.

Après l'intégration réussie de mélanocytes, les nouvelles recherches se tournent sur la bioimpression de l'hypoderme grâce à l'utilisation d'adipocytes.

Cette collaboration fructueuse qui a abouti au dépôt d'un brevet international et à une publication scientifique, se poursuit avec un projet financé par la DGA (ASTRID : ANR-16-ASTR-0021). La partie de bioimpression de peau y est intégrante et le but final est la bioimpression *in vivo* : amener la bioimprimante dans le bloc opératoire pour une opération en un seul temps sur les grands brûlés.

II. Développement d'une nouvelle stratégie de traitement des lésions focales cartilagineuses grâce à la bioimpression

II.1 Contexte et objectifs

L'ingénierie du cartilage propose depuis plusieurs années un certain nombre de solutions mais aucune d'elles ne répond entièrement à tous les critères de stabilité dans le temps et d'intégration dans la matrice existante (sur le site d'implantation)¹³⁹. Malgré les quelques exemples de bioimpression de substituts cartilagineux qui existent, aucun n'est satisfaisant au niveau de la composition de la matrice extracellulaire et des propriétés mécaniques obtenues.

Toutes les expérimentations concernant la bioimpression de cartilage décrites dans ce manuscrit se sont faites en collaboration avec le laboratoire IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire) de Nancy en interaction forte avec Dr. Astrid Pinzano et Christel Henrionnet.

Les objectifs principaux sont dans un premier temps de réussir la bioimpression de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et d'engendrer *in situ* une différenciation chondrogénique de ces dernières, accompagnée d'une sécrétion de matrice extracellulaire caractéristique de ce tissu. Le deuxième but est de pouvoir garder les cartilages bioimprimés en culture assez longtemps, jusqu'à 56 jours, afin de pouvoir observer la sécrétion matricielle qui est longue à se mettre en place.

Pour tous les résultats présentés dans cette partie, les substituts cartilagineux ont été préparés suivant le protocole habituel (formulation, impression et polymérisation) et maintenus en culture pendant 28 ou 56 jours, en présence de milieu de culture supplémenté par de l'ITS (Insulin Transferrin Selenium) pour les contrôles négatifs ou supplémenté par un cocktail de facteurs de croissance (TGF- β 1 à une concentration de 10 ng/mL et/ou BMP-2 à une concentration de 50 ng/mL), et placés dans un incubateur en normoxie ou en hypoxie.

II.2 Résultats histologiques

Plusieurs colorations ont été utilisées : l'HES (Hématoxyline Eosine Safran) pour mettre en évidence la morphologie des cellules bioimprimées et leur répartition, le bleu alcian pour

démontrer la présence de glycosaminoglycannes sulfatés et le rouge Sirius pour prouver la sécrétion de collagène (non-spécifique à un type de collagène) par les cellules. Afin de mettre en évidence la sécrétion de collagène de type II, spécifique de la différenciation phénotypique correcte en cartilage hyalin, des marquages immunohistochimiques ont été effectués.

II.2.1 Comparaison des densités cellulaires d'ensemencement

De nombreuses publications sur l'ingénierie du cartilage évoquent des ensemencements de CSM à plusieurs millions de cellules/mL, souvent supérieur à 10 millions²¹³. Quelques autres utilisent des ensemencements plus faibles. En s'appuyant sur nos résultats de bioimpression de peau et notre formulation de bio-encre, nous avons lancé une première série d'expérimentation afin de vérifier la cytocompatibilité de notre bio-encre avec des cellules souches et apprécier leur développement sur une période de 28 jours en faisant varier la concentration de cellules par millilitre de bio-encre.

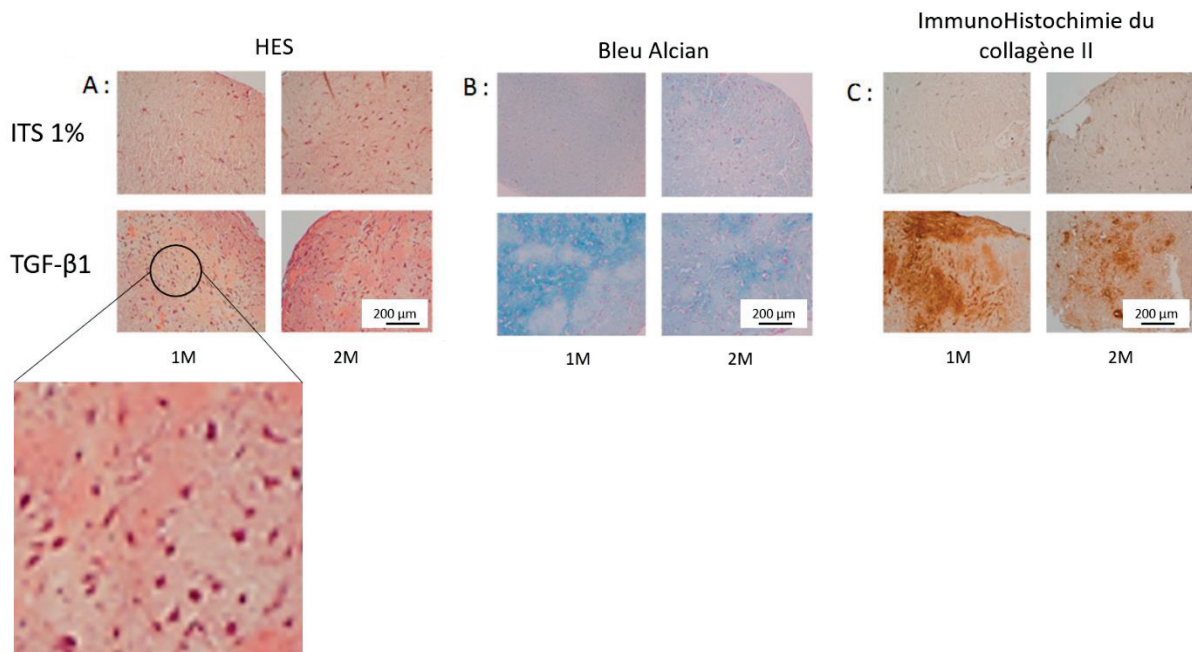


Figure 100. Caractérisation histologique des substituts cartilagineux 28 jours après impression avec 1 million de cellules/mL ou 2 millions de cellules/mL, traités ou non par du TGF-β1. A) Coloration HES. B) Coloration au bleu alcian. C) Immunohistochimie du collagène II. Coupe de 5 μm, barre d'échelle : 200 μm.

Tous les substituts cartilagineux traités avec de l'ITS, ne présentent que très peu de synthèse matricielle, les coupes histologiques apparaissent peu colorées. On remarque au contraire que dans les substituts traités avec du TGF-β1, les cellules sont toujours bien vivantes grâce à la coloration HES (encart zoomé sur la Figure 100) et qu'elles possèdent une

morphologie ronde caractéristique des CSM. La coloration par le bleu alcian démontre qu'une densité cellulaire de 1 million de cellules/mL est la plus adaptée à la sécrétion de glycosaminoglycanes. L'immunohistochimie du collagène II confirme une sécrétion plus importante de collagène II lors d'un ensemencement à 1 million de cellules/mL.

Ces résultats préliminaires mettent en évidence que l'utilisation d'une concentration cellulaire de 1 million de cellules/mL de bio-encre semble être la plus appropriée afin d'obtenir une sécrétion matricielle riche en collagène de type II et en protéoglycanes.

II.2.2 Effet du temps de culture

Les expérimentations suivantes ont été effectuées afin de déterminer les meilleures conditions de culture des substituts cartilagineux. Tout d'abord, l'étude de l'effet du temps de culture sur la sécrétion matricielle a été conduite. Il s'agit de comparer deux temps de culture différents et de conclure si un arrêt après 28 jours de maturation est suffisant ou s'il est nécessaire de garder les substituts jusqu'à 56 jours de maturation afin de mieux apprécier leur évolution. Pour cela, plusieurs analyses histologiques ont été conduites, l'une avec le bleu alcian pour la détection de glycosaminoglycanes sulfatés et l'autre avec le rouge sirius pour la détection de fibres de collagène.

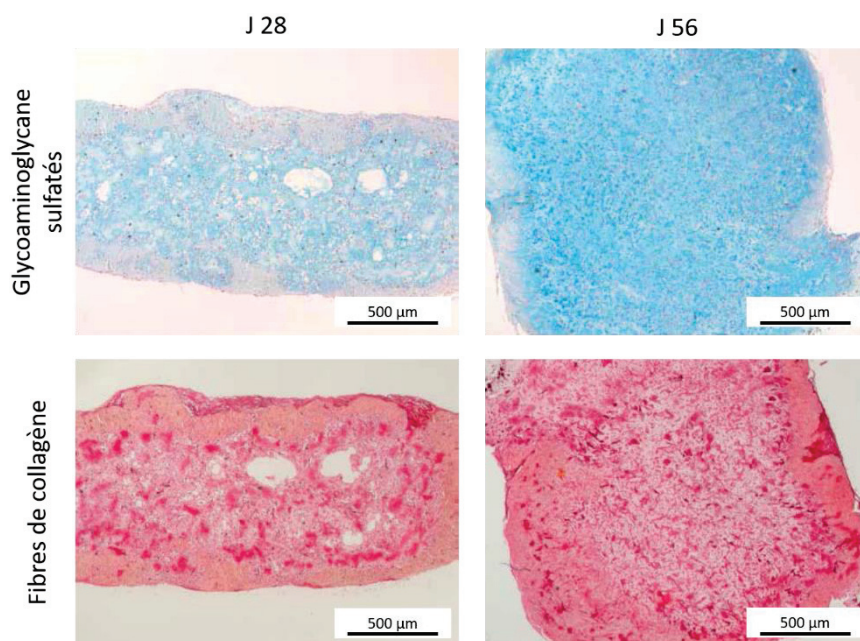


Figure 101. Caractérisation histologique des substituts cartilagineux bioimprimés à J28 et J56 avec une coloration par le bleu Alcian pour les glycosaminoglycanes sulfatées et par le rouge Sirius pour les fibres de collagène. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 500 µm.

Une légère différence d'intensité de la coloration a été constatée entre les deux temps de maturation. En effet, après 28 jours de maturation, les colorations par le bleu alcian et par le rouge Sirius sont légèrement moins intenses et plus hétérogènes, ce qui est synonyme d'une sécrétion matricielle de glycosaminoglycane et de collagène moins importante qu'après 56 jours de maturation. Afin de confirmer ces résultats une immunohistochimie du collagène II a été réalisée.

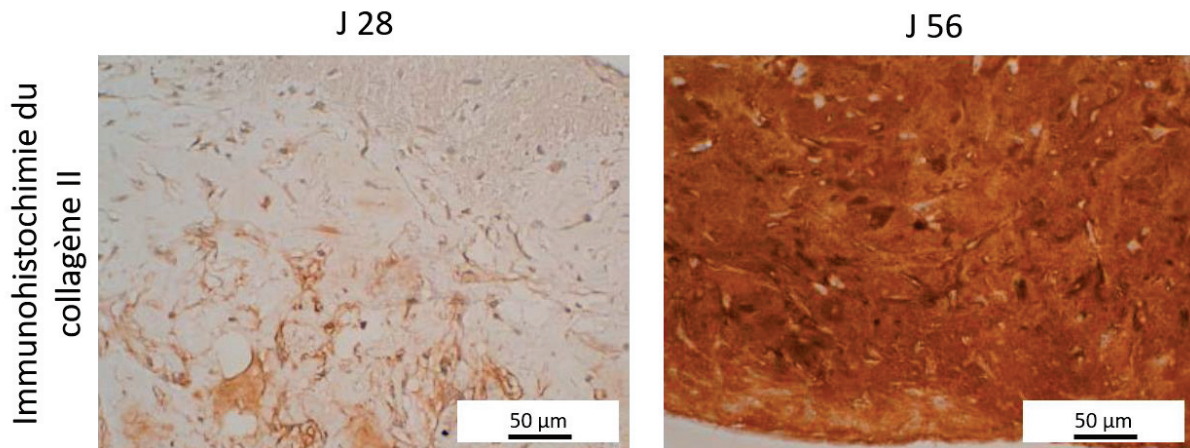


Figure 102. Caractérisation immunohistochimique du collagène II sur les substituts cartilagineux après 28 et 56 jours de maturation. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

La Figure 102 indique clairement une synthèse matricielle du collagène II beaucoup plus importante après 56 jours de culture. Cela s'explique par le fait que les cellules souches mettent du temps à proliférer et à se différencier en chondrocytes qui sont alors responsables de la sécrétion matricielle. Donc, pour les expérimentations suivantes, tous les substituts cartilagineux ont été conservés en culture pendant 56 jours. Afin de vérifier le développement cellulaire les substituts bioimprimés ont été arrêtés à 28 jours (contrôle) et à 56 jours de maturation (résultats présentés par la suite).

II.2.3 Effet des facteurs de croissance

La différenciation des CSM se fait sous l'influence de facteurs de croissance bien connus¹⁴⁴. Le milieu de culture basal contient de l'ITS (Insuline Transférine, Sélénium) auquel il faut rajouter des TGF- β (Transforming Growth Factor). Ils appartiennent à une très large famille de protéines qui contient entre autre le TGF- β 1 et TGF- β 3 ainsi que la BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) qui sont impliqués spécifiquement dans la transformation des CSM

en chondrocytes¹³⁷. Afin d'identifier le ou lesquels induisent le plus de synthèse matricielle, une étude comparative de l'influence de ces facteurs de croissance a été réalisée. Trois conditions de maturation des cubes bioimprimés ont été retenues : le milieu basal (ITS), puis celui-ci supplémenté avec du TGF- β 1 et enfin un milieu plus complet avec l'ajout de la BMP-2.

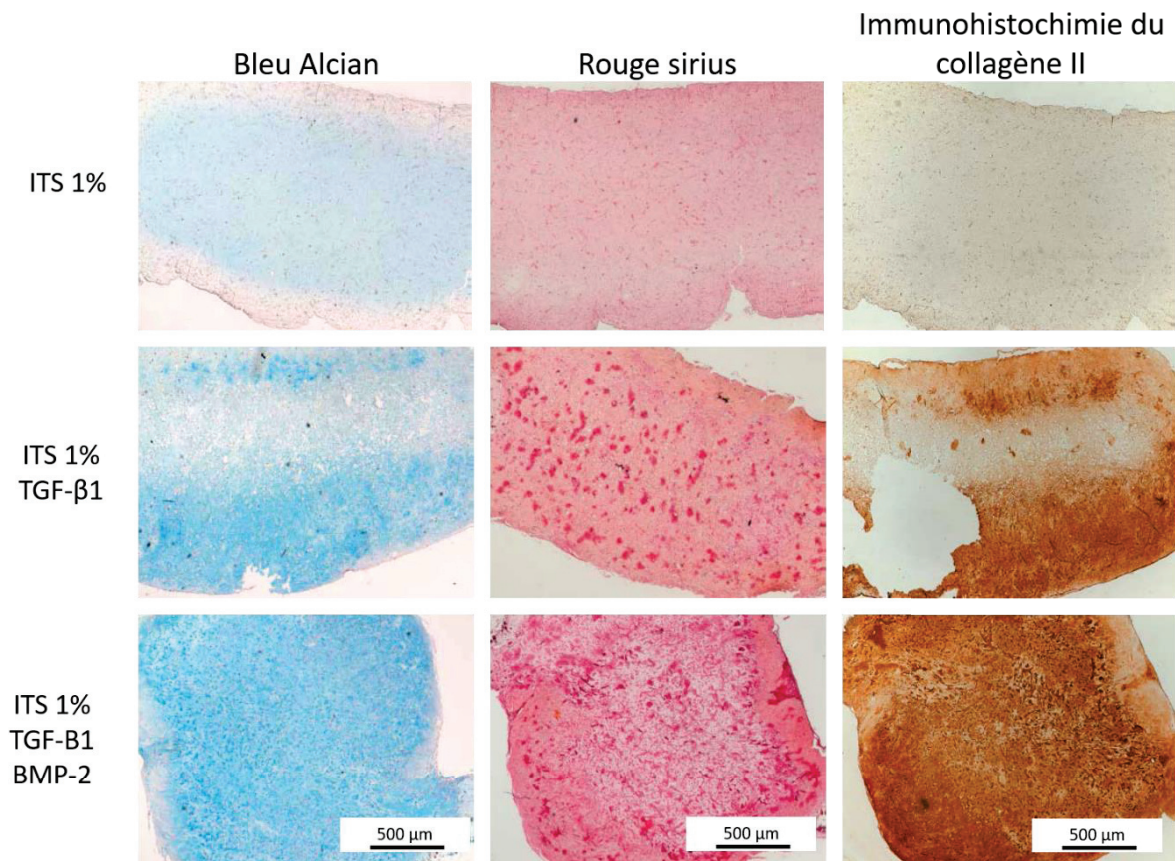


Figure 103. Caractérisation histologique après 56 jours de maturation (par le bleu alcian et le rouge sirius) et immunohistochimie du collagène II des substituts cartilagineux bioimprimés et traités avec de l'ITS, du TGF- β 1 et du BMP-2. Coupe de 5 μ m, barre d'échelle 500 μ m.

Le TGF- β 3 a été aussi testé mais les résultats ne sont pas présentés ici. Il a été trouvé qu'il induisait une plus forte synthèse de matrice après 28 jours de maturation mais que cet effet s'estompait et s'inversait pour les résultats à 56 jours.

Comme constaté sur la Figure 103, l'association TGF- β 1/BMP-2 semble être le cocktail idéal pour une synthèse matricielle homogène des glycosaminoglycane et du collagène II. En d'autres termes, la BMP-2 potentialise les effets du TGF- β 1.

II.2.4 Effet de l'hypoxie

L'utilisation d'une culture de chondrocytes maintenue en hypoxie (1% O₂ et 5% CO₂) est importante dans la conservation d'un phénotype chondrogénique²¹⁴. Une étude de maturation en condition d'hypoxie des substituts bioimprimés a donc été effectuée.

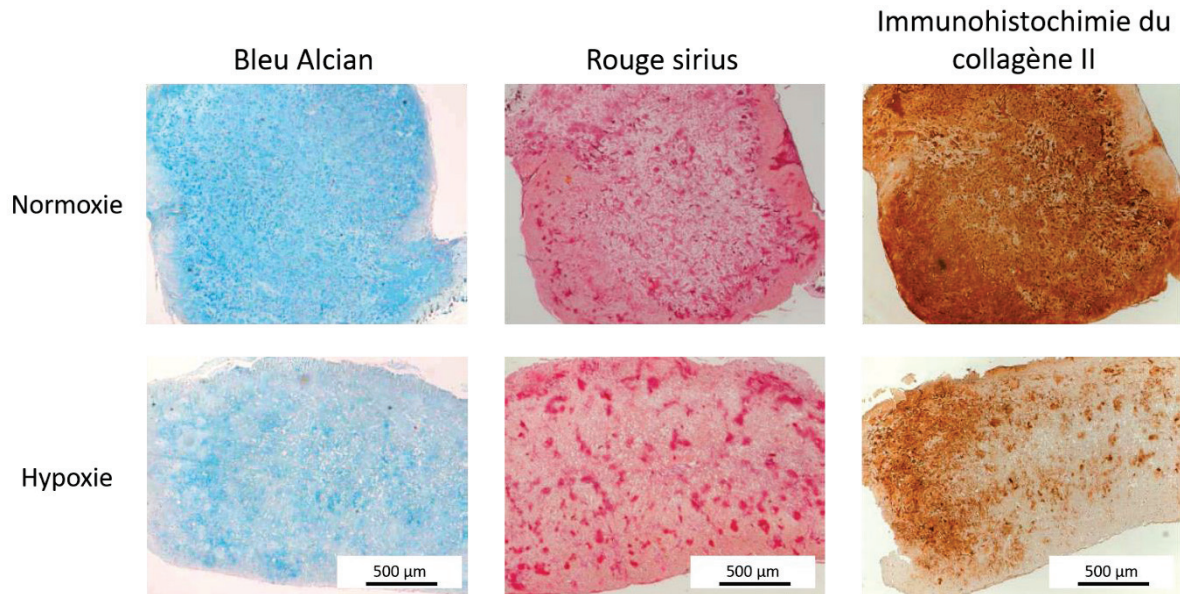


Figure 104. Caractérisation histologique (par le bleu alcian et le rouge sirius) et immunohistochimie du collagène II des substituts cartilagineux maintenus en normoxie ou en hypoxie pendant 56 jours. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 500 µm.

Par rapport à une culture en normoxie classique, le placement en hypoxie des substituts cartilagineux n'induit pas d'effet positif sur la production de matrice extracellulaire. Au niveau de la synthèse des glycosaminoglycanes, une diminution de l'intensité de la coloration au bleu alcian indique que l'hypoxie n'induit pas plus de synthèse matricielle. Ces résultats histologiques sont à prendre avec prudence puisque l'hypoxie, dans le cadre de substituts cartilagineux, apporte des bénéfices au niveau cellulaire et phénotypique²¹⁴. L'analyse histologique n'est donc pas adaptée à l'infirmer ou à la confirmation de l'avantage de l'utilisation de l'hypoxie sur l'obtention de cartilage par bioimpression avec la conservation d'un phénotype cartilagineux.

Afin de mesurer le phénotype des CSM dans nos substituts cartilagineux, une analyse phénotypique est en cours au laboratoire IMoPa à Nancy. L'étude de l'expression de plusieurs gènes d'intérêt est réalisée par RT-qPCR pour vérifier la différenciation des CSM en chondrocytes.

II.3 Conclusion et perspectives

Ces premiers résultats démontrent la faisabilité de l'obtention de substituts cartilagineux grâce à la bioimpression par extrusion de cellules souches mésenchymateuses. La formulation de la bio-encre est identique à celle utilisée pour la bioimpression de derme, ce qui indique une certaine versatilité de cette dernière et confirme qu'elle offre un environnement favorable aux cellules primaires et aux cellules souches.

L'optimisation des conditions de préparation et de culture nous ont permis de déterminer les conditions les plus favorables de production de ces substituts. C'est grâce aux analyses histologiques que nous avons pu arriver à des conclusions pertinentes :

- Une synthèse homogène et intense de matrice extracellulaire notamment de glycosaminoglycanes qui est un élément essentiel du cartilage, et de collagène de type II. Ce dernier est un bon indicateur que les cellules conservent leur phénotype chondrogénique puisque seul les chondrocytes sont capables de sa sécrétion²¹⁵.
- La sécrétion du collagène II qui indique une bonne différenciation chondrogénique potentialisée par une culture en présence des facteurs de croissance TGF- β 1 et BMP-2.
- L'impact du temps de culture a aussi son importance sur la qualité de la synthèse matricielle, et c'est à 56 jours de culture qu'elle est la plus importante.

Cependant, plusieurs autres analyses doivent être réalisées afin notamment de vérifier la stabilité du phénotype cellulaire obtenu. Il est impératif pour l'obtention de substituts cartilagineux que les cellules différenciées (en chondrocytes) conservent ce phénotype chondrogénique. Cela pourrait se faire grâce à une analyse phénotypique ou plus simplement par une coloration par le rouge alizarine afin d'écartier tout dépôt calcique (et donc exclure une différenciation en ostéocytes). Il serait aussi intéressant de déterminer exactement le rôle de l'hypoxie, qui est utilisé en routine pour la culture *in vitro* de substituts cartilagineux, mais qui a un impact peu probant sur nos résultats. D'autres études sur la résistance mécanique de nos substituts devront aussi être conduites afin de constater qu'elles sont proches des valeurs physiologiques des propriétés mécaniques du cartilage (un module d'Young compris entre 5 et 30 MPa¹⁴⁰).

III. Bioimpression de tissus microvascularisés

III.1 Contexte et objectifs

La vascularisation, essentielle à tous les tissus du corps humain (sauf le cartilage et la cornée), est l'élément clé de la réussite du passage de tissus bioimprimés *in vitro* au stade clinique pour une transplantation¹⁴. En effet, l'obtention de tissus de taille pertinente (cm^3) ne peut se faire que grâce à la mise en place d'un système vasculaire à l'intérieur même de l'objet afin d'apporter tous les nutriments et les gaz nécessaires à la survie des cellules présentes en profondeur dans le tissu^{216, 217}.

La problématique est la suivante : la technologie de bioimpression 3D permet-elle la formation de microvascularisation fonctionnelle? Mais également, le transfert de la technique de bioimpression d'un cube contenant des fibroblastes de quelques cm^3 , à un tissu avec des épaisseurs supérieures à 1cm, est-il possible ?

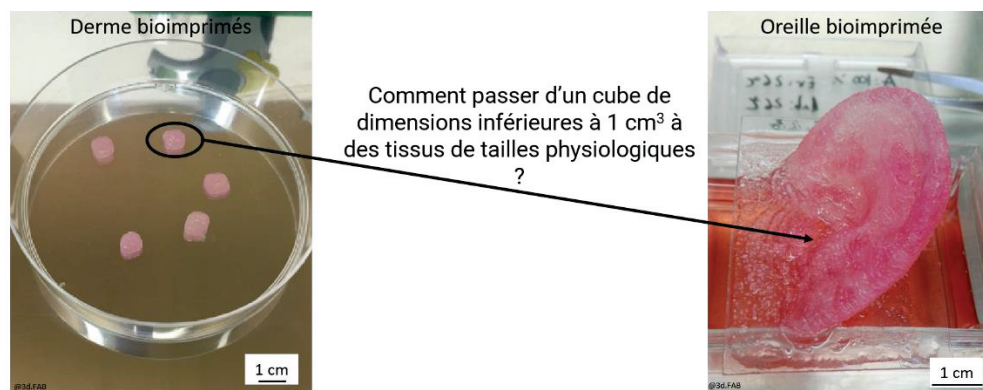


Figure 105. Illustration de la problématique du passage d'un cube à un tissu bioimprimé plus épais, à gauche des dermes bioimprimés et à droite un substitut d'oreille humaine adulte.

Le système vasculaire est composé de vaisseaux de différents diamètres, allant de plusieurs centimètres (artères), à quelques microns (capillaires). Ces échelles de grandeurs très différentes induisent aussi une différence morphologique et organisationnelle à l'intérieur même de l'endothélium vasculaire (chapitre 1).

L'objectif dans cette partie de ces travaux de thèse est d'induire la mise en place d'un réseau microvasculaire pendant la phase de maturation du tissu. L'approche d'auto-assemblage des tissus est ici privilégiée pour aborder cette nouvelle thématique²¹⁸.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la non-cytotoxicité de la bioencres pour les cellules endothéliales grâce à un encensement de celles-ci dans un objet

bioimprimé. Ensuite, a été testé la co-impression de deux types cellulaires dans le même objet, l'un servant à la formation d'un tissu grâce à une sécrétion matricielle (fibroblastes), l'autre à la mise en place du réseau microvasculaire (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells = HDMEC-GFP, qui sont des cellules endothéliales du derme¹⁵⁹). Cette expérimentation a pour but principal de se rapprocher le plus possible de l'organisation d'un tissu *in vivo* afin de pouvoir considérer (ou non) la mise en place d'un réseau microvasculaire fonctionnel à l'intérieur d'un tissu en culture *in vitro*. Enfin, nous avons fait varier la source cellulaire de ces cellules endothéliales afin d'observer la différence de comportement au sein de la bio-encre pendant la phase de maturation grâce à l'utilisation d'HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell).

III.2 Microvascularisation des objets imprimés

Afin de débiter cette nouvelle thématique, plusieurs étapes ont dû être franchies afin de valider les preuves de concept au fur et à mesure de la complexification de notre modèle.

III.2.1 Co-impression de cubes tests

III.2.1.1 HDMEC-GFP

Afin d'étudier plus précisément l'intégration et le développement des HDMEC-GFP dans un environnement en 3D, elles ont été intégrées directement à la formulation de la bio-encre. Dans l'optique d'obtenir un tissu microvascularisé, des fibroblastes ont également été intégrés et c'est grâce à leur sécrétion rapide (et déjà caractérisée) de matrice extracellulaire que nous obtenons la formation d'un tissu support similaire à un environnement physiologique. En mettant en place ces conditions physiologiques, l'objectif est premièrement de constater la formation d'un tissu (grâce aux fibroblastes) et dans un deuxième temps, la mise en place d'un réseau vasculaire (grâce aux cellules endothéliales). L'ensemencement des cellules est de 625 000 cellules/mL pour les HDMEC-GFP et de 125 000 cellules/mL pour les fibroblastes. Le protocole habituel de formulation, d'impression, de polymérisation et de maturation a été suivi (chapitre 2).

III.2.1.1.1 Colorations histologiques

Comme pour les autres tissus, il est nécessaire de contrôler grâce à des colorations de routine la maturation des cellules et leur organisation en tissu. Les colorations par l'Hématoxyline-Eosine (HE) et par le trichrome de Masson ont donc été utilisées.

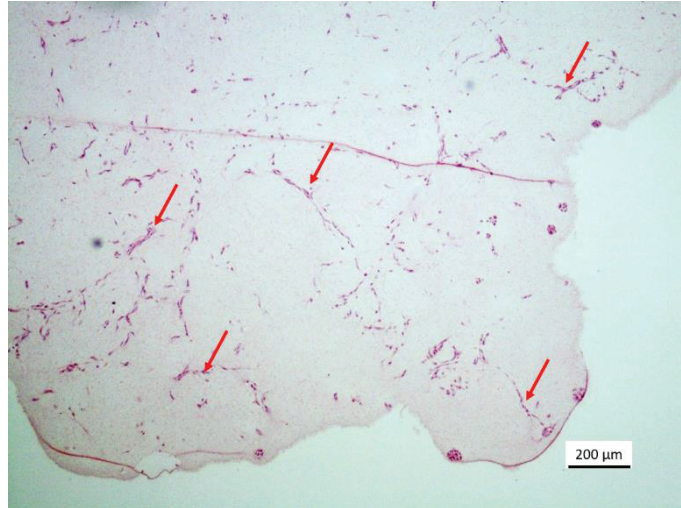


Figure 106. Caractérisation histologique par l'HE après 31 jours de maturation. Les flèches rouges pointent les structures d'intérêts. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 200 µm.

La coloration HE confirme la présence d'un réseau cellulaire bien réparti à l'intérieur du tissu après 31 jours de maturation. Des structures continues, indiquées par les flèches rouges sur la Figure 106, apparaissent clairement, laissant supposer une organisation spécifique de ces cellules.

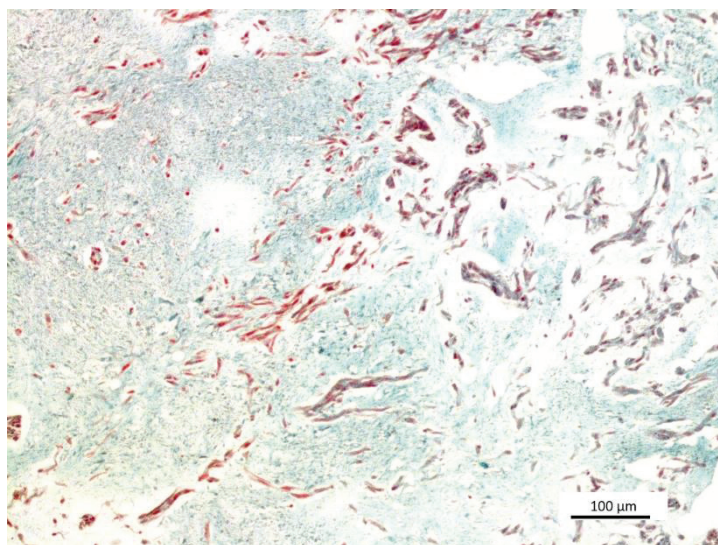


Figure 107. Caractérisation histologique par le trichrome de Masson après 31 jours de maturation. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 100 µm.

La coloration par le trichrome de Masson indique une sécrétion importante de matrice extracellulaire comme l'indique la coloration verte sur la Figure 107. Cette sécrétion matricielle est directement liée à la présence de fibroblastes qui sont à même de produire leur propre microenvironnement, ainsi qu'un tissu de soutien au potentiel développement endothéliale.

III.2.1.1.2 Fluorescence GFP des cellules endothéliales

Le suivi des tissus bioimprimés au cours de la maturation est impossible par microscopie optique (Figure 108-Gauche) car l'épaisseur est trop importante. Pour une indication en temps réel du devenir des cellules, c'est le suivi de la GFP des HDMEC qui est utilisée (Figure 108-Droite).

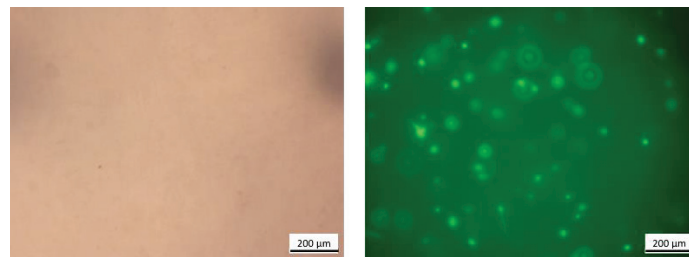


Figure 108. Observation des cubes bioimprimés à J1 par microscopie optique. A gauche, en lumière visible, et à droite en fluorescence. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 200 µm.

Après 1 jour de maturation, les cellules sont mises en évidence dans leur répartition homogène et certaines sont adhérentes (à l'intérieur de la bio-encre) avec des pseudopodes visibles, signe de leur attachement au sein du cube.

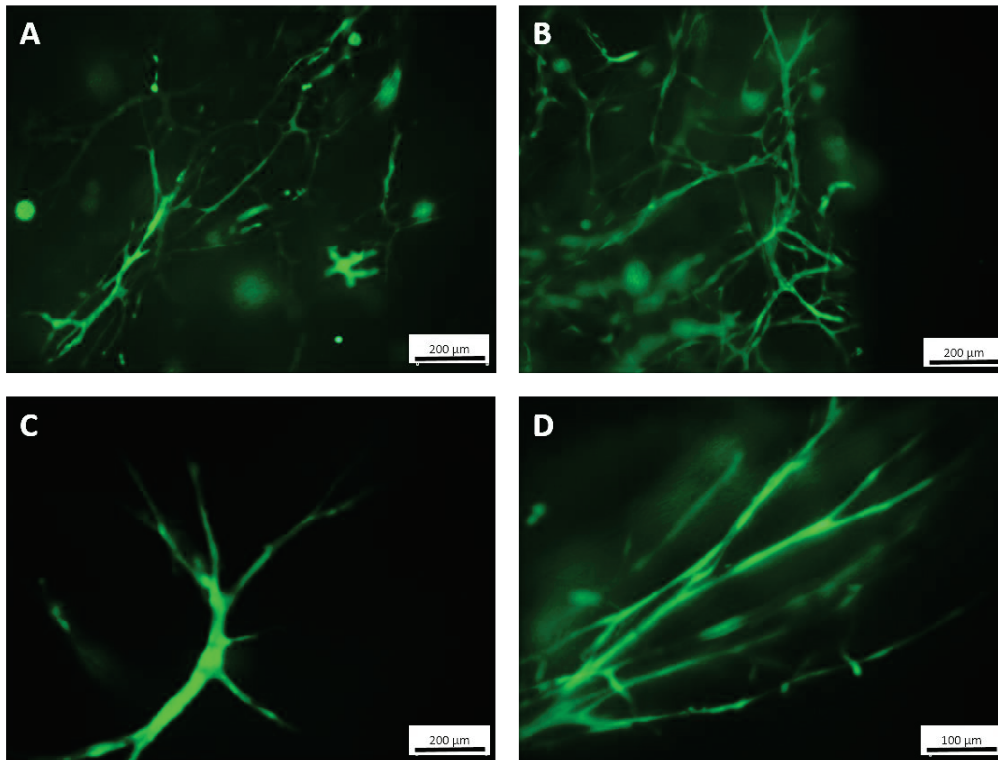


Figure 109. Observation par microscopie de fluorescence des HDMEC-GFP après 8 jours de maturation.

Après 8 jours de maturation, un réseau en 3D des HDMEC a été clairement observé par microscopie de fluorescence. Les structures tubulaires communiquent entre elles. La Figure 109 montre distinctement quelques exemples de structures retrouvées dans les objets bioimprimés.

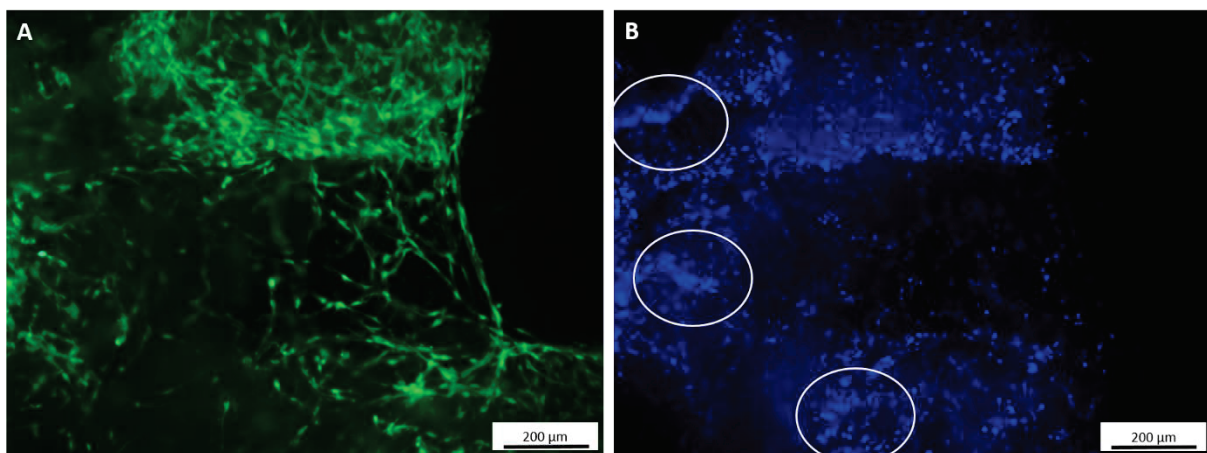


Figure 110. A) Observation des HDMEC-GFP par microscopie optique de fluorescence après 14 jours de maturation. B) marquage des noyaux cellulaire par DAPI, les zones entourées correspondent aux zones d'intérêt avec les noyaux de fibroblastes.

Après 14 jours de maturation, l'observation macroscopique (à l'œil nu) indique un début de rétractation des cubes tests, signifiant un développement matriciel provoqué par les

fibroblastes et confirmé par la coloration par le trichrome de Masson. La destruction manuelle (découpe de fines tranches de 1 mm de cube grâce à un scalpel) pour l'observation plus approfondie par microscopie de fluorescence a été nécessaire. Sur la Figure 110-A, il a été observé un fort développement des HDMEC-GFP en un réseau en 3D. La coloration par le DAPI (Figure 110-B) discrimine les noyaux des HDMEC-GFP et des fibroblastes notamment dans les zones indiquées par un cercle blanc.

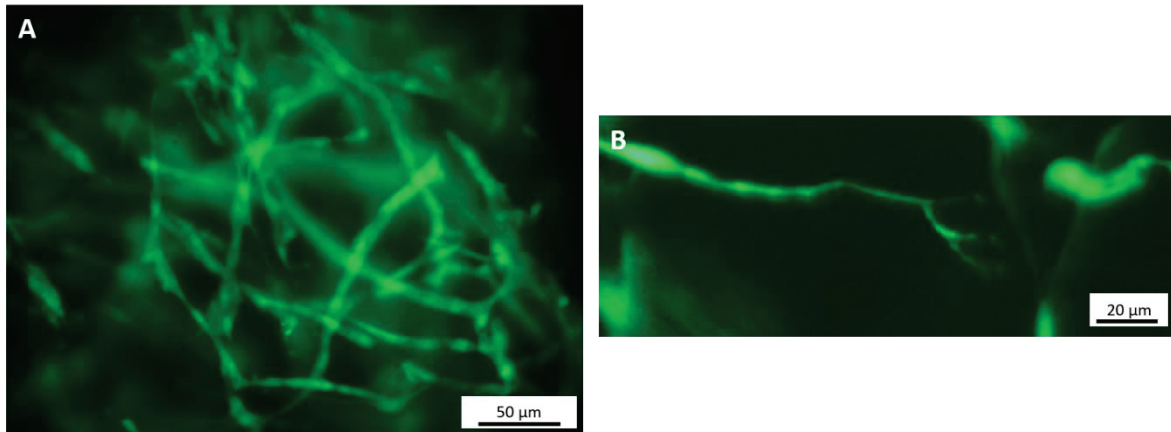


Figure 111. Observation des HDMEC-GFP par microscopie de fluorescence après 31 jours de maturation.

Après 31 jours de maturation, le réseau cellulaire de HDMEC-GFP est réparti de manière homogène. Les structures observables sont toujours tubulaires avec un diamètre plus régulier qu'après 14 jours de maturation, laissant supposer une organisation en un réseau fonctionnel.

III.2.1.1.3 Marqueurs endothéliaux

Afin de déterminer plus précisément l'organisation fonctionnelle d'un réseau vasculaire en 3D, des marqueurs endothéliaux spécifiques ont été choisis.

Tout d'abord l'EN4 a été utilisé. Cet anticorps cible les épithéliums vasculaires de petits comme de grands diamètres en reconnaissant la protéine CD31 (Cluster de Différenciation 31) spécifique des cellules endothéliales. Cette protéine étant exprimée fortement dans les jonctions intercellulaires des vaisseaux, c'est aux pourtours des cellules que le marquage sera le plus intense.

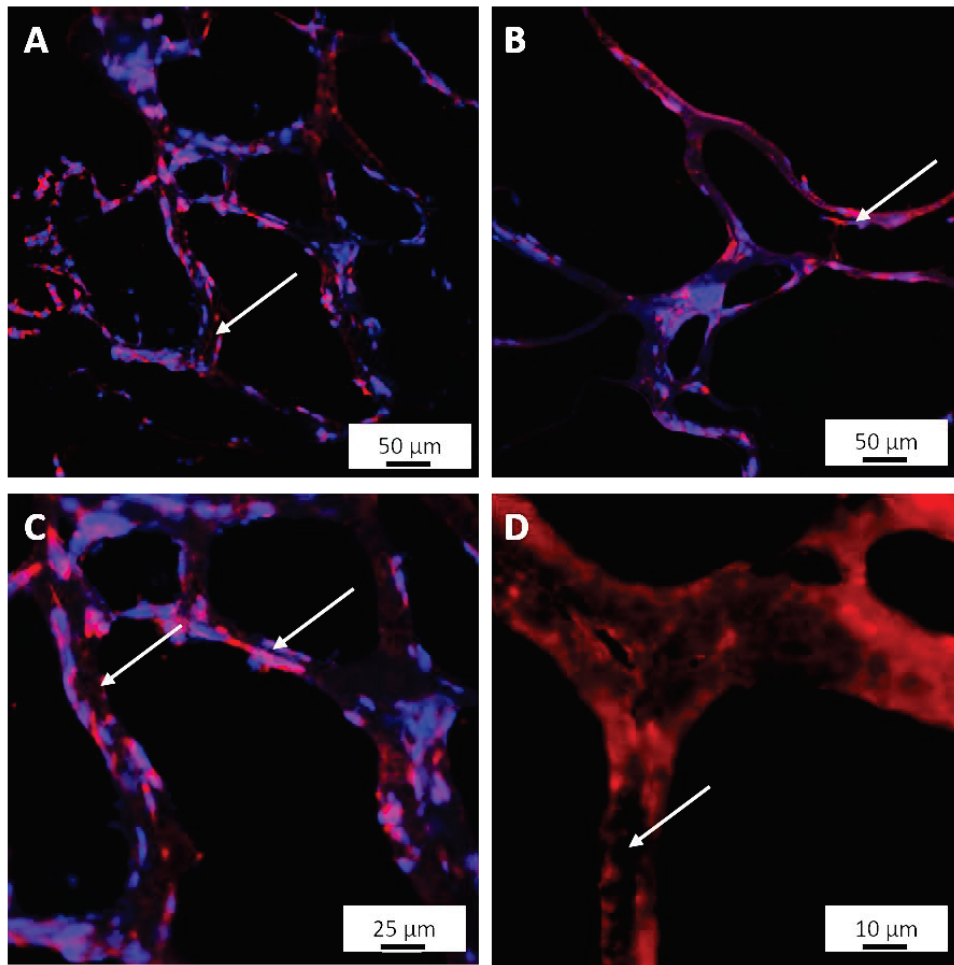


Figure 112. Caractérisation par immunofluorescence du réseau vasculaire grâce au marqueur EN4, les lumens observables sont indiqués par des flèches blanches. A, B et C) Marquage EN4 des cellules endothéliales en rouge et marquage des noyaux en bleu (DAPI), barre d'échelle : 50 et 25 μm . D) Mise en évidence du marquage d'une structure tubulaire par EN4. Coupes de 5 μm , barre d'échelle 10 μm .

Après 14 jours de culture, les cubes ont été placés dans un milieu cryopréservant afin d'effectuer des marquages de l'EN4 par immunofluorescence. La Figure 112 indique distinctement la mise en place d'un réseau vasculaire en 3D avec une visualisation claire des lumens formés.

Pour corroborer ces premiers immunomarquages, l'anticorps anti-VWF (Von Willebrand Factor) a été utilisé. Le facteur de Von Willebrand est synthétisé par les cellules endothéliales puis stocké par ces dernières dans leurs cytoplasmes à l'intérieur des corps de Weibel Palade¹⁶¹. *In vivo*, il intervient notamment dans la maintenance de l'hémostase en promouvant l'adhésion des plaquettes lors d'une blessure mais il est aussi présent *in vitro* et cela en fait une bonne cible pour vérifier la bonne fonctionnalité du réseau vasculaire créé.

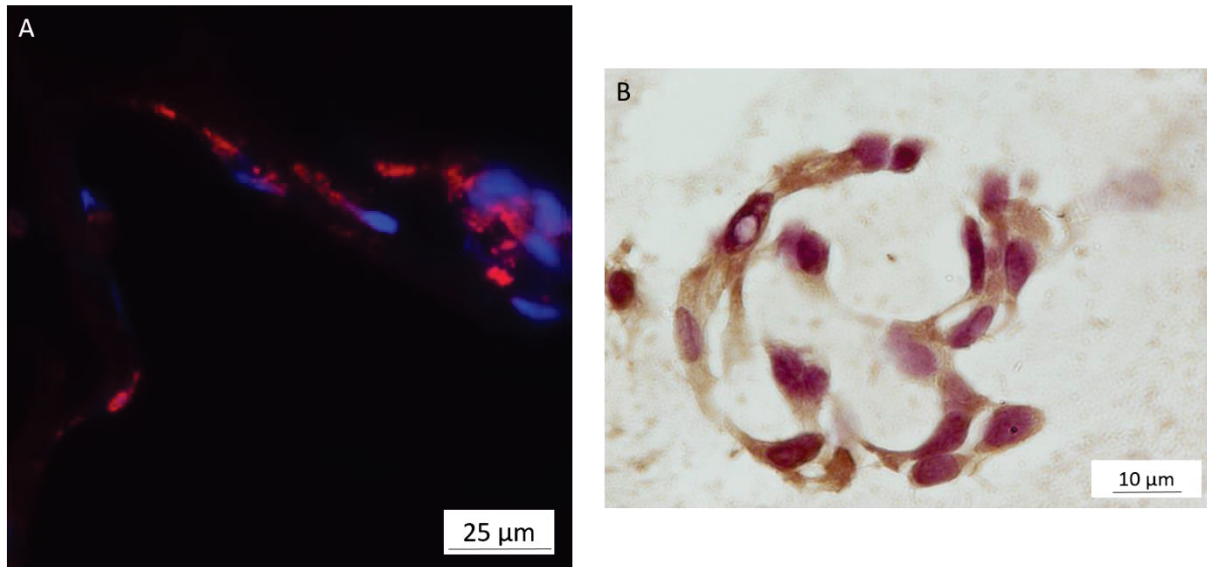


Figure 113. A) Caractérisation par immunofluorescence des cellules endothéliales grâce au marqueur VWF en rouge, les noyaux des cellules apparaissent en bleu (DAPI). B) Caractérisation immunohistochimique grâce au marqueur VWF en brun. Coupe de 5 μm , barre d'échelle 25 μm et 10 μm .

Après 14 jours de culture, le même protocole que pour le marquage EN4 a été utilisé. Comme observé sur la Figure 113-A, une forte intensité de coloration apparaît dans le cytoplasme cellulaire sous forme de granules rouges, témoins de la présence du facteur VWF à l'intérieur des cellules endothéliales. Le marqueur VWF a également été utilisé en immunohistochimie en paraffine afin de s'assurer de sa spécificité (Figure 113-B). Les cellules endothéliales apparaissent clairement avec un cytoplasme coloré en brun. Cela confirme que les cellules endothéliales ont un fonctionnement physiologique. Il a été possible d'identifier un certain nombre de fibroblastes dû à leur absence de marquage spécifique du VWF (résultats non présentés).

III.2.2 Ensemencement des HDMEC-GFP

L'obtention d'une microvascularisation grâce aux HDMEC a été prouvée. Il a été décidé d'expérimenter si ces cellules pouvaient donner des structures vasculaires de diamètres plus important : de la macro-vascularisation. Pour ce faire, une bio-encre acellulaire a été formulée, imprimée (Figure 114) et polymérisée suivant le protocole défini (chapitre 2). Ensuite, les HDMEC-GFP ont été ensemencées manuellement sur la surface du cube à une concentration de 2 millions de cellules/mL, laissées à température ambiante pendant 15 minutes pour permettre l'adhésion des cellules à l'objet, puis mises en culture (submergée)

suivant le protocole établi (chapitre 2). L'objet consiste en un cube ouvert rempli par une grille qui forme des canaux continus verticaux de 1,5 mm de diamètre.

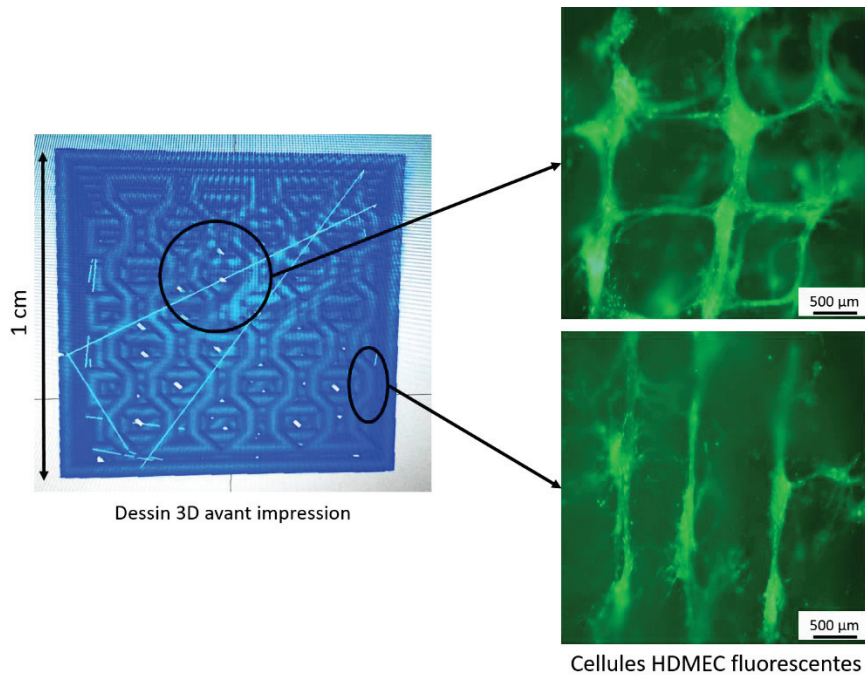


Figure 114. A gauche, le dessin en 3D de l'objet à imprimer (motif de remplissage : nid d'abeille 50%). A droite, après 9 jours de maturation, observation par microscopie de fluorescence du réseau cellulaire, barre d'échelle 500 μm .

Après 9 jours de maturation, il a été constaté la mise en place d'un réseau en 3D des HDMEC-GFP. Ce réseau semble être connecté et continu. La première conclusion est que les cellules adhèrent et se développent à la surface de l'objet (Figure 114). Il n'a pas été constaté de migration de celles-ci à l'intérieur des filaments de l'objet et leur répartition est hétérogène dû à un dépôt manuel. La difficulté d'observation de la globalité de l'objet de taille centimétrique rend l'observation, pendant le temps de maturation, compliquée. L'apparence sur la Figure 114 d'un réseau interconnecté, n'en fait pas forcément un réseau vasculaire fonctionnel. Les cellules se sont développées autour des filaments de bio-encre, ne laissant très certainement pas de lumen caractéristique d'un vaisseau. De plus, la continuité attendue des structures tubulaires verticales n'est pas constatée.

III.2.3 HUVEC

L'utilisation d'HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) dans l'étude de la vascularisation est incontournable. L'objectif principal est de comparer leur comportement dans un objet bioimprimé par rapport aux HDMEC. Les mêmes conditions d'impression et de

polymérisation ont été utilisées (chapitre 2). Pour ce qui est de la maturation, elle s'est déroulée en condition statique mais le milieu de culture a dû être adapté à la culture des HUVEC. Après plusieurs contrôles en 2D avec un mélange représentatif de fibroblastes/HUVEC, il a été décidé que le milieu de culture des tissus serait de 50% v/v de DMEM et 50% v/v d'EGM-2 (Endothelial Growth Medium). Ces sont les proportions qui garantissent une croissance équivalente pour les fibroblastes et les HUVEC cultivés conjointement dans les proportions utilisées pour leur bioimpression (test réalisé en interne). Au niveau des concentrations cellulaires, il a été décidé de garder les mêmes proportions qu'avec les HDMEC-GFP, soit 125 000 fibroblastes/mL de bio-encre et 625 000 HUVEC/mL de bio-encre afin d'avoir un point de comparaison. Les mêmes colorations et marquages que pour les HDMEC-GFP ont été réalisés.

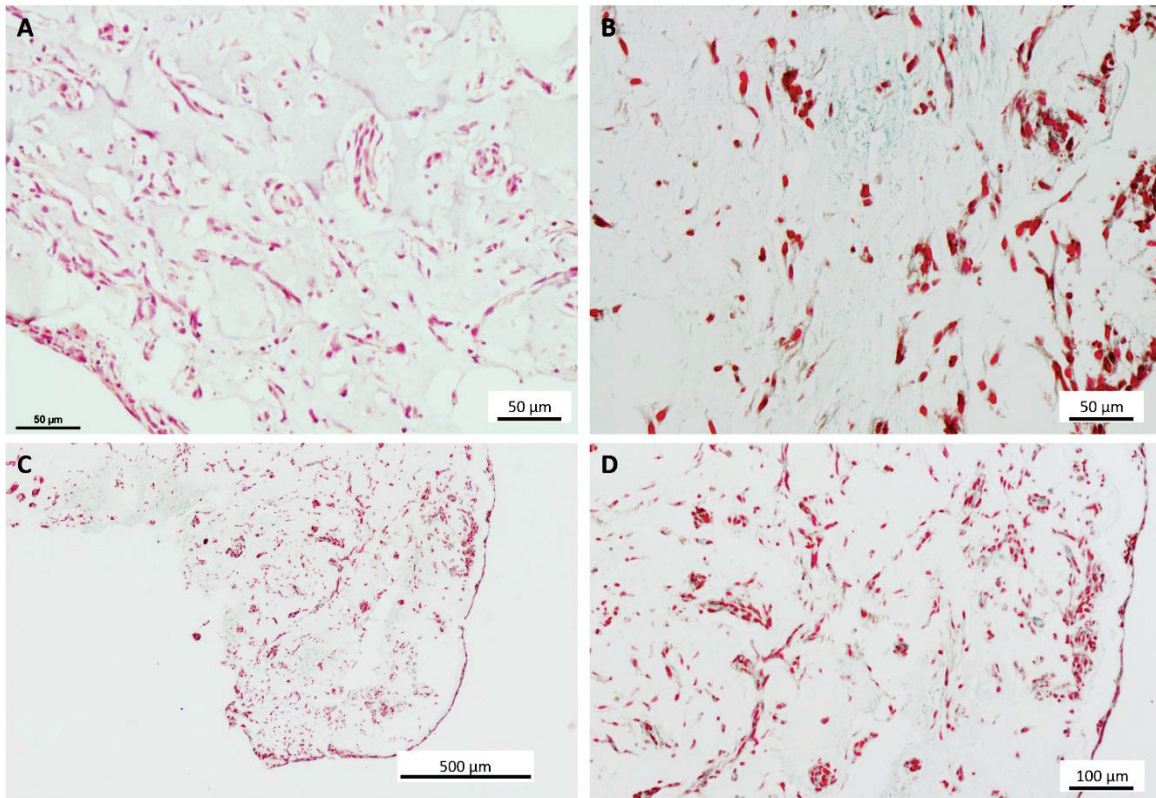


Figure 115. A) Caractérisation histologique HE après 31 jours de maturation. B, C et D) Caractérisation histologique à différents grossissements par le trichrome de Masson après 31 jours de maturation des tissus fibroblastes/HUVEC. Coupe de 5 μ m.

La coloration HE (Figure 115-A) montre une bonne répartition des cellules à l'intérieur du tissu avec des structures similaires à celles déjà observées avec les HDMEC-GFP. En ce qui concerne le trichrome de Masson, la coloration verte apparaît comme peu intense (Figure 115-B, C, D). L'objet est visuellement rétracté, mais cela ne vient a priori pas d'une sécrétion matricielle. L'hypothèse la plus probable est que les HUVEC se développent de manière

anarchique et en grande quantité gênant ainsi la croissance des fibroblastes qui ne peuvent pas sécréter de matrice extracellulaire.

Afin d'identifier clairement s'il y a une organisation des cellules endothéliales, un immunomarquage à l'EN4 a été réalisé.

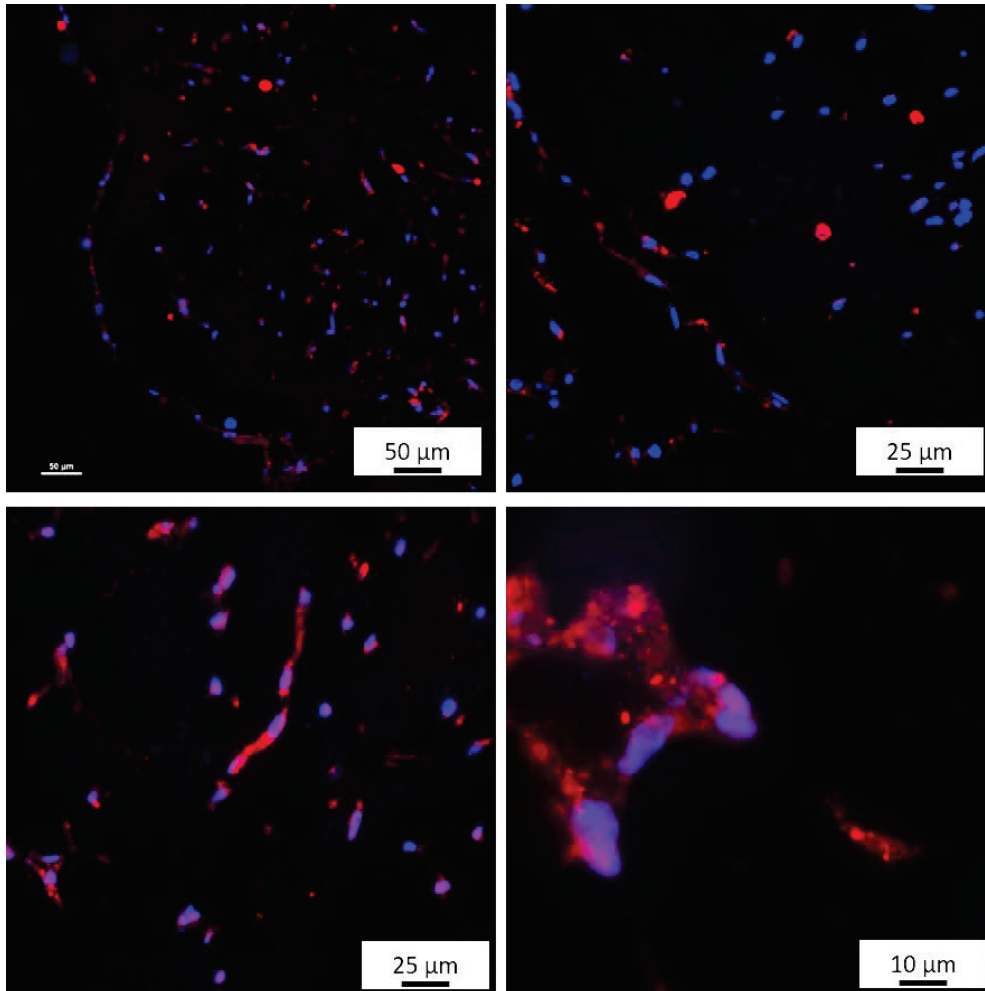


Figure 116. Caractérisation par immunofluorescence du réseau vasculaire grâce à l'anticorps EN4. Marquage par l'EN4 des cellules endothéliales en rouge et marquage des noyaux en bleu (DAPI). Coupe de 5 µm, barre d'échelle : 50, 25 µm et 10 µm.

La mise en place d'un réseau vasculaire grâce aux HUVEC est beaucoup moins évidente qu'avec les HDMEC (Figure 116). En effet, les structures semblent continues mais peu nombreuses et l'intensité de fluorescence est bien moins importante que sur la Figure 112. La concentration des cellules est importante mais elles sont loin d'être organisées entre elles. De plus, par immunofluorescence, il a été impossible d'identifier des fibroblastes, c'est-à-dire la présence de noyaux (grâce au DAPI) non associés à un marquage par l'EN4.

Ces premiers résultats de l'utilisation des HUVEC dans notre encre n'ont pas donné entière satisfaction. D'une part, la sécrétion de matrice est faible ce qui indique que le tissu

ne s'est pas correctement développé. Cela a certainement eu pour incidence d'inhiber la croissance des fibroblastes par manque de structuration interne. D'autre part, les HUVEC qui expriment toujours le CD31 puisque le marquage à l'EN4 est positif, ne semblent pas s'être organisés entre eux. La faible intensité de l'EN4 ainsi que le manque de continuité des structures présentent laissent penser que le réseau vasculaire ne s'est pas développé correctement.

Les HUVEC ont été utilisés avec l'objectif d'obtenir une comparaison avec l'utilisation des HDMEC. Les HUVEC sont utilisés entre autres pour l'endothélialisation de structures vasculaires de diamètres variables²¹⁹. Le but ici était de constater la formation d'une macrovascularisation c'est-à-dire de structures tubulaires avec des diamètres supérieurs par rapport aux HDMEC. Ces résultats peuvent s'expliquer par une proportion de fibroblastes/HUVEC qui n'est peut-être pas adapté. Il semblerait que dans la littérature, plusieurs études de co-culture en 3D de fibroblastes et d'HUVEC utilisent des ratios inverses, plus de fibroblastes et moins d'HUVEC (entre 8 : 1 et 4 : 1)^{220,221}.

III.3 Maturation dans un environnement dynamique : utilisation d'un bioréacteur

Comme nous l'avons vu précédemment, le changement d'échelle des substituts corporels est indispensable, nous nous sommes donc penchés sur cette problématique en essayant de cultiver des objets de tailles supérieures (8 cm^3) grâce à une maturation en condition dynamique.

L'utilisation d'un bioréacteur n'est plus à démontrer pour la maturation de tissus biofabriqués²²². L'objectif ici est de mettre en place un protocole de maturation d'un objet bioimprimé de grande taille en milieu dynamique, afin de favoriser le développement de la microvascularisation. Le dessin en 3D de cet objet est un cube mesurant 8 cm^3 , fermé sur les côtés et rempli par un grillage traversant (144 trous d'environ 1 mm de diamètre, dessin 3D Figure 122) (Figure 117).

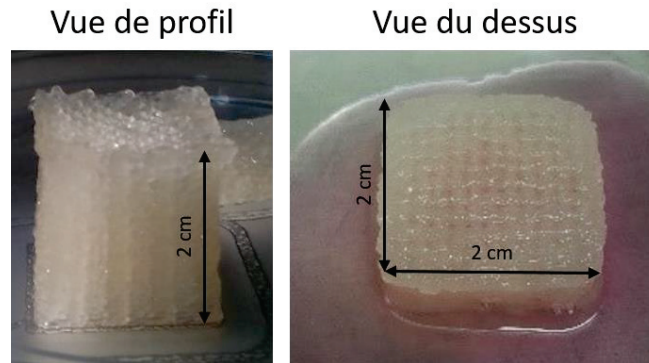


Figure 117. Photographie de profil et de face des gros objets bioimprimés grâce à la bio-encre contenant les fibroblastes et les HDMEC-GFP.

Ce cube a été formulé avec la bio-encre habituelle (fibroblastes et HDMEC), puis imprimé, et polymérisé de la même manière que les cubes tests (chapitre 2).

III.3.1 Cube Statique

Cette première itération a pour objectif un contrôle négatif vis-à-vis de la maturation dynamique, c'est-à-dire que l'on prendra comme référence négative cet objet mûri comme un cube test en condition statique. Le but ici est d'imprimer un objet de plus grosse taille, contenant des cellules endothéliales (HDMEC-GFP) et des fibroblastes, et de le faire mûrir dans les mêmes conditions que les cubes tests afin de comparer et d'identifier l'impact des conditions de culture dynamique sur la maturation de tissus bioimprimés de grande taille. Cette expérience de contrôle sans flux, a permis de conclure que le tissu final conservait très peu sa structure interne initiale et que très peu de structures tubulaires étaient présentes dans l'objet. De plus, la rétractation est normalement évidente lorsqu'un tissu contient des fibroblastes matures, elle apparaît ici de manière très faible : 10% seulement de sa taille initiale.

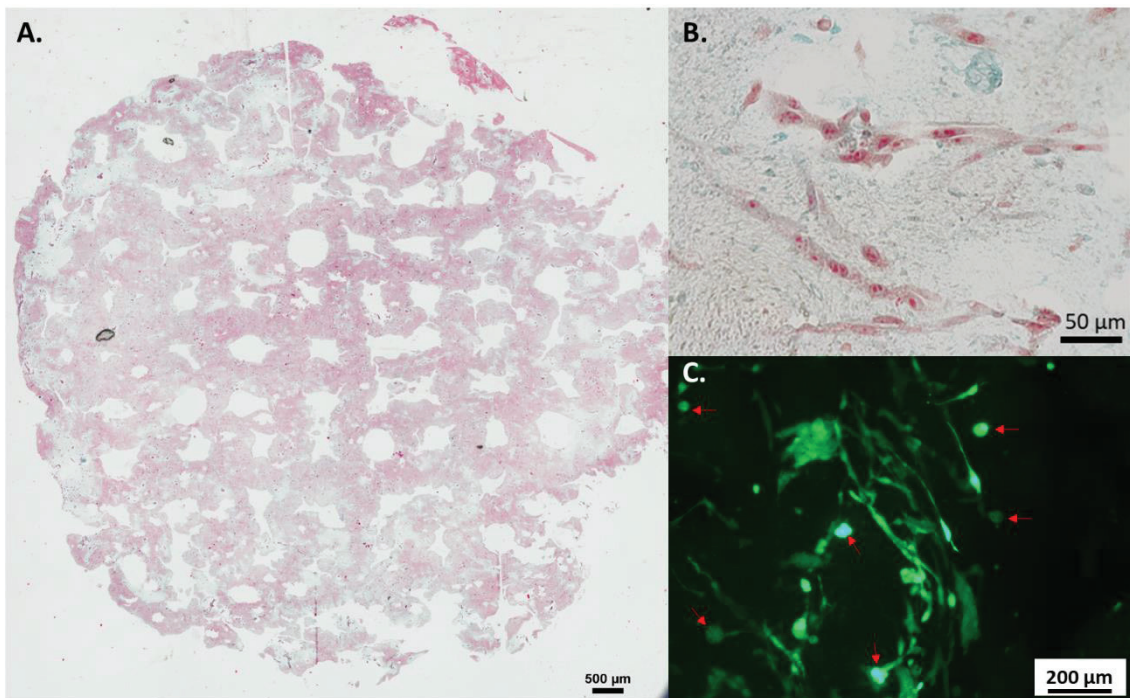


Figure 118. Caractérisation histologique et par fluorescence du tissu bioimprimé après 7 jours de maturation. A) Vue de la taille réelle de l'objet coloré par le trichrome de Masson. B) Coupe plus détaillée de l'organisation cellulaire et de la matrice extracellulaire. C) Imagerie par fluorescence des HDMEC-GFP, les flèches rouges pointent les sphéroïdes. Coupe de 5 µm.

La remarque principale est que le peu de rétractation s'explique par le peu de densité de matrice extracellulaire observable. En effet, la coloration par le trichrome de Masson révèle une couleur en majorité rose et non verte (Figure 118 A). Les fibroblastes ont donc été peu productifs. En regardant de plus près, les cellules endothéliales, semblent s'être organisées en un réseau connecté mais leur accumulation en sphéroïdes (flèches rouge sur la Figure 118 C) indique que la matrice était trop lâche pour qu'elles puissent y adhérer en préférant se regrouper entre-elles. Finalement, il n'a pas été détecté de structure microvasculaire avec un lumen suggérant une maturation incomplète du réseau de cellules endothéliales.

III.3.2 Evolution du système de bioréacteur

III.3.2.1 Utilisation d'un système commercial

Plusieurs systèmes de bioréacteurs ont été testés avant d'arriver à un montage final. Tout d'abord, un bioréacteur commercial de chez Applikon Biotechnology a été utilisé. Destiné à la base à l'expansion de cellules en suspension, plusieurs modules ont été rajoutés afin de l'utiliser pour notre domaine d'application. Il comprend un contrôleur qui gère les injections de soude (pour l'équilibre du pH), et d'oxygène, ainsi que les mesures en temps réel de la

température et du pH. Ensuite, on trouve la cuve du bioréacteur où se passent les mesures grâce à plusieurs sondes, les injections (oxygène et soude) ainsi qu'un système mélangeur pour avoir un milieu homogène. De cette cuve part donc le milieu équilibré et oxygéné qui passe à travers la pompe péristaltique pour se déverser dans la cuve où se trouve notre objet bioimprimé.

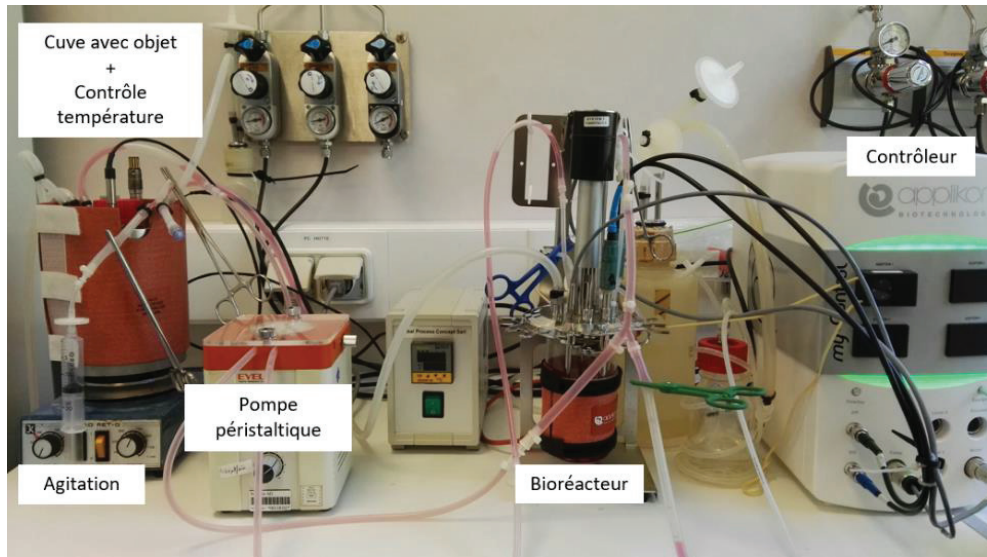


Figure 119. Photographie du montage du système commercial avec de droite à gauche : le contrôleur, le bioréacteur où sont plongées les sondes de pH et l'injecteur (soude et oxygène), la pompe péristaltique, le système d'agitation et la cuve contenant l'objet.

Le premier essai s'est arrêté au bout de seulement quatre jours car le cube a commencé à se désagréger complètement. Pour les expérimentations suivantes, un couvercle a été ajouté à l'habitacle du tissu bioimprimé (Figure 120). Cette manipulation s'est systématiquement arrêtée au bout de 5 jours, car le couvercle se détachait et le cube bioimprimé se mettait à flotter. Aucune autre solution technologique n'a été trouvée pour remplacer ce couvercle tout en garantissant la stérilité du montage. La récupération de l'objet puis sa mise en culture classique (boîte de pétri) nous a montré que les cellules étaient encore vivantes et que certaines se détachaient de l'objet pour migrer au fond de la boîte de pétri, révélant que les deux types cellulaires (fibroblastes et HDMEC-GFP) étaient encore présents.

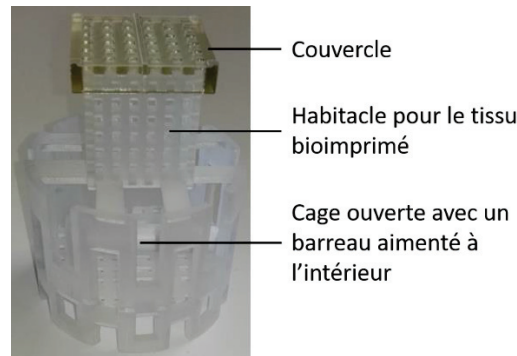


Figure 120. Photographie de la cage qui maintenait l'objet bioimprimé en culture avec un couvercle amovible, un habitacle aux dimensions de l'objet bioimprimé, et une cage ouverte contenant un barreau aimanté pour l'homogénéisation du milieu.

Il y a plusieurs hypothèses à l'échec de mise en œuvre de cette expérimentation. Premièrement, l'agitation devait être trop intense (malgré la plus faible intensité disponible) pendant les premiers jours de culture, alors que l'objet bioimprimé était encore trop fragile (avec peu de sécrétion matricielle). Deuxièmement, l'utilisation de 500 mL de milieu pour remplir les deux cuves et tout le système semble disproportionnée par rapport aux nombres de cellules à faire maturer (6 millions). Cette proportion ne permettait pas une bonne interaction entre les cellules en diluant intégralement les facteurs de signalisation sécrétés par ces cellules.

III.3.2.2 Elaboration par impression 3D d'un système de bioréacteur personnalisable

Le peu de disponibilité et de modulabilité des bioréacteurs commerciaux spécifiques à l'ingénierie tissulaire, nous ont poussés à concevoir notre propre système. Dans un premier temps, il a été décidé que le bioréacteur serait constitué d'une petite cuve sur-mesure, adaptée à la taille de notre cube bioimprimé. Elle est dotée d'une entrée et d'une sortie fixe où sont branchés les tubes qui font circuler le milieu de culture grâce à une pompe péristaltique. Tous les circuits sont préalablement montés puis stérilisés à l'autoclave. Ensuite, l'objet est imprimé puis polymérisé suivant le protocole habituel et inséré dans la cuve prévue à cet effet. L'ajout de milieu de culture se fait progressivement à l'aide d'une seringue branchée en série sur le tube de sortie. Plusieurs conceptions ont ainsi pu être testées.

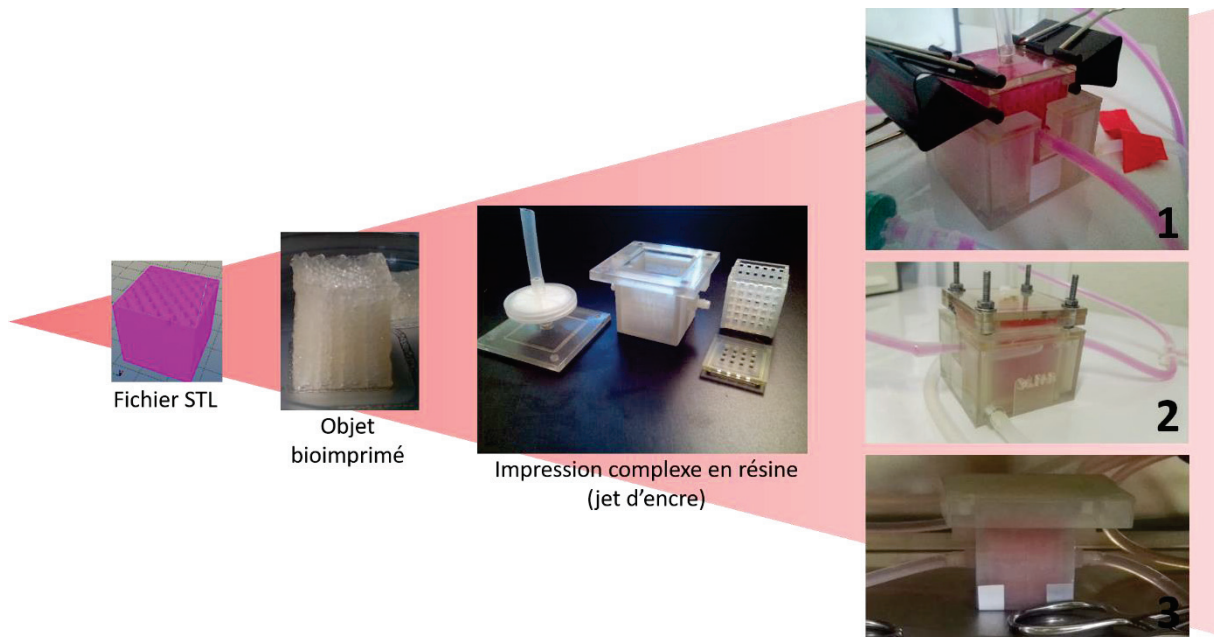


Figure 121. Evolution de la conception de la cuve de notre bioréacteur personnalisé.

Sur la Figure 121 sont regroupées trois conceptions différentes :

- La configuration 1, où la cuve est placée dans une enveloppe externe où circule de l'eau thermostatée à 37°C. Il y a un couvercle, maintenu par des pinces et une ouverture sur laquelle un tube avec un filtre à 0,22 μm de diamètre est fixé afin d'apporter passivement les échanges gazeux nécessaires au développement cellulaire. Le principal problème venait du couvercle peu étanche qui a provoqué une contamination rapide de l'échantillon.
- La configuration 2 où les pinces ont été remplacés par des vis afin d'apporter plus d'étanchéité à la cuve. Cependant, l'enveloppe thermostatée ne permettait pas un maintien à une température de 37°C et après vérification, le milieu de culture se trouvait plutôt à 34°C. Les tubes d'entrée et de sortie étant exposée à la température ambiante, la déperdition thermique était trop importante.
- La configuration 3, est celle que nous avons gardée pour toutes les expérimentations. On retrouve la cuve, installée dans l'incubateur, avec une entrée et une sortie d'où les tubes rejoignent la pompe péristaltique située à l'arrière de l'incubateur. Le couvercle est simplement posé sur la cuve pour que les échanges gazeux se fassent (comme dans une boîte de pétri).

La dernière évolution apportée vient du matériau utilisée pour construire la cuve. D’abord imprimée par la technologie jet d’encre en résine acrylate, elle a ensuite été imprimée en silicone (Sikasil®-C, SIKA, Suisse). Ce matériau a pour avantage d’être plus facilement stérilisable (il se déforme moins), et cela apporte une modulation dans le choix de la position des aiguilles d’entrée et de sortie qui sont simplement insérées dans la cuve avant stérilisation (Figure 122).

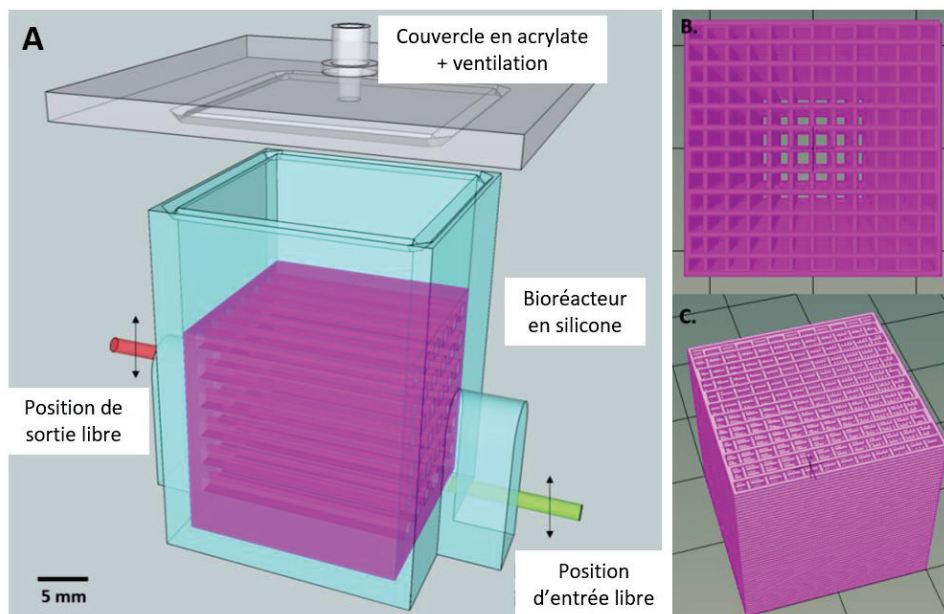


Figure 122. A) Représentation schématique du bioréacteur (bleu clair) avec l'objet bioimprimé à l'intérieur (rose) B) Vue supérieure de l'objet avant impression. C) Vue de côté de ce même objet.

Le tissu de 8 cm³ a été bioimprimé avec un réseau interne laissant 80% du volume de l'objet ouvert à la diffusion du milieu de culture (Figure 122-B, C). Ce réseau a été choisi de sorte à ce que l'épaisseur du tissu en chaque point de l'objet ne dépasse jamais 1 mm tout en ayant un objet atteignant une taille de 8 cm³. Cette épaisseur a été déterminée en fonction de l'acceptation classique de la limite de diffusion passive des nutriments et des gaz de 500 μm donnée par Jos Malda et ses collaborateurs pour des constructions de substituts cartilagineux. Ce remplissage de 20% conduit à la production de macro-porosité de taille millimétrique à l'intérieur du tissu. De plus, l'objet imprimé présente des parois pleines sur quatre périmètres pour orienter le flux dans une seule direction au sein de l'objet. La dynamique des fluides numérique (CFD) a été utilisée pour simuler le débit du milieu de culture dans le grand tissu bioimprimé.

III.3.3 Mécanique des fluides numérique (computational fluid dynamics = CFD)

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire LRGP (Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés) de Nancy en interaction forte avec le Dr Eric Olmos et Céline Loubière. Cette approche complémentaire, basée sur la dynamique des fluides a été utilisée pour identifier la trajectoire théorique du milieu de culture dans le bioréacteur à l'intérieur duquel se trouve un objet de grande taille, lors de la phase de maturation. Pour simplifier la configuration, l'objet imprimé est considéré comme un solide ouvert ne permettant pas la diffusion du milieu (à l'intérieur même des filaments de la bio-encre). Le débit est fixé à 300 mL/heure avec une entrée et une sortie de 0,4 mm, comme en conditions expérimentales.

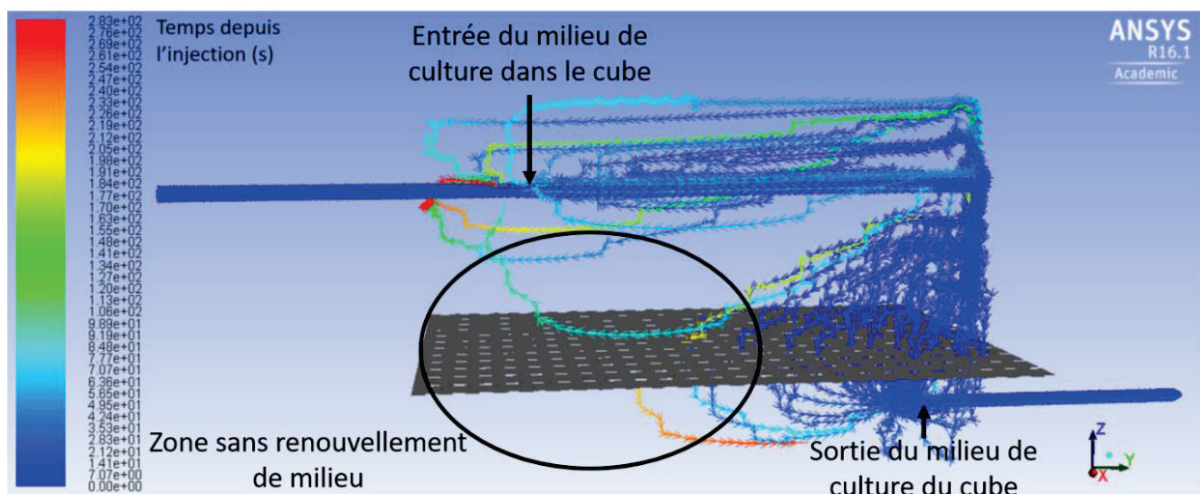


Figure 123. Représentation des trajectoires du flux de milieu de culture dans le système perfusé. Les couleurs représentent le temps après injection, c'est-à-dire le temps nécessaire à un élément fini pour atteindre une position particulière dans le tissu.

Cette représentation, qui exprime le trajet que prend le fluide à la sortie de l'aiguille, met en évidence une zone dite « morte » en bas à gauche sur la Figure 123. Cela signifie qu'à cet endroit de l'objet, le fluide stagne et ne se renouvelle que très peu. On observe aussi que lorsque le milieu de culture sort de l'aiguille, deux trajets préférentiels apparaissent : un premier qui traverse verticalement le cube de manière rapide (couleur bleu foncée) et se dirige vers la sortie, et un deuxième qui va se disperser contre la paroi et remonter pour former une boucle. C'est donc dans la partie supérieure de l'objet imprimé et dans sa partie opposée à l'entrée, que le renouvellement du milieu de culture se fait le plus rapidement.

Afin d'arriver à des conclusions pertinentes, trois zones d'intérêt ont été choisies pour être corrélées aux coupes histologiques :

- La zone-A, située à l'entrée de l'aiguille dans l'objet,

- La zone-B au milieu de l'objet,
- La zone-C à l'autre extrémité (sortie du flux).

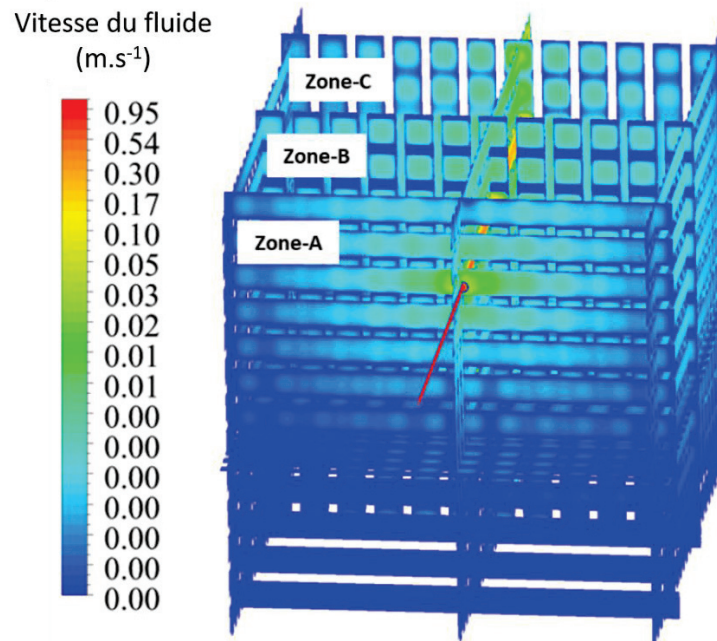


Figure 124. A) Vitesse d'écoulement du fluide dans les trois zones d'intérêt. Les couleurs représentent la vitesse du fluide à l'intérieur de l'objet. L'aiguille est représentée par le trait rouge.

Le cube bioimprimé a été cultivé pendant 12 jours dans le système de perfusion en utilisant un débit d'entrée de 300 mL/heure de milieu de culture avec injection quotidienne de vitamine C (concentration finale de 50 µg/mL), qui est un facteur de croissance des fibroblastes bien connu pour induire la sécrétion de la matrice cellulaire²²³. Afin de permettre le contrôle de la température et l'équilibre du pH dans le bioréacteur, celui-ci a été placé directement dans un incubateur standard de culture cellulaire. Après une semaine de culture dynamique, le tissu présentait une réduction de volume isomorphe claire de 8 cm³ à 6 cm³, typique de la maturation tissulaire des fibroblastes dans laquelle la matrice extracellulaire est sécrétée en induisant une rétractation.

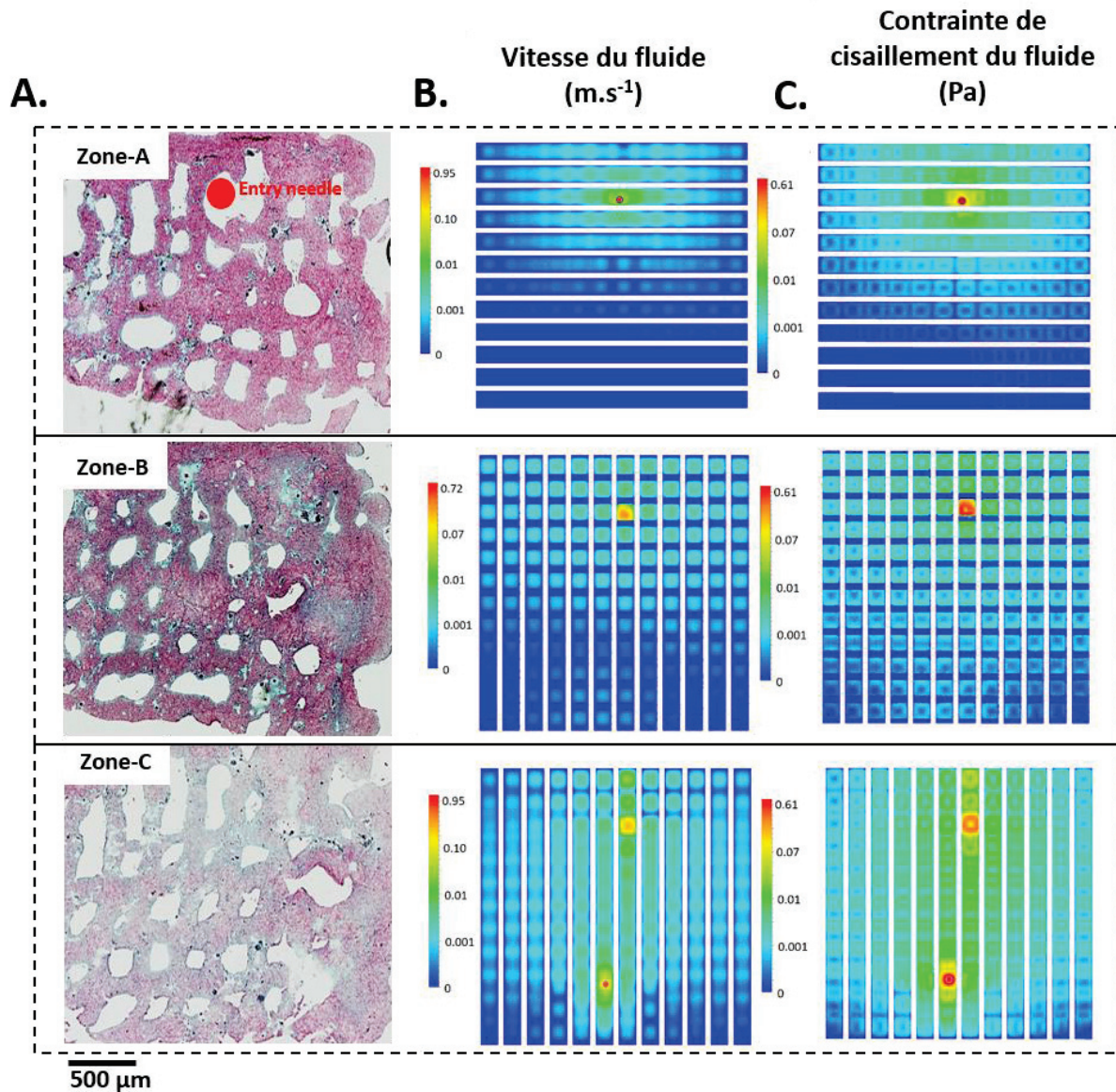


Figure 125. A) Caractérisation histologique par le trichrome de Masson du tissu bioimprimé après 12 jours de culture dynamique, coupe de 5 μm et barre d'échelle de 500 μm . B) Vitesse d'écoulement du fluide dans chaque zone, les couleurs représentent la vitesse du milieu de culture qui passe à travers l'objet (ce dernier n'est pas représenté, il est transparent). C) Contrainte de cisaillement imposées par la circulation du fluide à l'intérieur de l'objet.

La production de cette matrice a été mise en évidence sur la Figure 124-A par coloration par le trichrome de Masson. La Figure 124-A décrit également la macroporosité interne du grand tissu bioimprimé. En effet, la porosité initiale a été conservée pendant la maturation dynamique des tissus, conduisant à des structures tubulaires dans le tissu bioimprimé et orientées dans la direction du flux de perfusion et perpendiculaires à la section histologique de 3 μm . La comparaison entre l'hétérogénéité de la production de la matrice extracellulaire obtenue et la distribution des vitesses d'écoulement à l'intérieur de l'objet a montré clairement un lien entre les deux phénomènes (Figure 124-B et Figure 124-C). En effet, une

faible production de matrice extracellulaire a été observée dans la zone A, avec un impact évident sur la position de l'entrée de l'aiguille. Ensuite, la zone B, qui se caractérise par une diffusion plus large de la vitesse d'écoulement, a mis en évidence une production de matrice extracellulaire homogène. Enfin, en accord avec le temps d'écoulement et de post-injection (Figure 123), la zone C représentait la production de matrice la plus intense et la plus homogène. Fait intéressant, cette variabilité de la production de matrice extracellulaire au sein du tissu a également été directement liée à la contrainte mécanique appliquée. En effet, les contraintes de cisaillement du fluide des zones A, B et C illustrés à la Figure 124-C démontrent clairement une corrélation directe entre la stimulation mécanique et la production de la matrice extracellulaire. Il est alors clair que dans ce système actuel, un effet additif de la disponibilité localisée des nutriments et de la stimulation mécanique conduit à une maturation tissulaire localisée.

Cette simulation met donc en évidence un profil de circulation du milieu de culture préférentiel avec une certaine hétérogénéité de trajectoire. Pour relier ces résultats à nos données expérimentales et ainsi évaluer l'impact du flux sur l'organisation cellulaire, d'autres analyses histologiques ont été réalisées.

III.3.4 Caractérisations des tissus avec une maturation en environnement dynamique

Afin de déterminer si le tissu a mûri de manière physiologique, plusieurs analyses histologiques ont été réalisées après 14 jours de maturation dynamique.

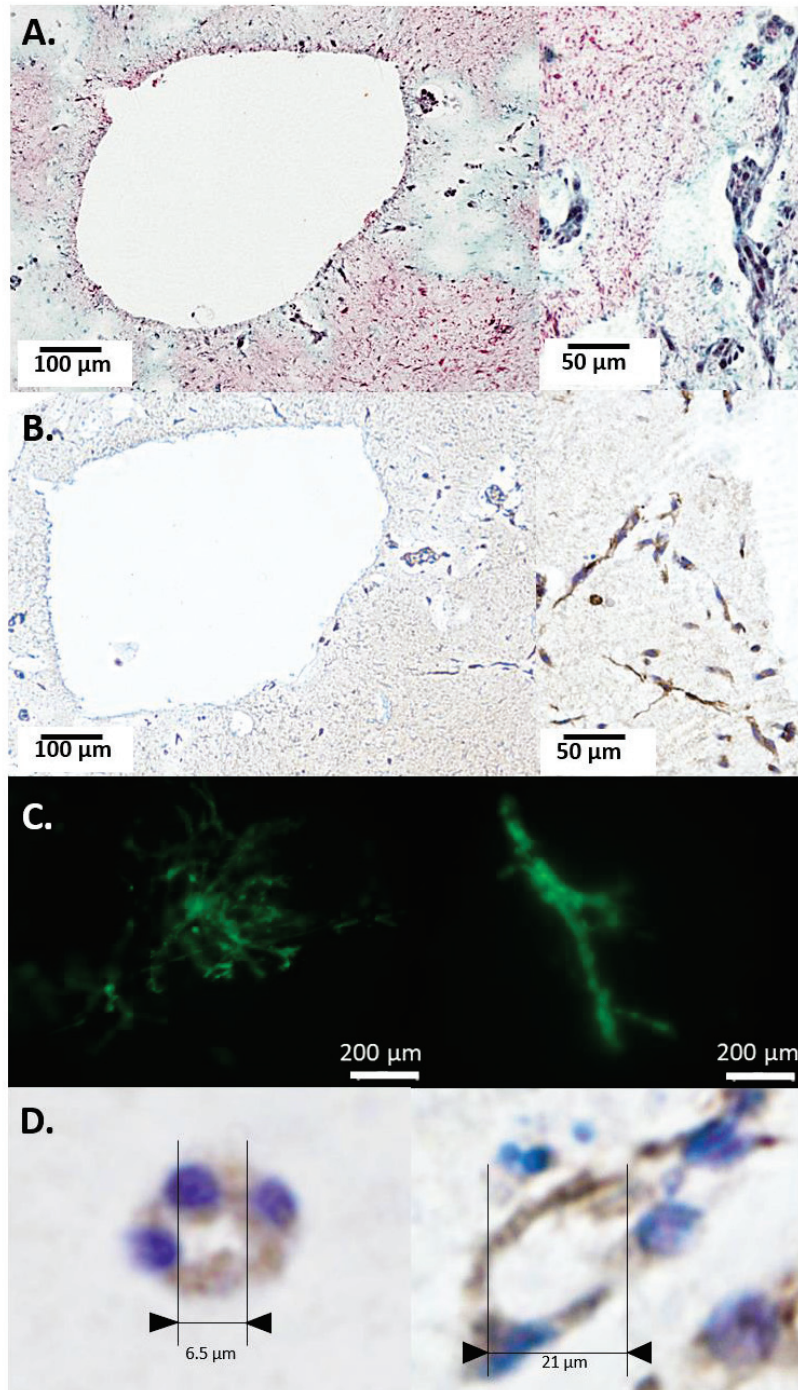


Figure 126. Caractérisation histologique et immunohistochimique du tissu bioimprimé après 14 jours de maturation en culture dynamique. A) Coloration par le trichrome de Masson d'un pore et d'une vue plus rapprochée de la matrice environnante. B) Coloration immunohistochimique à l'EN4 (coloration cytoplasmique marron des cellules endothéliales) du même pore. C) Images de microscopie par fluorescence montrant des réseaux de cellules endothéliales microvasculaires dermiques. D) Coloration immunohistochimiques par l'EN4 des HDMEC organisées en un lumen ouvert.

En regardant de plus près la structure et la sécrétion de matrice extracellulaire grâce à la coloration par le trichrome de Masson, il a été constaté que le tissu est entièrement colonisé par les cellules vivantes avec une coloration verte intense par endroit (Figure 126-A). C'est bien la preuve de la présence d'une matrice extracellulaire et plus précisément de collagène néosynthétisé par les fibroblastes. Il a été également mis en évidence une certaine accumulation des cellules à l'interface entre l'objet le milieu de culture, dans les pores du cube. En utilisant des techniques d'immunohistochimies par l'EN4, les cellules présentes ont été identifiées comme étant en majorité des fibroblastes (Figure 126-B). Les cellules endothéliales se retrouvent elles, distribuées plus en profondeur dans le tissu. Ces cellules ont été aussi observées par microscopie de fluorescence (grâce au prélèvement d'un morceau de tissu avant la fixation). Des structures caractéristiques de leur organisation en 3D ont été observées (Figure 126-C). Enfin, des micro-vaisseaux identifiés par le marquage du CD31 ont été observés avec des diamètres de lumen compris entre 5 et 25 μm (Figure 126-D), taille caractéristique des capillaires.

III.3.5 Comparaison de la culture statique et de la culture dynamique

Malgré un temps de culture de 7 jours pour la condition statique et un temps de culture de 14 jours pour la culture dynamique, plusieurs différences peuvent être mises en évidence. Au niveau cellulaire, en observant la formation de matrice extracellulaire, la production faible de collagène dans le tissu bioimprimé cultivé dans des conditions statiques indique clairement une maturation moins aboutie du tissu (production de collagène par les fibroblastes humains). Ceci est certainement lié à une conservation inférieure de la porosité interne des tissus, entraînant une diffusion entravée du milieu de culture tissu. Ensuite, en analysant l'organisation des cellules endothéliales microvasculaires, une différence a été observée entre les conditions de culture dynamique et statique. En condition statique l'organisation du réseau est moins structurée, sans microstructures à base de lumen et la présence de sphéroïdes (Figure 118), typiques du stress environnemental des cellules^{224,225}. Cette observation doit être liée à la diminution de la production d'ECM dans les grands tissus bioimprimés dans des conditions statiques.

Ensuite, l'utilisation concomitante d'une porosité interne (de taille millimétrique) orientée et des conditions de culture dynamiques de perfusion sur la maturation d'un gros

tissu bioimprimé (dm³) incorporant des cellules endothéliales microvasculaires utiles pour le développement de la microvascularisation. Les résultats obtenus indiquent clairement que la procédure développée permet, d'une part, la conservation de la porosité interne du tissu, conduisant à une perfusion constante et homogène de l'intégralité du tissu et, d'autre part, au développement d'une organisation claire de réseaux cellulaires endothéliaux connectés.

III.3.6 Conclusion

Dans cette dernière partie, il a été mis en évidence la formation d'un tissu vascularisé. L'incorporation des cellules endothéliales dans la bio-encre montre là-encore sa versatilité. Les cellules endothéliales (HDMEC-GFP et HUVEC) conservent leurs marqueurs spécifiques ce qui rend leur identification par histologie aisée. Le tissu ainsi bioimprimé avec les HDMEC-GFP est microvascularisé et fonctionnel.

Cette microvascularisation peut s'obtenir de deux manières différentes, soit grâce à la diffusion pour un tissu d'une épaisseur ne dépassant pas les 1 mm, soit par une culture dynamique pour des objets de taille plus imposante (8 cm³).

L'obtention d'un tissu perfusable en utilisant l'approche bioréacteur a été démontrée avec la possibilité de générer et de maintenir des structures tubulaires de tailles millimétriques dans un tissu bioimprimé de plusieurs centimètres cubes. L'impact du flux de milieu de culture (statique versus dynamique) montre des évolutions différentes liées directement au flux et au stress hydrodynamique généré.

IV. Conclusion

Dans cette partie consacrée aux tissus bioimprimés, une première remarque concerne la bio-encre. Cette dernière a été utilisée dans tous les tissus sans changement de sa composition, elle possède un caractère versatile. Elle a notamment permis la bioimpression de cellules primaires (fibroblastes), de cellules souches mésenchymateuses qui se sont différencié en chondrocytes ainsi que de cellules endothéliales de deux sources différentes (HDMEC-GFP et HUVEC).

Le premier tissu bioimprimé a été le derme. L'obtention d'un derme en 5 jours a permis un ensemencement des kératinocytes et la maturation a conduit à l'obtention d'une peau totale présentant un grand nombre de marqueurs, témoins d'une reconstruction et d'une réorganisation complexe de cette peau.

La bioimpression de cellules souches mésenchymateuses a conduit à l'obtention de substituts cartilagineux présentant des caractéristiques histologiques encourageantes avec notamment la présence importante de collagène de type II.

Pour finir, le développement d'un tissu vascularisé a été étudié tout d'abord avec deux sources cellulaires différentes dans les conditions de maturation habituelles, puis dans des conditions dynamiques de perfusion. Cette évolution a conduit à la bioimpression d'un objet de grande taille et à la création d'un bioréacteur qui va pouvoir évoluer pour apporter encore plus de contrôle avec l'incorporation de sonde (pH et température).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La bioimpression est un champ de recherche récent qui allie de nombreuses disciplines scientifiques comme en témoigne la transversalité de ce travail de recherche. Cette thèse a eu pour but la création d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants afin d'arriver à l'obtention de tissus bioimprimés.

Pour cela, la première partie des résultats a démontré le cheminement exploratoire de l'élaboration d'une bio-encre. En partant d'alginate, couramment utilisé en ingénierie tissulaire, il a été présenté les ajouts successifs de deux autres biomatériaux, la gélatine et le fibrinogène, afin d'arriver à une formulation finale utilisée pour les différents tissus bioimprimés. Leurs rôles, à l'intérieur de la bio-encre, sont pour chacun bien définis avec pour l'alginate la conservation de la structure 3D pendant la phase de maturation, pour la gélatine son apport lors de la phase d'impression et pour le fibrinogène son rôle dans l'adhésion cellulaire. Dans le même temps, cette bio-encre a été caractérisée grâce à une étude rhéologique afin de s'assurer de son imprimabilité (paramètre essentiel en bioimpression) et de mesurer l'innocuité du procédé sur les cellules. Dans ce premier chapitre, le devenir des cellules a été caractérisé par des numérations afin de déterminer les phases de croissance à l'intérieur d'un cube standard comprenant des fibroblastes. Deux dosages métaboliques ont été mis en place dans l'optique d'un suivi de la maturation cellulaire non destructif.

Dans le deuxième chapitre de résultats, l'élaboration d'une bioimprimante a été décrite. Les tout premiers résultats de bioimpression de cellules ont été réalisés grâce à une imprimante 3D plastique transformée en bioimprimante. Les développements technologiques qui ont suivi nous ont amené à affiner nos exigences en concevant un cahier des charges plus précis et plus adapté à notre utilisation. L'acquisition d'un bras robotique 6 axes va permettre de réaliser les premiers essais de bioimpression *in vivo* chez le petit animal. Ce sera la première étape dans le transfert de la technologie de bioimpression chez l'homme. L'objectif est de pouvoir imprimer directement sur la plaie d'un patient afin de pallier au manque de disponibilité de substituts ou de peau saine.

La dernière partie des résultats, consacrée aux tissus bioimprimés, est centrée sur trois thématiques. Tout d'abord, la bioimpression de derme, qui a été le premier tissu bioimprimé au laboratoire. Sa maturation se déroule grâce à la sécrétion de matrice extracellulaire par les fibroblastes. Cette matrice a été caractérisée par de nombreuses colorations histologiques et par l'utilisation de marqueurs spécifiques de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et

du derme. La complexification du derme bioimprimé a été réalisée par l'ensemencement des kératinocytes pour donner une peau totale fonctionnelle et organisée. L'ultrastructure de la peau bioimprimée a été étudiée précisément par microscopie électronique afin de s'assurer de l'organisation correcte des fibres de collagène et de la présence de nombreux organites essentiels confirmant une réorganisation complexe de cette peau. Le développement de bioimpression de peau a suscité une publication et le dépôt d'un brevet international.

La bioimpression de cartilage a permis de constater que l'utilisation de la bio-encre développée précédemment permettait la bioimpression de cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules souches se sont alors différenciées en chondrocytes pour donner des substituts cartilagineux présentant des caractéristiques histologiques encourageantes avec notamment la présence importante de collagène de type II. Ces développements sont regroupés dans une publication en cours d'écriture

La problématique de la vascularisation apparaît avec la volonté de produire des substituts corporels de plus grandes tailles afin de pallier au manque de greffons disponibles. Pour aborder cette thématique, nous avons essayé de recréer de la microvascularisation à l'intérieur de cubes standards contenant des fibroblastes. Ces derniers jouent un rôle sécréteur de matrice extracellulaire afin de supporter la formation de capillaires. Grâce aux HDMEC, cette étape a été validée par de nombreuses caractérisations histologiques. Pour aller plus loin, un bioréacteur a été conçu afin de répondre à différents besoins de taille et de flux. L'utilisation de ce bioréacteur a pour but l'apport de plus de contrôle au tissu bioimprimé pendant la phase critique de maturation. Grâce à la CFD, nous avons pu prévoir le trajet emprunté par le milieu de culture afin d'observer un chemin préférentiel et constater l'apport du flux d'une maturation dynamique sur le développement cellulaire et la sécrétion matricielle. Cette étude a fait l'objet d'une publication.

Plusieurs projets et collaborations ont émané de cette nouvelle thématique de bioimpression 3D de tissus vivants au laboratoire. Certains projets sont déjà financés, d'autres sont à leur première preuve de concept, ils sont présentés ci-dessous.

Le projet Bloc-Print financé par la DGA (Direction Générale des Armées) pour la bioimpression de peau et de cartilage *in vivo* qui a permis le financement d'un bras robotique

6 axes. Le but est d'apporter la bioimprimante au plus près du patient : dans le bloc opératoire. Cette promiscuité permettrait de réaliser en seul temps opératoire, le prélèvement (de peau saine) et l'impression de peau sur des grands brûlés, réduisant ainsi considérablement les temps de préparation de greffons épidermiques. Ce projet contient aussi une partie de bioimpression de cartilage afin d'envisager la faisabilité de bioimpression patient spécifique.

La collaboration avec un chirurgien plastique (Dr Altan) et le centre de Recherche Saint-Antoine (UMRS 938) nous a amené à bioimprimer en 3D des cellules souches adipeuses. Le but de ces premiers résultats est l'obtention de tissus adipeux potentiellement utilisables lors de perte de tissus importants (accidents ou maladie) pour une reconstruction plastique.

Un partenariat avec une équipe Marseillaise (UMRS 1251) dirigée par le Dr Pucéat, nous a conduits à la bioimpression de patches cardiaques composés de cellules progénitrices cardiaques. L'objectif est d'apporter une solution régénératrice lors d'accident vasculaire cardiaque afin de limiter les nécroses du tissu cardiaque. Ce patch est actuellement testé sur des cochons chez lesquels il a été induit une pathologie nommée la tétralogie de Fallot afin de tester la faisabilité d'implantation de patch créé par bioimpression 3D.

Une autre collaboration avec l'Université Paris-Descartes et le Dr. Taly a permis la bioimpression de micro-tumeurs de cancer colorectal.

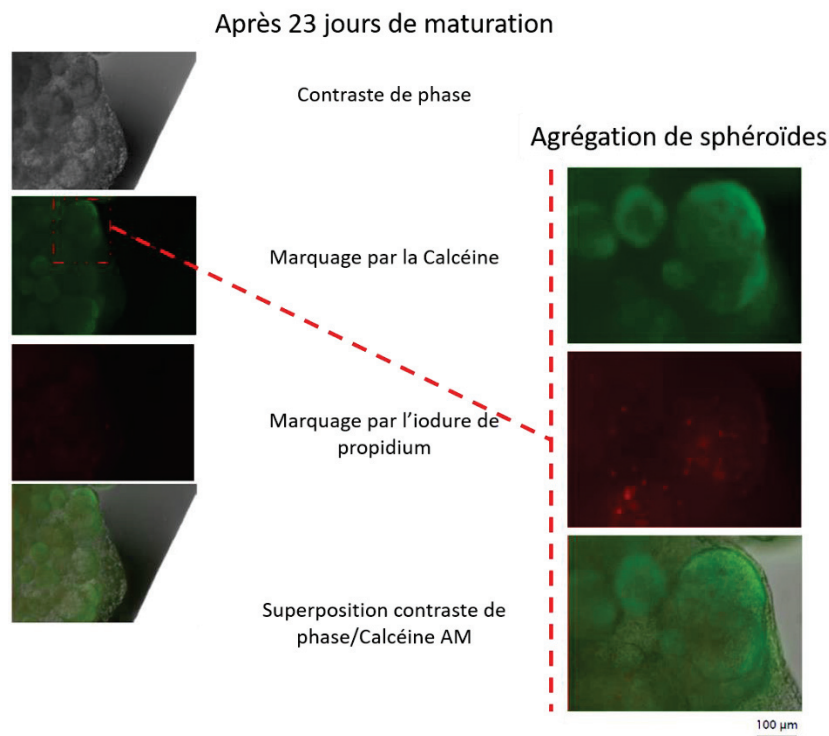


Figure 127. Première preuve de concept de bioimpression de micro-tumeurs (cellules HT29) et observation microscopique après 23 jours de maturation grâce à un marquage par la calcéine et par l'iodure de propidium.

L'objectif ici est d'obtenir des objets bioimprimés présentant des sphéroïdes (tumeurs en devenir) avec leur propre microenvironnement. L'obtention d'un modèle de tumeurs de cancer colorectal présente d'énormes intérêts dans la recherche de traitements thérapeutiques et de compréhension des mécanismes d'interaction cellulaire afin de mieux appréhender cette pathologie.

Les apports majeurs de ces travaux de thèse portent sur la formulation d'une bio-encre dans laquelle les cellules prolifèrent en sécrétant leur propre matrice extracellulaire ainsi que sur le développement d'un procédé innovant de bioimpression 3D. Pour conclure de manière générale, ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives sur des thématiques extrêmement variées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Shi, W., Fang, Z., Li, L. & Luo, L. Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Sci. China Life Sci.* 58, 343–351 (2015).
2. Biomédecine. *Activite greffes et organes 2016*. Agence de la biomédecine. (2017).
3. Langer, R. & Vacanti, J. Tissue engineering. *Science* 260, 920–926 (1993).
4. Tapias, L. F. & Ott, H. C. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 19, 145–152 (2014).
5. Sakaguchi, K., Shimizu, T. & Okano, T. Construction of three-dimensional vascularized cardiac tissue with cell sheet engineering. *J. Control. Release* 205, 83–88 (2015).
6. Ordidge, K. L., Gregori, M., Kalber, T. L., Lythgoe, M. F., Janes, S. M. & Giangreco, A. Coupled cellular therapy and magnetic targeting for airway regeneration. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 657–661 (2014).
7. Rothrauff, B. B. & Tuan, R. S. Cellular therapy in bone-tendon interface regeneration. *Organogenesis* 10, 13–28 (2014).
8. Lu, C.-H., Chang, Y.-H., Lin, S.-Y., Li, K.-C. & Hu, Y.-C. Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 31, 1695–1706 (2013).
9. Alexandre Couto, D. V. M. Imprimer des tissus biologiques. *Industrie et Technologie* 57–64 (2017).
10. O'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. Grafting of Burns With Cultured Epithelium Prepared From Autologous Epidermal Cells. *Lancet* 317, 75–78 (1981).
11. Auxenfans, C., Menet, V., Catherine, Z., Shipkov, H., Lacroix, P., Bertin-Maghit, M., Damour, O. & Braye, F. Cultured autologous keratinocytes in the treatment of large and deep burns: A retrospective study over 15 years. *Burns* 41, 71–79 (2015).
12. Boyce, S. T. Cultured Skin Substitutes: A Review. *Tissue Eng.* 2, 255–266 (1996).
13. Melchels, F. P. W. P., Domingos, M. A. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J. & Hutmacher, D. W. Additive manufacturing of tissues and organs. *Prog. Polym. Sci.* 37, 1079–1104 (2012).
14. Murphy, S. V & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotech* 32, 773–785 (2014).
15. Devillard, R., Pages, E., Correa, M. M., Keriquel, V., Remy, M., Kalisky, J., Ali, M., Guillotin, B. & Guillemot, F. Cell patterning by laser-assisted bioprinting. *Methods Cell Biol* 119, 159–174 (2014).
16. Christensen, K., Xu, C., Chai, W., Zhang, Z., Fu, J. & Huang, Y. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 1047–1055 (2015).
17. Ahu, A.-Y., Rami, E. A., Chen, P., Guven, S., Inci, F. & Demirci, U. Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication* 8, 2–18 (2016).
18. Gudapati, H., Dey, M. & Ozbolat, I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials* 102, 20–42 (2016).

19. Derby, B. Inkjet Printing of Functional and Structural Materials: Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution. *Annu. Rev. Mater. Res.* 40, 395–414 (2010).
20. Xu, CA Gregory, Molnar, P. & Cui X, Jalota S, Bhaduri SB, B. T. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. *Biomaterials* 27, 3580–3588 (2006).
21. Xu, T., Baicu, C., Aho, M., Zile, M. & Boland, T. Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo tissues. *Biofabrication* 1, 1–12 (2009).
22. Cui, X. & Boland, T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* 30, 6221–6227 (2009).
23. Cui, X., Breitenkamp, K., Finn, M. G. G., Lotz, M. & D’Lima, D. D. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A* 18, 1304–1312 (2012).
24. Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. Inkjet Printing-Process and Its Applications. *Adv. Mater.* 22, 673–685 (2010).
25. Yamaguchi, S., Ueno, A., Akiyama, Y. & Morishima, K. Cell patterning through inkjet printing of one cell per droplet. *Biofabrication* 4, 4–15 (2012).
26. Berthuy, O. I., Blum, L. J. & Marquette, C. A. Cells on chip for multiplex screening. *Biosens. Bioelectron.* 76, 29–37 (2016).
27. Ozbolat, I. T. & Hospodiuk, M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* 76, 321–343 (2016).
28. Kirchmayer, D. M., Gorkin III, R. & in het Panhuis, M. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. *J. Mater. Chem. B* 3, 4105–4117 (2015).
29. Mouser, V. H. M., Melchels, F. P. W., Visser, J., Dhert, W. J. A., Gawlitta, D. & Malda, J. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication* 8, 1–15 (2016).
30. Seol, Y. J., Kang, H. W., Lee, S. J., Atala, A. & Yoo, J. J. Bioprinting technology and its applications. *Eur J Cardiothorac Surg* 46, 342–348 (2014).
31. Karoly, J., Cyrille, N., Françoise, M., Keith, M., Gordana, V.-N., Gabor, F., Jakab, K., Norotte, C., Marga, F., Murphy, K., Vunjak-Novakovic, G. & Forgacs, G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* 2, 1–15 (2010).
32. Galbraith, T., Clafshenkel, W. P., Kawecki, F., Blanckaert, C., Labbé, B., Fortin, M., Auger, F. A. & Fradette, J. A Cell-Based Self-Assembly Approach for the Production of Human Osseous Tissues from Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* 6, 1–11 (2017).
33. Auger, F. A., Rémy-Zolghadri, M., Grenier, G. & Germain, L. Review: The Self-Assembly Approach for Organ Reconstruction by Tissue Engineering. *e-biomed J. Regen. Med.* 1, 75–86 (2000).

34. Cheng, J., Lin, F., Liu, H., Yan, Y., Wang, X., Zhang, R. & Xiong, Z. Rheological Properties of Cell-Hydrogel Composites Extruding Through Small-Diameter Tips. *J. Manuf. Sci. Eng.* 130, 21–28 (2008).
35. Phillippi, J. A., Miller, E., Weiss, L., Huard, J., Waggoner, A. & Campbell, P. Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations. *Stem Cells* 26, 127–134 (2008).
36. Shinjiro, U. Precision printing of gelatin utilizing electrostatic inkjet. *Jpn. J. Appl. Phys.* 53, 1–3 (2014).
37. Panwar, A. & Tan, L. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules* 21, 685–702 (2016).
38. Placone, J. K. & Engler, A. J. Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* 7, 1–11 (2017).
39. Chung, J. H. Y., Naficy, S., Yue, Z., Kapsa, R., Quigley, A., Moulton, S. E. & Wallace, G. G. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomater. Sci.* 1, 763–773 (2013).
40. Jia, W., Gungor-Ozkerim, P. S., Zhang, Y. S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., Pi, Q., Byambaa, B., Dokmeci, M. R., Shin, S. R. & Khademhosseini, A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* 106, 58–68 (2016).
41. Yanagi, Y., Nakayama, K., Taguchi, T., Enosawa, S., Tamura, T., Yoshimaru, K., Matsuura, T., Hayashida, M., Kohashi, K., Oda, Y., Yamaza, T. & Kobayashi, E. In vivo and ex vivo methods of growing a liver bud through tissue connection. *Sci. Rep.* 7, 1–15 (2017).
42. Mironov, V., Visconti, R. P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C. J. & Markwald, R. R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 30, 64–74 (2009).
43. Skardal, A. & Atala, A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Ann Biomed Eng* 43, 730–746 (2015).
44. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126 (2012).
45. Lee, P. & Rogers, M. A. Effect of calcium source and exposure-time on basic caviar spherification using sodium alginate. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 1, 96–100 (2012).
46. Sun, J. & Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*. 6, 1285–1309 (2013).
47. Kuo, C. K. & Ma, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22, 511–521 (2001).
48. Yu, Y., Zhang, Y., Martin, J. A. & Ozbolat, I. T. Evaluation of Cell Viability and Functionality in Vessel-like Bioprintable Cell-Laden Tubular Channels. *J. Biomech. Eng.* 135, 8–12 (2013).
49. Wu, Z., Su, X., Xu, Y., Kong, B., Sun, W. & Mi, S. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Sci. Rep.* 6, 24–35 (2016).

50. Rowley, J. A., Madlambayan, G. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20, 45–53 (1999).
51. Duan, B., Hockaday, L. A., Kang, K. H. & Butcher, J. T. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 101, 1255–1264 (2013).
52. Shengjie Li, S., Zhuo Xiong, Z., Xiaohong Wang, X., Yongnian Yan, Y., Haixia Liu, H. & Renji Zhang, R. Direct Fabrication of a Hybrid Cell/Hydrogel Construct by a Double-nozzle Assembling Technology. *J. Bioact. Compat. Polym.* 24, 249–265 (2009).
53. Ruoslahti, E. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol.* 22, 459–465 (2003).
54. Liu, D., Nikoo, M., Boran, O., Zhou, P., Regenstein, J. M., Boran, G., Zhou, P. & Regenstein, J. M. Collagen and Gelatin. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 527–557 (2015).
55. Davidenko, N., Schuster, C. F., Bax, D. V., Farndale, R. W., Hamaia, S., Best, S. M. & Cameron, R. E. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27, 148–154 (2016).
56. Lai, J.-Y. The role of bloom index of gelatin on the interaction with retinal pigment epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3442–3456 (2009).
57. Su, K. & Wang, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol. Lett.* 37, 2139–2145 (2015).
58. Das, S., Pati, F., Choi, Y.-J., Rijal, G., Shim, J.-H., Kim, S. W., Ray, A. R., Cho, D.-W. & Ghosh, S. Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomater.* 11, 233–246 (2015).
59. Giuseppe, M. Di, Law, N., Webb, B., A. Macrae, R., Liew, L. J., Sercombe, T. B., Dilley, R. J. & Doyle, B. J. Mechanical behaviour of alginate–gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 79, 150–157 (2018).
60. Irvine, S. A., Agrawal, A., Lee, B. H., Chua, H. Y., Low, K. Y., Lau, B. C., Machluf, M. & Venkatraman, S. Printing cell-laden gelatin constructs by free-form fabrication and enzymatic protein crosslinking. *Biomed. Microdevices* 17, 16–24 (2015).
61. Kolesky, D. B., Homan, K. A., Skylar-Scott, M. A. & Lewis, J. A. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3179–3184 (2016).
62. Dai, X., Ma, C., Lan, Q. & Xu, T. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. *Biofabrication* 8, 1–15 (2016).
63. Nikkhah, M., Eshak, N., Zorlutuna, P., Annabi, N., Castello, M., Kim, K., Dolatshahi-Pirouz, A., Edalat, F., Bae, H., Yang, Y. & Khademhosseini, A. Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 33, 9009–9018 (2012).

64. Duchi, S., Onofrillo, C., O'Connell, C. D., Blanchard, R., Augustine, C., Quigley, A. F., Kapsa, R. M. I., Pivonka, P., Wallace, G., Di Bella, C. & Choong, P. F. M. Handheld Co-Axial Bioprinting: Application to in situ surgical cartilage repair. *Sci. Rep.* 7, 5837–5855 (2017).
65. Mandon, C. A., Blum, L. J. & Marquette, C. A. Adding Biomolecular Recognition Capability to 3D Printed Objects. *Anal. Chem.* 88, 10767–10772 (2016).
66. Loessner, D., Meinert, C., Kaemmerer, E., Martine, L. C., Yue, K., Levett, P. A., Klein, T. J., Melchels, F. P. W., Khademhosseini, A. & Hutmacher, D. W. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat. Protoc.* 11, 727–746 (2016).
67. Weisel, J. W. Fibrinogen and Fibrin. *Adv. Protein Chem.* 70, 247–299 (2005).
68. Van Obberghen-Schilling, E. & Pouyssegur, J. Le Recepteur De La Thrombine Et Ses Implications Dans La Proliferation Des Cellules Vasculaires. *Medecine/Sciences* 9, 1043–1049 (1993).
69. Ahmed, T. A. E., Dare, E. V. & Hincke, M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14, 199–215 (2008).
70. Hinton, T. J., Jallerat, Q., Palchesko, R. N., Park, J. H., Grodzicki, M. S., Shue, H.-J., Ramadan, M. H., Hudson, A. R. & Feinberg, A. W. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv.* 1, 1–10 (2015).
71. Henmi, C., Nakamura, M., Nishiyama, Y., Yamaguchi, K., Mochizuki, S., Takiura, K. & Nakagawa, H. Development of an effective three dimensional fabrication technique using inkjet technology for tissue model samples. *Japanese Soc. Altern. to Anim. Exp.* 689–692 (2008).
72. Włodarczyk-Biegun, M. K. & del Campo, A. 3D Bioprinting of Structural Proteins. *Biomaterials* 134, 181–201 (2017).
73. Hesse, E., Hefferan, T. E., Tarara, J. E., Haasper, C., Meller, R., Krettek, C., Lu, L. & Yaszemski, M. J. Collagen type I hydrogel allows migration, proliferation, and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 345–351 (2010).
74. Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane La superfamille des collagènes : de la matrice extracellulaire à la membrane cellulaire. *Pathol. Biol.* 53, 430–442 (2005).
75. Kierszenbaum, A. L. *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique.* (De Boeck, 2006).
76. Helary, C., Bataille, I., Abed, A., Illoul, C., Anglo, A., Louedec, L., Letourneur, D., Meddahi-Pellé, A. & Giraud-Guille, M. M. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials* 31, 481–490 (2010).
77. Lee, W., Debasitis, J. C., Lee, V. K., Lee, J.-H., Fischer, K., Edminster, K., Park, J.-K. & Yoo, S.-S. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-

- dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* 30, 1587–1595 (2009).
78. Smith, C. M., Stone, A. L., Parkhill, R. L., Stewart, R. L., Simpkins, M. W., Kachurin, A. M., Warren, W. L. & Williams, S. K. Three-Dimensional BioAssembly Tool for Generating Viable Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng.* 10, 1566–1576 (2004).
 79. G, M., Nanau, R. M., Oruña-Sanchez, L. & Coto, G. Hyaluronic acid and wound healing. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 18, 53–60 (1997).
 80. Miki, D., Dastgheib, K., Kim, T., Pfister-Serres, A., Smeds, K. A., Inoue, M., Hatchell, D. L. & Grinstaff, M. W. A photopolymerized sealant for corneal lacerations. *Cornea* 21, 393–399 (2002).
 81. Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Oottamasathien, S. & Prestwich, G. D. Dynamically Crosslinked Gold Nanoparticle - Hyaluronan Hydrogels. *Adv. Mater.* 22, 4736–4740 (2010).
 82. Prestwich, G. D. & Kuo, J.-W. Chemically-modified HA for therapy and regenerative medicine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9, 242–245 (2008).
 83. Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Xu, X., Oottamasathien, S. & Prestwich, G. D. Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Eng Part A* 16, 2675–2685 (2010).
 84. Soo Pai, K., Park, S.-H., Ra Park, S., Il Chung, S. & Min, B.-H. Tissue-engineered Cartilage Using Fibrin/Hyaluronan Composite Gel and Its In Vivo Implantation. *Artif. Organs* 29, 838–860 (2005).
 85. Gaetani, R., Feyen, D. A. M., Verhage, V., Slaats, R., Messina, E., Christman, K. L., Giacomello, A., Doevendans, P. A. F. M. & Sluijter, J. P. G. Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials* 61, 339–348 (2015).
 86. Muller, M., Becher, J., Schnabelrauch, M. & Zenobi-Wong, M. Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication* 7, 1–14 (2015).
 87. Nair, K., Gandhi, M., Khalil, S., Yan, K. C., Marcolongo, M., Barbee, K. & Sun, W. Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnol J* 4, 1168–1177 (2009).
 88. Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M. & Fischer, H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 326–333 (2016).
 89. Jeon, O. & Alsberg, E. Photofunctionalization of Alginate Hydrogels to Promote Adhesion and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* 19, 1424–1432 (2013).
 90. Wang, X., Heath, D. E. & Cooper, S. L. Endothelial cell adhesion and proliferation to PEGylated polymers with covalently linked RGD peptides. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 100A, 794–801 (2012).
 91. Grayson, W. L., Martens, T. P., Eng, G. M., Radisic, M. & Vunjak-Novakovic, G. Biomimetic approach to tissue engineering. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 665–673 (2009).

92. Choudhury, D., Tun, H. W., Wang, T., Naing, M. W., Han, @, Tun, W., Wang, T. & Naing, M. W. Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? *Trends Biotechnol.* xx, (2018).
93. Pati, F., Jang, J., Ha, D.-H., Won Kim, S., Rhie, J.-W., Shim, J.-H., Kim, D.-H. & Cho, D.-W. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. 5, 3935 (2014).
94. Skardal, A., Devarasetty, M., Kang, H.-W., Mead, I., Bishop, C., Shupe, T., Lee, S. J., Jackson, J., Yoo, J., Soker, S. & Atala, A. A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater.* 25, 24–34 (2015).
95. Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. & Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* 30, 5910–5917 (2009).
96. Wüst, S., Müller, R. & Hofmann, S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials-Approaches Towards 3D Tissue Printing. *J. Funct. Biomater.* 2, 119–154 (2011).
97. Xu, F., Sridharan, B., Wang, S., Gurkan, U. A., Syverud, B. & Demirci, U. Embryonic stem cell bioprinting for uniform and controlled size embryoid body formation. *Biomicrofluidics* 5, 15–22 (2011).
98. Koch, L., Deiwick, A., Schlie, S., Michael, S., Gruene, M., Coger, V., Zychlinski, D., Schambach, A., Reimers, K., Vogt, P. M. & Chichkov, B. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1855–1863 (2012).
99. Mosteller, R. D. Simplified Calculation of Body-Surface Area. *N. Engl. J. Med.* 317, 1098–1098 (1987).
100. Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F. & Fuh, J. Y. H. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication* 8, 1–16 (2016).
101. MÉLISSOPOULOS Alexandre, L. C. La peau (2e ed.), structure et physiologie. in
102. Mackenzie, I. C. Ordered Structure of The Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 65, 45–51 (1975).
103. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. & Declercq, W. Cell death by cornification ☆. *Biochim. Biophys. Acta* 3471–3480 (2013).
104. Kim, B. S., Kwon, Y. W., Kong, J.-S., Park, G. T., Gao, G., Han, W., Kim, M.-B., Lee, H., Kim, J. H. & Cho, D.-W. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials* 168, 38–53 (2018).
105. Dos Santos, M., Metral, E., Boher, A., Rousselle, P., Thepot, A. & Damour, O. In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biol.* 45–56 (2015).
106. Villone, D., Fritsch, A., Koch, M., Bruckner-Tuderman, L., Hansen, U. & Bruckner, P. Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: Anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J. Biol. Chem.* 283, 24506–24513 (2008).

107. Breitzkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K. & Nischt, R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *Biomed Res. Int.* 16, 16–23 (2013).
108. Breitzkreutz, D., Mirancea, N. & Nischt, R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol.* 132, 1–10 (2009).
109. Prost-squarcioni, C., Freitag, S., Heller, M. & Boehm, N. Histologie fonctionnelle du derme. *Ann. Dermatol. Venereol.* 135, 5–20 (2008).
110. Haniffa, M. A., Collin, M. P., Buckley, C. D. & Dazzi, F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94, 258–63 (2009).
111. Nolte, S. V., Xu, W., Rennekampff, H.-O. & Rodemann, H. P. Diversity of Fibroblasts_A Review on Implications for Skin Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs* 187, 165–176 (2008).
112. Chang, H. Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D. & Brown, P. O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12877–12882 (2002).
113. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503 (2003).
114. Saalbach, A., Janik, T., Busch, M., Herbert, D., Anderegg, U. & Simon, J. C. Fibroblasts support migration of monocyte-derived dendritic cells by secretion of PGE2 and MMP-1. *Exp. Dermatol.* 24, 598–604 (2015).
115. Agache, P. G., Monneur, C., Leveque, J. L. & De Rigal, J. Original Contributions Mechanical Properties and Young's Modulus of Human Skin in Vivo. *Arch Dermatol Res* 269, 221–232 (1980).
116. Kalra A, Lowe A & Am, A.-J. Mechanical Behaviour of Skin: A Review. *J Mater. Sci Eng* 5, 4–8 (2016).
117. Robert L. Ehrmann and George O. GEY. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen type II. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 1375–1403 (1956).
118. Bell, E., Ehrlich, H. P., Sher, S., Merrill, C., Sarber, R., Hull, B., Nakatsuji, T., Church, D. & Buttle, D. J. Development and use of a living skin equivalent. *Plast. Reconstr. Surg.* 67, 386–392 (1981).
119. Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., Nusgens, B. & Neveux, Y. The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* 81, 2–10 (1983).
120. Coulomb, B., Saiag, P., Bell, E., Breitburd, F., Lebreton, C., Heslan, M. & Dubertret, L. A new method for studying epidermalization in vitro. *Br. J. Dermatol.* 114, 91–101 (1986).
121. Berthod, F., Hayek, D., Damour, O. & Collombel, C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* 14, 749–754 (1993).
122. Auxenfans, C., Fradette, J., Lequeux, C., Germain, L., Kinikoglu, B., Bechetoille, N., Braye, F., Auger, F. A. & Damour, O. Evolution of three dimensional skin equivalent models

- reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur. J. Dermatology* 19, 107–113 (2009).
123. Tupin, S., Molimard, J., Cenizo, V., Hoc, T., Sohm, B. & Zahouani, H. Multiscale Approach to Characterize Mechanical Properties of Tissue Engineered Skin. *Ann. Biomed. Eng.* 44, 2851–2862 (2016).
124. Lee, V., Singh, G., Trasatti, J. P., Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., Yoo, S.-S., Dai, G., Karande, P. & Lee Vivian Trasatti John P., Bjornsson Chris, Xu Xiawei, Tran Thanh Nga, Yoo Seung-Schik, Dai Guohao, and Karande Pankaj., S. G. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng. Part C Methods* 20, 473–484 (2014).
125. Binder, K. W., Zhao, W., Aboushwareb, T., Dice, D., Atala, A. & Yoo, J. J. In situ bioprinting of the skin for burns. *J. Am. Coll. Surg.* 211, 76–82 (2010).
126. Ng, W. L., Qi, J. T. Z., Yeong, W. Y. & Naing, M. W. Proof-of-concept: 3D bioprinting of pigmented human skin constructs. *Biofabrication* 10, 1–17 (2018).
127. Ng, W. L., Yeong, W. Y. & Naing, M. W. Polyvinylpyrrolidone-Based Bio-Ink Improves Cell Viability and Homogeneity during Drop-On-Demand Printing. *Materials (Basel)*. 10, 2–13 (2017).
128. Kim, B. S., Lee, J., Gao, G. & Cho, D. Direct 3D cell-printing of human skin with functional transwell system. *Biofabrication* 2, 2–12 (2017).
129. Yan, W.-C., Davoodi, P., Vijayavenkataraman, S., Tian, Y., Ng, W. C., Fuh, J. Y. H., Robinson, K. S. & Wang, C.-H. 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1–21 (2018).
130. Coulomb, B. Reconstruction cutanée et communications tissulaires. *médecine/sciences* 4, 101–108 (1988).
131. Lootens, L., Brusselaers, N., Beele, H. & Monstrey, S. Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: an update. *Int. Wound J.* 10, 6–12 (2013).
132. He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M. & Li, X. Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burn. trauma* 6, 5–15 (2018).
133. Pourchet, L. J., Thepot, A., Albouy, M., Courtial, E. J. E. J., Boher, A., Blum, L. J. L. J. & Marquette, C. A. C. A. Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv. Healthc. Mater.* 6, 1–15 (2016).
134. Hardingham, T., Tew, S. & Murdoch, A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res.* 4, 63–68 (2002).
135. Chevalier, X. & Richette, P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatol.* 2, 41–58 (2005).
136. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461–468 (2009).
137. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J. & Noël, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* 27, 307–314 (2009).

138. Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J.-M., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F. & Galera, P. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2414–2440 (2014).
139. Di Bella, C., Fosang, A., Donati, D. M., Wallace, G. G. & Choong, P. F. M. 3D Bioprinting of Cartilage for Orthopedic Surgeons: Reading between the Lines. *Front Surg* 2, 39–45 (2015).
140. Trunfio, A.-M. Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial. (2007).
141. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689 (2006).
142. Tse, J. R. & Engler, A. J. Stiffness Gradients Mimicking In Vivo Tissue Variation Regulate Mesenchymal Stem Cell Fate. *PLoS One* 6, 45–54 (2011).
143. Matsiko, A., Levingstone, T. J. & O'Brien, F. J. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials (Basel)*. 6, 637–668 (2013).
144. Kesti, M., Eberhardt, C., Pagliccia, G., Kenkel, D., Grande, D., Boss, A. & Zenobi-Wong, M. Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials. *Adv. Funct. Mater.* 25, 7406–7417 (2015).
145. Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Martinez Avila, H., Hagg, D. & Gatenholm, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* 56–75 (2015).
146. Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P. T., Ikkala, O. & Lindström, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. *Biomacromolecules* 8, 1934–1941 (2007).
147. Nguyen, D., Hägg, D. A., Forsman, A., Ekholm, J., Nimkingratana, P., Brantsing, C., Kalogeropoulos, T., Zaunz, S., Concaro, S., Britberg, M., Lindahl, A., Gatenholm, P., Enejder, A. & Simonsson, S. Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. 88–91 (2017).
148. Kundu, J., Shim, J.-H., Jang, J., Kim, S.-W. & Cho, D.-W. An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 1286–1297 (2015).
149. Vouyouka, A. G., Pfeiffer, B. J., Liem, T. K., Taylor, T. A., Mudaliar, J. & Phillips, C. L. The role of type I collagen in aortic wall strength with a homotrimeric $[\alpha 1(I)]_3$ collagen mouse model. *J. Vasc. Surg.* 33, 1263–1270 (2001).
150. Ardalani, H., Assadi, A. H. & Murphy, W. L. Structure, Function, and Development of Blood Vessels: Lessons for Tissue Engineering. *Eng. Transl. Med.* 155–182 (2014).
151. Stegemann, J. P., Kaszuba, S. N. & Rowe, S. L. Review: Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-Based Biomaterials. *Tissue Eng.* 13, 2601–2613 (2007).

152. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G. & Nishigaki, I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1057–69 (2013).
153. Hoch, E., Tovar, G. E. & Borchers, K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur J Cardiothorac Surg* 46, 767–778 (2014).
154. Wang, N., Zhang, R., Wang, S.-J., Zhang, C.-L., Mao, L.-B., Zhuang, C.-Y., Tang, Y.-Y., Luo, X.-G., Zhou, H. & Zhang, T.-C. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor-A signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1447–1456 (2013).
155. Nur Fariha, M., Chua, K., Tan, G., Lim, Y. & Hayati, A. Endogenous and induced angiogenic characteristics of human chorion-derived stem cells. *Cell Biol. Int.* 36, 1145–1153 (2012).
156. Benavides, O. M., Petsche, J. J., Moise, K. J., Johnson, A. & Jacot, J. G. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A* 18, 1123–31 (2012).
157. Park, H.-J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D. & Galper, J. B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* 2, 93–101 (2006).
158. Choi, M., Lee, H.-S., Naidansaren, P., Kim, H.-K., O, E., Cha, J.-H., Ahn, H.-Y., Yang, P. I., Shin, J.-C. & Joe, Y. A. Proangiogenic features of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 560–570 (2013).
159. Poh, C. K., Shi, Z., Lim, T. Y., Neoh, K. G. & Wang, W. The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 31, 1578–1585 (2010).
160. Can, A. & Karahuseyinoglu, S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 25, 2886–2895 (2007).
161. Valentijn, K. M., Sadler, J. E., Valentijn, J. A., Voorberg, J. & Eikenboom, J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 117, 5033–43 (2011).
162. Hudon, V., Berthod, F., Black, A. F., Damour, O., Germain, L. & Auger, F. A. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br. J. Dermatol.* 148, 1094–1104 (2003).
163. Bajpai, V. K. & Andreadis, S. T. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 18, 405–425 (2012).
164. Pashneh-Tala, S., MacNeil, S. & Claeysens, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 22, 68–78 (2015).
165. L’heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L. & Auger, F. A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12, 47–56 (1998).
166. Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R. & Langer, R.

- Functional arteries grown in vitro. *Science* 284, 489–493 (1999).
167. Nishiyama, Y., Nakamura, M., Henmi, C., Yamaguchi, K., Mochizuki, S., Nakagawa, H. & Takiura, K. Development of a Three-Dimensional Bioprinter: Construction of Cell Supporting Structures Using Hydrogel and State-Of-The-Art Inkjet Technology. *J. Biomech. Eng.* 131, 11–16 (2009).
 168. Xu, C., Chai, W., Huang, Y. & Markwald, R. R. Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 3152–3160 (2012).
 169. Tan, E. Y. S. & Yeong, W. Y. Concentric bioprinting of alginate-based tubular constructs using multi-nozzle extrusion-based technique. *Int. J. Bioprinting* 1, 49–56 (2015).
 170. Leong, M. F., Toh, J. K. C., Du, C., Narayanan, K., Lu, H. F., Lim, T. C., Wan, A. C. A. & Ying, J. Y. Patterned prevascularised tissue constructs by assembly of polyelectrolyte hydrogel fibres. *Nat. Commun.* 4, 23–53 (2013).
 171. Rui Yao, R., Renji Zhang, R., Yongnian Yan, Y. & Xiaohong Wang, X. In Vitro Angiogenesis of 3D Tissue Engineered Adipose Tissue. *J. Bioact. Compat. Polym.* 24, 5–24 (2009).
 172. Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C. & Spence, D. M. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Anal. Chem.* 86, 3240–3253 (2014).
 173. Bertassoni, L. E., Cecconi, M., Manoharan, V., Nikkhah, M., Hjortnaes, J., Cristino, A. L., Barabaschi, G., Demarchi, D., Dokmeci, M. R., Yang, Y. & Khademhosseini, A. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip* 14, 2202–2211 (2014).
 174. Miller, J. S., Stevens, K. R., Yang, M. T., Baker, B. M., Nguyen, D.-H. T., Cohen, D. M., Toro, E., Chen, A. A., Galie, P. A., Yu, X., Chaturvedi, R., Bhatia, S. N. & Chen, C. S. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat. Mater.* 11, 768–774 (2012).
 175. Attwood, D., Collett, J. H. & Tait, C. J. The micellar properties of the poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution. *Int. J. Pharm.* 26, 25–33 (1985).
 176. Shi, T., Li, Z., Zhang, Q., Zheng, D. & Li, Z. Pluronic F127 as a drug vehicle used in chick embryo chorioallantoic membrane shell-less model. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 1997–1999 (2015).
 177. Kolesky, D. B., Truby, R. L., Gladman, A. S., Busbee, T. A., Homan, K. A. & Lewis, J. A. 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Adv. Mater.* 26, 3124–3130 (2014).
 178. Gaetani, R., Doevendans, P. A., Metz, C. H. G., Alblas, J., Messina, E., Giacomello, A. & Sluijter, J. P. G. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials* 33, 1782–1790 (2012).
 179. Jana, S. & Lerman, A. Bioprinting a cardiac valve. *Biotechnol. Adv.* 33, 1503–1521 (2015).
 180. Homan, K. A., Kolesky, D. B., Skylar-Scott, M. A., Herrmann, J., Obuobi, H., Moisan, A. & Lewis, J. A. Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips.

- Sci. Rep.* 6, 1–13 (2016).
181. Karasek, M. A. & Charlton, M. E. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J. Invest. Dermatol.* 56, 205–210 (1971).
 182. Moffat, K. L., Neal, R. A., Freed, L. E. & Guilak, F. Engineering Functional Tissues. *Princ. Tissue Eng.* 237–259 (2014).
 183. Malda, J., Rouwkema, J., Martens, D. E., Le Comte, E. P., Kooy, F. K., Tramper, J., van Blitterswijk, C. A. & Riesle, J. Oxygen Gradients in Tissue-Engineered PEGT/PBT Cartilaginous Constructs: Measurement and Modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 9–18 (2004).
 184. Sutherland, R. M., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B. & Mueller-Klieser, W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res.* 46, 5320–5329 (1986).
 185. Wendt, D., Marsano, A., Jakob, M., Heberer, M. & Martin, I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 205–214 (2003).
 186. Martin, Y. & Vermette, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26, 7481–7503 (2005).
 187. Blose, K. J., Krawiec, J. T., Weinbaum, J. S. & Vorp, D. A. Bioreactors for Tissue Engineering Purposes. *Regen. Med. Appl. Organ Transplant.* 177–185 (2014).
 188. Griffith, L. G. & Swartz, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 211–224 (2006).
 189. Almarza, A. J. & Athanasiou, K. A. Seeding Techniques and Scaffolding Choice for Tissue Engineering of the Temporomandibular Joint Disk. *Tissue Eng.* 10, 1787–1795 (2004).
 190. Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V., Zichner, L., Kaplan, D., Langer, R. & Vunjak-Novakovic, G. Bone Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells: Effects of Scaffold Material and Medium Flow. *Ann. Biomed. Eng.* 32, 112–122 (2004).
 191. Bursac, N., Papadaki, M., Cohen, R. J., Schoen, F. J., Eisenberg, S. R., Carrier, R., Vunjak-Novakovic, G. & Freed, L. E. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am. J. Physiol.* 277, 433–444 (1999).
 192. Just, L., Kürsten, A., Borth-Bruhns, T., Lindenmaier, W., Rohde, M., Dittmar, K. & Bader, A. Formation of three-dimensional fetal myocardial tissue cultures from rat for long-term cultivation. *Dev. Dyn.* 235, 2200–2209 (2006).
 193. Richards, D., Jia, J., Yost, M., Markwald, R. & Mei, Y. 3D Bioprinting for Vascularized Tissue Fabrication. *Ann. Biomed. Eng.* 45, 132–147 (2017).
 194. Gaspar, D. A., Gomide, V. & Monteiro, F. J. The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* 2, 167–75 (2012).

195. Mertens, J. P., Sugg, K. B., Lee, J. D. & Larkin, L. M. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue. *Regen. Med.* 9, 89–100 (2014).
196. Koning, M., Harmsen, M. C., van Luyn, M. J. A. & Werker, P. M. N. Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 407–415 (2009).
197. Powell, C. A., Smiley, B. L., Mills, J. & Vandeburgh, H. H. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Physiol.* 283, 57–65 (2002).
198. Zimmermann, W.-H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didié, M., Münzel, F., Heubach, J. F., Kostin, S., Neuhuber, W. L. & Eschenhagen, T. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.* 90, 223–230 (2002).
199. Radisic, M., Park, H., Shing, H., Consi, T., Schoen, F. J., Langer, R., Freed, L. E. & Vunjak-Novakovic, G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 18129–18134 (2004).
200. El-Ayoubi, R., DeGrandpré, C., DiRaddo, R., Yousefi, A.-M. M. & Lavigne, P. Design and dynamic culture of 3D-scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomater. Appl.* 25, 429–444 (2011).
201. Salinas, E. Y., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A Guide for Using Mechanical Stimulation to Enhance Tissue-Engineered Articular Cartilage Properties. *Tissue Eng. Part B Rev.* 1–41 (2018).
202. Mauck, R. L., Nicoll, S. B., Seyhan, S. L., Ateshian, G. A. & Hung, C. T. Synergistic Action of Growth Factors and Dynamic Loading for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 9, 597–611 (2003).
203. Naderi, H., Matin, M. M. & Bahrami, A. R. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *J. Biomater. Appl.* 26, 383–417 (2011).
204. Boonthekul, T. & Mooney, D. J. Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 580–587 (2003).
205. Porter, N. A., Bush, K. A. & Kinter, K. S. Photo-reversible binding of thrombin to avidin by means of a photolabile inhibitor. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 38, 61–69 (1997).
206. Stoddard, B. L., Bruhnke, J., Koenigs, P., Porter, N., Ringe, D. & Petsko, G. A. Photolysis and deacylation of inhibited chymotrypsin. *Biochemistry* 29, 8042–8051 (1990).
207. Fulchiron, R., Revenu, P., Kim, B. S., Carrot, C. & Guillet, J. Extrudate swell and isothermal melt spinning analysis of linear low density polyethylene using the Wagner constitutive equation. *J. Nonnewton. Fluid Mech.* 69, 113–136 (1997).
208. Gao, Q., He, Y., Fu, J. Z., Liu, A. & Ma, L. Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. *Biomaterials* 61, 203–215 (2015).

209. C.A Marquette; L.J Pourchet; A. Thépot. Procédé de fabrication de substituts cutanés par dépôt additif. N° dépôt 15 63461 (30/12/2015). (2015).
210. Rimann, M., Bono, E., Annaheim, H., Bleisch, M. & Graf-Hausner, U. Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells. *J Lab Autom* 1–18 (2015).
211. Michael, S., Sorg, H., Peck, C.-T. T., Koch, L., Deiwick, A., Chichkov, B., Vogt, P. M. & Reimers, K. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One* 8, 57–64 (2013).
212. Davis, G. E. & Senger, D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* 97, 1093–107 (2005).
213. Martínez Ávila, H., Schwarz, S., Rotter, N. & Gatenholm, P. 3D bioprinting of human chondrocyte-laden nanocellulose hydrogels for patient-specific auricular cartilage regeneration. *Bioprinting* 1, 22–35 (2016).
214. Henrionnet, C., Liang, G., Roeder, E., Dossot, M., Wang, H., Magdalou, J., Gillet, P. & Pinzano, A. Hypoxia for Mesenchymal Stem Cell Expansion and Differentiation: The Best Way for Enhancing TGF β -Induced Chondrogenesis and Preventing Calcifications in Alginate Beads. *Tissue Eng. Part A* 1–19 (2017).
215. Möller, T., Amoroso, M., Hägg, D., Brantsing, C., Rotter, N., Apeltgren, P., Lindahl, A., Kölby, L. & Gatenholm, P. In Vivo Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs. *Plast. Reconstr. Surg. - Glob. Open* 5, e1227 (2017).
216. Kang, H.-W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J. & Atala, A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat. Biotechnol.* 34, 312–319 (2016).
217. Paulsen, S. J. & Miller, J. S. Tissue Vascularization Through 3D Printing: Will Technology Bring Us Flow? *Dev. Dyn.* 244, 629–640 (2015).
218. Grayson, W. L. W., Martens, T. P., Eng, G. M., Radisic, M. & Vunjak-Novakovic, G. Biomimetic approach to tissue engineering. *Cell* 20, 665–673 (2010).
219. Asakawa, N., Shimizu, T., Tsuda, Y., Sekiya, S., Sasagawa, T., Yamato, M., Fukai, F. & Okano, T. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials* 31, 3903–3909 (2010).
220. Sukmana, I. & Vermette, P. The effects of co-culture with fibroblasts and angiogenic growth factors on microvascular maturation and multi-cellular lumen formation in HUVEC-oriented polymer fibre constructs. *Biomaterials* 31, 5091–5099 (2010).
221. Eckermann, C. W., Lehle, K., Schmid, S. A., Wheatley, D. N. & Kunz-Schughart, L. A. Characterization and modulation of fibroblast/endothelial cell co-cultures for the *in vitro* preformation of three-dimensional tubular networks. *Cell Biol. Int.* 35, 1097–1110 (2011).
222. Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P. & Meenen, N. M. Bioreactor design for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 235–245 (2005).

223. Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A. & Pinnell, S. R. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2879–2882 (1981).
224. Shu, X. Z., Ghosh, K., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y., Clark, R. A. & Prestwich, G. D. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res.* 68A, 365–375 (2004).
225. Tseng, T.-C., Wong, C.-W., Hsieh, F.-Y. & Hsu, S. Biomaterial Substrate-Mediated Multicellular Spheroid Formation and Their Applications in Tissue Engineering. *Biotechnol. J.* 12, 1–17 (2017).

PUBLICATIONS

Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach

Léa J. Pourchet, Amélie Thepot, Marion Albouy, Edwin J. Courtial, Aurélie Boher, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette*

FULL PAPER

Organ *in vitro* synthesis is one of the last bottlenecks between tissue engineering and transplantation of synthetic organs. Bioprinting has proven its capacity to produce 3D objects composed of living cells but highly organized tissues such as full thickness skin (dermis + epidermis) are rarely attained. The focus of the present study is to demonstrate the capability of a newly developed ink formulation and the use of an open source printer, for the production of a really complete skin model. Proofs are given through immunostaining and electronic microscopy that the bioprinted skin presents all characteristics of human skin, both at the molecular and macromolecular level. Finally, the printability of large skin objects is demonstrated with the printing of an adult-size ear.

Although these conventional tissue-engineering strategies led to the development of first generations of engineered skin, such processes are usually time consuming and confined to the production of constructs having mostly flat and predetermined geometries. To overcome these limitations of conventional skin tissue-engineering schemes, 3D printing approaches were proposed with interesting first results.^[6] It is then now a reality to use sophisticated machine control to create engineered skin models. Several researchers have thus demonstrated the potential of skin bioprinting using inkjet, bio-extrusion, and laser-based techniques.^[7–11]

1. Introduction

Over the past four decades, significant milestones have been reached in the field of tissue engineering of human skin with early efforts mainly focused on developing skin substitutes for clinical uses.^[1] These were subsequently followed by rapid development of reliable and predictive 3D tissue-like models, bringing a broad range of approaches available for the assessment of the efficacy and safety of substances and for fundamental research.^[1,2]

Since the successful isolation and cultivation of human epidermal keratinocytes in 1975,^[3] tissue-engineered skin has developed from epidermal substitutes to full-thickness skin containing various derived-skin cell types by using different biomaterial scaffolds. They are typically represented by synthetic substrates (e.g., nylon and polycarbonate) possibly in microfluidic systems,^[4] acellular matrix protein scaffolds (e.g., collagen, glycosaminoglycans, and fibrin),^[2] or dead de-epidermized dermis populated by human dermal fibroblasts on top of which are further seeded human epidermal keratinocytes.^[5]

However, despite these progresses in skin bioprinting, a scaffold-free model bioprinted with human primary skin cells is still not available.

To conduct such research, our laboratory has perfected a unique bio-ink composed of alginate,^[12,13] gelatin,^[13] and fibrinogen^[14] developed together with optimum printing conditions and 3D printer functions. The chosen printer is here an open source machine developed by our team and fully compatible with laboratory safety standards (source code and schemes in Sections S1 and S2, Supporting Information, respectively).

The study presented here is focused on the demonstration of the capability of our 3D printing to produce dermis/epidermis systems in an effective way and with a cellular structuration of the mature tissue highly similar to the *in vivo* skin composition and organization. The proof of concept was then demonstrated on flat skin objects but the final aim of the developed technique is of course the production of highly complex skin architecture applicable to surgical reconstruction. An example of such skin tissue, an adult-size ear, is presented at the end of the study.

L. J. Pourchet, Dr. E. J. Courtial, Prof. L. J. Blum,
Dr. C. A. Marquette
3d.FAB, Univ Lyon
Université Lyon1
CNRS, INSA, CPE-Lyon
ICBMS

UMR 5246, 43, Bd du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne cedex, France
E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr

Dr. A. Thepot, Dr. M. Albouy, A. Boher
LabSkin Creations
Edouard Herriot Hospital
5 place d'Arsonval, Bâtiment 5, 69437 Lyon, France



DOI: 10.1002/adhm.201601101

2. Results and Discussion

The bio-ink developed hereby for skin printing was of course formulated on the basis of established methods for bio-ink development. Nevertheless, conditions such as solubilization temperature of the components, proportions of the different biomaterials, printing temperatures, and post-treatment conditions were specifically developed to enable both complex prints and skin development (see the Experimental Section). For example, consolidation post-treatment was a long lasting optimization to be able to gain homogeneous stiffness of few centimeters' thick material.

Is 3D Bioprinting the Future of Reconstructive Surgery?

Nicolas Sigaux, MD,*†; Léa Pourchet, MS,†; Marion Albouy, MS,‡; Amélie Thépot, PhD,‡; Christophe Marquette, PhD†

Tissue engineering has been revolutionized since 2004 by the emergence of three-dimensional (3D) bioprinting.¹ In this approach, additive manufacturing techniques (microextrusion, laser-assisted printing, and inkjet printing) are used to create autologous biological tissues. Mesenchymal stem cells or differentiated cells are placed in a fluid hydrogel to form a "bio-ink."²

The computer-assisted design of the numerical 3D model is based on an ".stl" file, which can be produced from the computed tomography scan of a tissue defect.³

To date, the tissues (eg, liver tissue, heart tissue, skin, cartilage) produced with in vitro 3D bioprinting have mostly been centimeter scale, and promising results have been obtained. In vitro bioprinting of composite tissues with different cell types has also been performed with a few encouraging re-

sults in animal studies.⁴ The growing interest in 3D bioprinting is highlighted by the tripling between 2012 and 2015 of research articles published on this topic. Four journals dedicated specifically to bioprinting have recently been launched.

The 3d.FAB unit at the University of Lyon (Université Claude Bernard-Lyon 1), created in early 2015, is a unique platform in Europe in which biochemists, biologists, engineers, and physicians are studying applications for 3D printing in medicine and the life sciences, notably bioprinting (Web site: <http://fabric-advanced-biology.univ-lyon1.fr/>).

Our team, in partnership with LabSkin Creations and the Laboratory of Cutaneous Substitutes (Edouard Herriot Hospital, Lyon) has developed a specific hydrogel for skin microextrusion bioprinting. Its composition has been patented. We routinely prepare skin in reproducible 1-cm² pieces, 0.5-cm thick (Fig. 1), and pieces as large as 200 cm² on demand. Histological examination shows that the skin samples prepared are of high quality (Fig. 2). Cell viability is 100%. Using this approach, full-thickness skin is obtained within 21 days, compared with 45 days for traditional tissue engineering techniques.

We will focus next on the bioprinting of bone. Three different types of bioprinted bone grafts for mandibular reconstruction will be compared, first in vitro and then after implantation in animals.

The unique characteristic of 3D bioprinting is the cellular ink that is used, from which precisely shaped grafts can be produced. This technique differs from traditional tissue engineering in which a scaffold is first created and then filled with cells.



Fig. 1. Photograph of a skin piece at the end of microextrusion process.

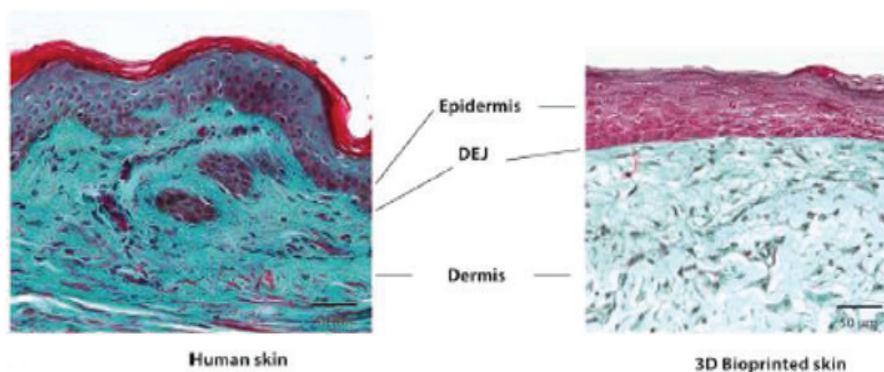


Fig. 2. Comparison of optical microscopy images of equivalent slices of normal human skin and printed skin after 26 days of culture. The tissues were stained with Masson's trichrome. DEJ, dermoepidermal junction.

From the *Centre Hospitalo-Universitaire Lyon-Sud, Université Lyon I, Lyon, France; †Université Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS, Villeurbanne, France; and ‡LabSkin Creations, Lyon, France.

Copyright © 2017 The Authors. Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of The American Society of Plastic Surgeons. This is an open-access article distributed under the terms of the

Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2017;5:e1246; doi:10.1097/GOX.0000000000001246; Published online 1 March 2017.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau International



(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/1 15056 A1

(43) Date de la publication internationale
6 juillet 2017 (06.07.2017)

W I P O I P C T

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 35/36 (2015.01) B33Y 80/00 (2015.01)

SANTOS, Morgan; 20 allée des Lauriers, La Maladière,
38160 SAINT VERAND (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2016/053683

(74) Mandataire : SCHMIDT, Martin; DCAS CONSEIL, 15
rue Emile Zola, 69002 LYON (FR).

(22) Date de dépôt international :
29 décembre 2016 (29.12.2016)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1563461 30 décembre 2015 (30.12.2015) FR
1651797 3 mars 2016 (03.03.2016) FR

(71) Déposants : LAB SKIN CREATIONS [FR/FR]; Groupe-
ment Hospitalier Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval,
69003 LYON (FR). UNIVERSITE CLAUDE BER-
NARD LYON I [FR/FR]; 43 boulevard du 11 Novembre
1918, 69100 VILLEURBANNE (FR). CENTRE NATIO-
NAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3
rue Michel Ange, 75794 PARIS CEDEX 16 (FR). INS-
TITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES
DE LYON [FR/FR]; 20 avenue Albert Einstein, 69621
VILLEURBANNE CEDEX (FR). ECOLE SUPER-
IEURE DE CHIMIE, PHYSIQUE, ELECTRONIQUE
DE LYON [FR/FR]; 43 boulevard du 11 novembre, BP
2077, 69616 VILLEURBANNE CEDEX (FR).

(72) Inventeurs : MARQUETTE, Christophe; 78 bis rue
Louis Becker, 69100 VILLEURBANNE (FR). POUR-
CHET, Léa; 5 rue du Plat, 69002 LYON (FR). THEPOT,
Amélie; 258 rue Vendôme, 69003 LYON (FR). DOS

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec revendications modifiées (art. 19.1))

(54) Title : METHOD FOR MANUFACTURING BODY SUBSTITUTES BY ADDITIVE DEPOSITION

(54) Titre : PROCÉDÉ DE FABRICATION DE SUBSTITUTS CORPORELS PAR DÉPÔT ADDITIF

(57) Abstract : The invention relates to a method for manufacturing a bio-ink by additive deposition, which comprises supplying: a first solution including between 5 and 40 wt.% gelatin; a second solution including between 15 and 35 wt.% alginate; a third solution including between 1 and 15 wt.% fibrinogen, and optionally living cells in suspension; and creating a mixture including: around 35 to 65 vol.% of the first solution; around 15 to 35 vol.% of the second solution; and around 15 to 35 vol.% of the third solution, said proportions being selected so that they add up to 100%. Said bio-ink allows the additive deposition of objects that can be polymerised by means of a solution including calcium ions and thrombin. Said objects can be incubated and can be used as a substitute for body tissue, for example (with added fibroblasts) as skin substitute.

(57) Abrégé : Procédé de fabrication d'une bio-encre pour dépôt additif, dans lequel on approvisionne : une première solution comprenant entre 5% et 40% massiques de gélatine, -une seconde solution comprenant entre 15% et 35% massiques d'alginate, -une troisième solution comprenant entre 1% et 15% massiques de fibrinogène, et optionnellement des cellules vivantes en suspension; et on crée un mélange comprenant: environ 35% à 65% volumiques de la première solution; environ 15% à 35% volumiques de la seconde solution; environ 15% à 35% volumiques de la troisième solution; ces proportions étant choisies de manière à s'additionner à 100%. Cette bio-encre permet le dépôt additif d'objets qui peuvent être polymérisés à l'aide d'une solution comprenant des ions de calcium et de la thrombine. Ces objets peuvent être incubés et peuvent servir comme substitut de tissu corporel, par exemple (avec des fibroblastes incorporés) comme substitut cutané.

WO 2017/115056 A1



Contents lists available at ScienceDirect

Bioprinting

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bprint

Large 3D bioprinted tissue: Heterogeneous perfusion and vascularization

Lea Pourchet^a, Emma Petiot^a, Céline Loubière^c, Eric Olmos^c, Morgan Dos Santos^b,
Amélie Thépot^b, Blum J. Loïc^a, Christophe A. Marquette^{a,*}^a 3d.FAB, Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, Bat. Lederer, 1 rue Victor Grignard, 69100 Villeurbanne, France^b LabSkin Creations, Edouard Herriot Hospital, 5 place d'Arsonval, Bâtiment 5, 69437 Lyon, France^c Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

3D bioprinting
Bioreactor
Computational fluid dynamics
Endothelial cells
Fibroblasts
Microvascularization

ABSTRACT

Large bioprinted tissues (dm³) are more and more accessible but their *in vitro* culture and maturation conditions stay an uncharted territory. In the present report, we aim to present a preliminary study of endothelialized large bioprinted tissues (fibroblast and human dermal microvascular endothelial cells) maturation using silicone 3D printed perfusion system (bioreactor). Computational Fluid Dynamics (CFD) simulation was used to relate the theoretical culture medium flow path within the large bioprinted tissue with the actual tissue morphology and composition, obtained through histological observations. The obtained results demonstrate the positive impact of using dynamic maturation conditions (300 mL/h culture medium flow rate) on the extracellular matrix production and the conservation of the large bioprinted tissue internal geometry. Clear differences between static and dynamic culture conditions were herein found. Finally, typical microvascular organization, composed of human dermal microvascular endothelial cells organized around an open lumen, were found within the large bioprinted tissue.

1. Introduction

In the last 5 years, bioprinting became a highly active scientific area in which multidisciplinary expertise is the key to success [1]. Nevertheless, the expectations of the field for regenerative medicine applications, involving large living tissues (in the cm³ to dm³ range) were far than fulfill. Indeed, issues related to vascularization of large tissue or organ strongly impedes their *in vitro* maturation. A strong effort should be put in processes and scale-up strategies development, suitable for customized tissues' production [2]. This scale-up will have to go through specific and controlled bioreactors developments and behavior modeling. For a better understanding, defining the word "bioreactor" is essential. Martin et al. [3] defined bioreactors as devices in which biological and/or biochemical processes operate under closely monitored and tightly controlled environmental and operating conditions (*e.g.*, pH, temperature, pressure, nutrient supply, and waste removal). Conventionally, bioreactor studies may be separated into two groups: bioreactor for cell culture (either suspension or 2D adherent cells) and bioreactor for *in vitro* tissues maturation. While the first group has been exploited and studied for many years and already benefits from abundant literature, for example for virus or active biomolecule productions [4], the second one lacks adaptability, particularly when it comes to specific tissue maturation conditions (mechanical stress, perfusion) but

also concerning the actual design and shape of the targeted tissue or organ. Only seldom published studies attempted to address these issues, like specific maturation bioreactors for large bone defects [5], osteochondral constructs [6], cardiac tissues [7], biomaterial sponge vascularization [8].

In one of our previous work, the achievement of 3D bioprinted fibroblast-based tissues (cm² full skin patches) was demonstrated [9]. Nevertheless, bioprinted tissues size and thickness were limited by the fact that these tissue were not vascularized. Consequently, the increase of these tissues' size up to the dm³, necessitates the concomitant development of i) specific bioprinted tissue architecture and ii) dedicated perfusion system maintaining cell viability thanks to continuous medium flow and nutriment supply.

The present work took place in the general context of the culture and maturation of large bioprinted tissues, before *in situ* neo-vascularization takes place. In an attempt to bring partial solution to this problem, the present work evaluates possible efficient avenues for the production of dm³ bioprinted tissues through: i) internal tissue geometry leading to easy culture medium perfusion and ii) design of on demand perfusion system (bioreactor) perfectly fitting the size and shape of the bioprinted tissues. Such system is expected to allow both the maturation of large bioprinted tissues in dynamic conditions and the induction of vascularization. Our secondary goal was to obtain

* Corresponding author.

E-mail address: christophe.marquette@univ-lyon1.fr (C.A. Marquette).

COMMUNICATIONS

Liste de communications internationales

L.J.Pourchet, C.Mandon, E.J.Courtial, A.Thépot, M.Albouy, E.Petiot, C.A.Marquette, Bioprinting for tissue engineering. *3D HEALS: Value chain of healthcare 3D printing innovations*, 21th November 2017, Paris, France. Oral communication

L.J.Pourchet, C.Mandon, E.J.Courtial, A.Thépot, M.Albouy, E.Petiot, C.A.Marquette, The culture of large tissues bioprinted: the importance of a bioreactor. *3D printing & bioprinting in healthcare conference*, 12th-13th October 2017, Düsseldorf, Germany. Oral communication

L.J.Pourchet, A.Thépot, A.Pinzano, C.Henrionnet, E.Perrier-Groult, L.J.Blum, C.A.Marquette, Skin and cartilage bioprinting: current advance. *Workshop regenerative medicine*, 24th-26th October 2016, Bordeaux. Oral communication

L.J.Pourchet, A.Thépot, M.Dos Santos, A.Boher, L.J.Blum, C.A.Marquette, Skin equivalent through bioprinting. *World Biomaterials Congress*, 16th-23th May 2016, Montreal. Poster communication

L.J.Pourchet, A.Thépot, M.Dos Santos, A.Boher, L.J.Blum, C.A.Marquette, Skin equivalent through bioprinting. *Bioprinting Conference*, 26th-27th January 2016, Maastricht. Oral communication

L.J.Pourchet, A.Thépot, M.Dos Santos, A.Boher, L.J.Blum, C.A.Marquette, Skin equivalent through bioprinting. *BIOMAT*, 12th-14th October 2015, Ile de Ré. Flash presentation

L.J.Pourchet, L.J.Blum and C.A.Marquette, Creation of an open-source 3D bioprinter for living cells. *International Bioprinting Congress*, 9th-10th July 2015, Singapore. Oral communication

L.J.Pourchet, L.J.Blum and C.A.Marquette, Creation of an open-source 3D bioprinter for living cells. *Tissue Engineering & Bioprinting*, 9th-10th February 2015, Boston (USA). Poster communication

Résumé

Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire

Cette thèse a pour objectif de développer une méthode de bioimpression 3D de tissus vivants. Ce nouveau champ disciplinaire qu'est la bioimpression 3D a pour but la fabrication de tissus grâce à une bioimprimante en s'appuyant sur les principes fondamentaux de l'ingénierie tissulaire.

Pour mener à bien ces travaux, une bio-encre spécifique a été formulée à l'aide de biomatériaux naturels afin de répondre aux critères de biocompatibilité, de maintien de la viabilité cellulaire et de support pour la formation d'un réseau cellulaire en trois dimensions. Plusieurs caractérisations ont ainsi pu être mises en place afin de démontrer l'innocuité du procédé de bioimpression 3D sur les cellules utilisées.

L'évolution technologique de la bioimprimante utilisée est ensuite présentée en partant d'une technologie open-source pour arriver à l'utilisation d'un bras robotique 6 axes. Le cahier des charges toujours plus exigeant de cette bioimprimante a évolué au fil des quatre différents prototypes utilisés.

La dernière partie de ce travail de thèse concerne les résultats de bioimpression de tissus obtenus grâce à de multiples collaborations. Plusieurs tissus seront étudiés et caractérisés : le derme et sa maturation vers une peau totale, le cartilage et la bioimpression de cellules souches mésenchymateuses, un tissu microvascularisé grâce à l'incorporation de cellules endothéliales et pour finir un tissu perfusable en utilisant une approche de culture dynamique en bioréacteur.

Abstract

Bioink development for 3D bioprinting of living tissues: formulation study and tissue development characterization

This thesis focus on the development of a 3D bioprinting process for living tissue. This new field of research, 3D bioprinting, aims to fabricate tissues using a bioprinter based on the tissue engineering fundamentals.

To carry out this work, a specific bioink was formulated using natural biomaterials to meet the requirement of biocompatibility, cell viability and support of a three-dimensional cellular network. Several characterizations have been used to demonstrate the cells viability during the 3D bioprinting process.

The bioprinter technological evolution is then presented, starting from an open-source technology and ending with the use of a 6-axis robotic arm. The specifications of this bioprinter evolved through different prototypes.

The last part of this thesis concerns tissue bioprinting results obtained through multiple collaborations. Several tissues will be studied and characterized: the dermis and its maturation towards a total skin, the cartilage and the mesenchymal stem cells bioprinting, a microvascularized tissue thanks to the incorporation of endothelial cells and finally a perfusable tissue by using a dynamic culture approach in bioreactor.

Discipline

Biotechnologie

Mots clés

Bioimpression 3D, Biomatériaux, Peau, Cartilage, Tissus vascularisés, Bioréacteur.

Laboratoire

Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS)
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS)
UMR 5246 – Université de Lyon – Université Claude Bernard Lyon 1 – CNRS
Bâtiment Lederer – 1 rue Victor Grignard – 69622 Villeurbanne Cedex