

COMMUNICATION

Décellularisation de greffons digitaux humains vascularisés : une approche sous-unitaire de l'ingénierie tissulaire de la main

MOTS-CLÉS : ALLOTRANSPLANTATION COMPOSITE VASCULARISÉE. INGÉNIERIE TISSULAIRE. MATRICE EXTRACELLULAIRE. TRANSPLANTATION DE MAIN

Decellularization of vascularized digital human grafts: a subunit approach to hand engineering

KEY-WORDS: VASCULARIZED COMPOSITE ALLOTRANSPLANTATION. TISSUE ENGINEERING. EXTRACELLULAR MATRIX. HAND TRANSPLANTATION

Jérôme DUISIT *,**, Debluts DONOVAN *, Louis MAISTRIAUX *, Thomas ROELS *, Catherine BEHETS *, Pierre GIANELLO * et Benoît LENGELÉ *,**

Les auteurs déclarent l'absence de lien d'intérêt.

RÉSUMÉ

La mutilation digitale, unitaire ou multiple, a un impact critique sur la fonctionnalité de la main avec une diminution importante de la qualité de vie des patients. La reconstruction échappe souvent aux techniques avancées d'autotransplantation, et l'allogreffe est ici contre-indiquée. L'expérience en bio-ingénierie de la face humaine a suggéré cependant que l'application à des greffons digitaux de cette approche pouvait ouvrir une nouvelle alternative thérapeutique.

Huit greffons humains de doigts longs ont été prélevés post mortem, avec leurs pédicules vasculaires, puis décellularisés avec succès par perfusion séquentielle de détergents et de

* Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), UC Louvain, Bruxelles, Belgique.

** Service de Chirurgie Plastique et Reconstructrice, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Bruxelles, Belgique.

Tirés-à-part : Docteur Jérôme DUISIT, Service de Chirurgie Plastique et Reconstructrice, Cliniques Universitaires Saint-Luc, 10 Avenue Hippocrate, 1200 Bruxelles, Belgique ;
e-mail : jerome.duisit@uclouvain.be

Article reçu le 22 septembre 2018 et accepté le 5 novembre 2018

solvant polaire. La déplétion cellulaire a été confirmée par histologie standard, avec diminution significative de l'ADN (95,3 %, $p < 0.0001$). La préservation structurelle de la matrice extra-cellulaire (MEC) a été étudiée qualitativement par histologie, par quantification de la densité osseuse, et par mesure des propriétés mécaniques de l'ensemble digital. Toutes les données obtenues se sont révélées comparables aux contrôles non décellularisés. In vitro, des fibroblastes cultivés sur les matrices ainsi obtenues ont conservé leur viabilité, avec une distribution homogène. In vivo, la reperfusion sur receveur porcin a montré la perméabilité vasculaire durant 3 heures d'observation. Nous avons ainsi pu démontrer la possibilité de produire des matrices acellulaires de greffons digitaux, préservant leur MEC et un arbre vasculaire transplantable, premier pas vers une greffe immuno-compatible et ses applications cliniques.

SUMMARY

Digital mutilation, unitary or multiple, has a dramatic impact on hand functionality, leading to a significant decrease in the quality of life. Reconstruction with advanced autologous techniques is limited, and allotransplantation is contraindicated. Our experience in human face graft bioengineering led us to study its application to digit grafts, as a new alternative.

Eight human long finger grafts were harvested post mortem, along with their vascular pedicles, and then successfully decellularized by sequential infusion of detergents and polar solvent. Cell clearance was confirmed by standard histology, as well as by a very significant decrease in DNA (95.3 %, $p < 0.0001$). The structural preservation of the extracellular matrix (ECM) was observed by microscopy, quantification of bone density level comparable to controls, and measurement of mechanical properties of the digital scaffold taken as a whole, which correlated very closely to those of controls. In vitro, fibroblasts cultured on the matrices demonstrated a preserved viability, with a homogeneous distribution. In vivo, blood reperfusion in a pig recipient showed vascular permeability over 3 hours of observation.

We have therefore demonstrated the feasibility of producing complete human digital acellular matrices grafts, retaining their ECM along with an accessible, patent and transplantable vascular tree, opening the road to immuno-compatible grafting and its future clinical applications.

Contexte clinique : impact de la mutilation digitale, limites des reconstructions autologues et par allogreffes.

Les mutilations digitales de la main, d'origine traumatique, congénitale ou oncologique, sont associées avec une importante morbidité fonctionnelle pour les patients. Ce constat clinique est particulièrement marqué lorsque l'atteinte est pluri-digitale ou touche le pouce, de manière isolée ou concomitante. Différentes voies thérapeutiques de reconstruction existent, mais demeurent imparfaites, tant dans la restauration *ad integrum* de la fonction perdue, que dans les mutilations secondaires portées au patient, rançon de la redistribution tissulaire autologue. Les prothèses demeurent en outre peu acceptées par les patients, car le retour de fonction demeure imparfait et la reconstruction est artificielle.

Depuis 1998 et la première allotransplantation de tissus composites vascularisés (ATC) de main réalisée avec succès par l'équipe du Pr Jean-Michel Dubernard [1], la

reconstruction du membre et de ses sous-unités a pu voir l'émergence de progrès thérapeutiques révolutionnaires, offrant des résultats inégalés pour les patients, aussi bien sur le plan morphologique que fonctionnel. La combinaison des techniques micro-chirurgicales héritées de la replantation autologue, avec les progrès récents de l'immunosuppression, sont les grands vecteurs de ce succès. Cependant, et en l'espace de 20 ans, cet espoir reste confiné, avec seulement 66 cas d'allogreffe des mains et des membres supérieurs (38 bilatéraux et 28 unilatéraux) rapportés dans le monde [2]. Telle restriction est en grande partie liée à la nécessité d'un traitement immunosuppresseur, sur le long cours pour prévenir le rejet des greffons, avec le cortège des complications générales de celui-ci, qui limitent naturellement les indications des allotransplantations du membre supérieur aux patients adultes présentant des amputations complètes et bilatérales.

Ainsi, échappent à cette approche la population pédiatrique, même si certains cas isolés commencent à être publiés [3], comme pour les allogreffes faciales [4]. De même, les amputations oncologiques, certes rares mais d'un impact important, sont également contre-indiquées à l'allogreffe, en raison du traitement anti-rejet. En outre, toutes les atteintes digitales isolées, unitaires ou multiples, jusqu'au niveau trans-métacarpien, sont considérées comme trop petites pour être indiquées pour une ATC.

L'ingénierie tissulaire : un nouvel espoir tendu par de nouveaux progrès

Face à ces limitations importantes, la médecine régénératrice, et plus particulièrement l'ingénierie tissulaire (IT), représentent une voie d'échappement. Contrairement à certains amphibiens, comme l'axolotl [5], la repousse spontanée ou induite des extrémités n'est en effet pas possible chez les humains. Pour remplacer les tissus manquants, il faut dès lors les recréer. Le principe de l'IT, repose alors sur la biofabrication de tissus, combinant des matrices, d'origine synthétique et ou natives, et de cellules d'intérêt [6]. L'une des technologies d'IT les plus utilisées est celle dite de « perfusion-décellularisation-recellularisation » (PDR) [7], dans laquelle le contingent cellulaire d'un tissu ou organe peut être lysé puis éliminé par une solution spéciale, laissant intacte sa matrice extra-cellulaire (MEC). Celle-ci pourra ensuite servir d'échaffaudage ou *scaffold*, pour guider la nouvelle colonisation cellulaire, dans une chambre de culture spécialisée ou « bioréacteur » (Figure 1). D'un point de vue immunologique, ce procédé permet d'envisager de remplacer des cellules du donneur par celles du receveur, ce qui élimine ainsi la composante allogénique de la greffe. La décellularisation de tissus simples, comme le derme, l'os, les valves, est connue depuis longtemps. L'apport de la perfusion, utilisant le pédicule artériel du greffon pour l'infusion des agents de décellularisation a permis, chez le petit puis chez le gros animal, contrairement aux techniques classiques d'immersion, de produire sur le cœur puis sur d'autres organes des matrices de complexité et volume inégalés, tout en gardant — aspect fondamental — un réseau vasculaire accessible et perfusable [8-12].

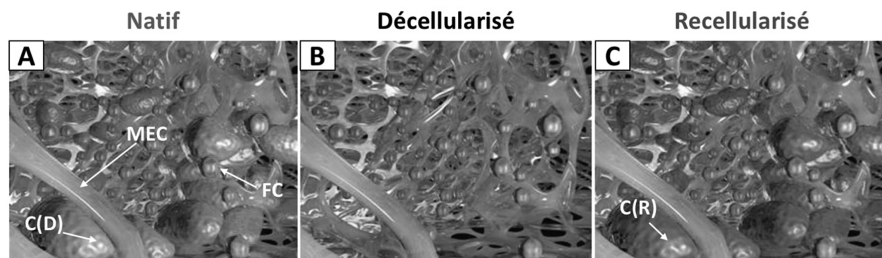


FIG. 1. — Vue schématique des phénomènes tissulaires au cours du processus de décellularisation/recellularisation.

A Tissu natif avec cellules du donneur (C-D), facteurs de croissance (FC) et fibres de matrice extracellulaire (MEC). **B** Aspect décellularisé après élimination des cellules. **C** Tissu recellularisé avec nouvelles cellules du receveur (C-R). Extrait du livre « *Regenerative Medecine applications in organ transplantation* », Elsevier, éditeur G. Orlando — avec autorisation.

Applications originales en ingénierie de tissus composites vascularisés : premières applications à la face et ses sous-unités. (Figure 2)

Nous avons posé initialement l'hypothèse de pouvoir appliquer de telles techniques de PDR aux greffons de tissus composites comme la face, approché comme un organe pédiculé. Devant la complexité tissulaire des greffons, propre à ce type d'organe composite, la stratégie expérimentale a été de diviser le visage en sous-unité morphologiques plus petites [13], comportant moins de tissus et donc plus faciles à traiter et étudier : le nez et les oreilles comme modèles d'unités morphologiques cartilagineuses, et les lèvres et les paupières comme modèles d'unités motrices musculaires. Par ailleurs, et comme explicité plus en amont, ces sous-unités sont également d'intérêt clinique, car difficiles à reconstruire et contre-indiqués pour l'allogreffe. Les greffons d'oreilles ont été étudiés en premier [14], en raison de leur simplicité fonctionnelle, de leur impact clinique et de leur aspect emblématique de la recherche en ingénierie tissulaire. Les premières matrices décellularisées, ont ainsi été obtenues sur modèle porcin [15], puis cadavérique humain [16], en ayant mis au point un protocole polyvalent entre les différents tissus traités, aspect critique dû à la non sélectivité tissulaire lors de la perfusion des greffons. La destruction cellulaire, la préservation de la MEC, la compatibilité cytologique et l'absence d'immunogénicité *in vivo* ont ainsi été établis. La connaissance des sous-unités à composante cutané-cartilagineuse sur modèle humain a permis ensuite l'extrapolation de l'étude à la face humaine totale, associant la sous-unité équivalente nasale, avec celle labiale, musculaire, à étudier : un greffon acellulaire de face totale a ainsi pu être produit [17].

Extension à l'ingénierie du membre supérieur et de sa sous-unité digitale

Finalement, nous avons pu investiguer de manière originale la composante squelettique et articulaire sur greffons composites digitaux. Appliquant le même principe

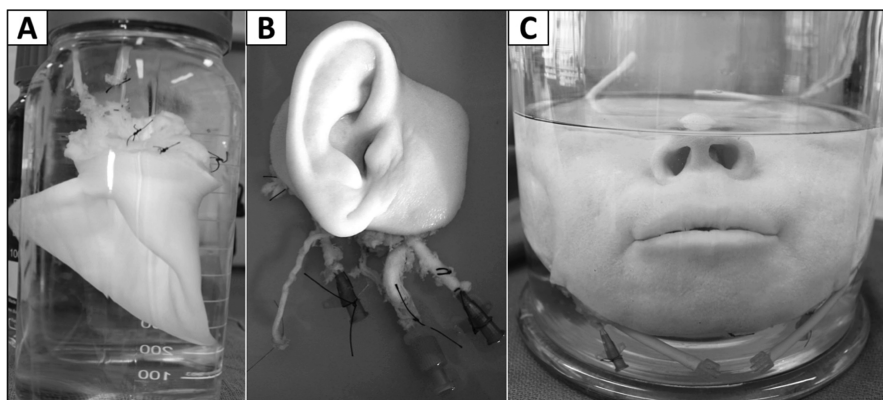


FIG. 2. — Précédentes études en ingénierie tissulaire faciale sous-unitaire.

Aspect des matrices de greffons décellularisés d'oreille porcine (A) et humaine (B) ; matrice de face humaine (C) obtenue par perfusion-décellularisation. *Source : Duisit J. et al, UCL*

d'approche sous-unitaire qu'au niveau de la face, le doigt contient en effet, à l'échelle élémentaire, quasiment tous les types tissulaires présents dans le membre supérieur : peau, graisse, os, tendons, articulations, cartilage, ligament, tissu adipeux, ainsi que vaisseaux et nerfs formant son pédicule. Le doigt se positionne ainsi comme une véritable modèle expérimental d'ingénierie tissulaire appliquée aux membres. La bio-ingénierie des membres par le procédé PDR a été décrite avec succès par une équipe américaine [18], mais sur un modèle murin de très petite taille, peu transférable à la clinique humaine, en se concentrant par ailleurs davantage sur l'ingénierie musculo-squelettique ante-brachiale. Ainsi, la présente étude a été axée sur l'application du protocole développé sur la face humaine, et pour une nouvelle association de tissus, dans la dynamique du développement de la bio-ingénierie digitale.

Protocole expérimental de prélèvement et traitement des greffons humains digitaux, par perfusion-décellularisation.

Prélèvement et préparation : Dans notre étude, nous avons prélevé 8 doigts longs, obtenus *post-mortem* à partir du don de corps du laboratoire d'Anatomie de l'UCL, respectant les règles éthiques dictées par la commission universitaire. Ces greffons, prélevés sur leurs axes artériels et veineux, ont été cathétérisés et perfusés par du sérum physiologique hépariné, puis préservés dans un bain de sérum physiologique à 4° C, avant leur traitement proprement dit. Le doigt a ensuite été transporté dans une plateforme de décellularisation, où le cathéter artériel a été connecté à un tube siliconé, lui-même relié à un réservoir de perfusion ; le contenu a été instillé via une pompe péristaltique Masterflex L / S (Cole-Palmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, États-Unis) à débit variable, sans dépasser 100 mm Hg de pression artérielle moyenne.

Perfusion-décellularisation et résultats : nous avons injecté de manière séquentielle, suivant les protocoles déjà décrits [16, 17], avec les solutions suivantes : du sérum hépariné ; un détergent, sodium dodécylsulfate (SDS) à 1 % (VWR, Radnor, PA) ; de l'eau déminéralisée ; un second détergent, du Triton-X 100 1 % (VWR) ; puis un rinçage par tampon phosphate salin (PBS) a été effectué. Le dégraissage, suivant la décellularisation *per se*, a employé du solvant polaire 2-propanol (VWR), à 100 %, instillé par voies vasculaire et par bain agitant, puis rincé. De manière conclusive, une DNase bovine de type I (Roche I, Sigma) est administrée. Les doigts humains décellularisés obtenus (Figure 3) ont enfin été stockés à 4 ° C dans du PBS, cette conservation étant très bien supportée pendant plusieurs mois. L'ensemble du procédé a duré environ 10 jours, pour un peu moins de 150 litres de volume de perfusion moyen par greffon.

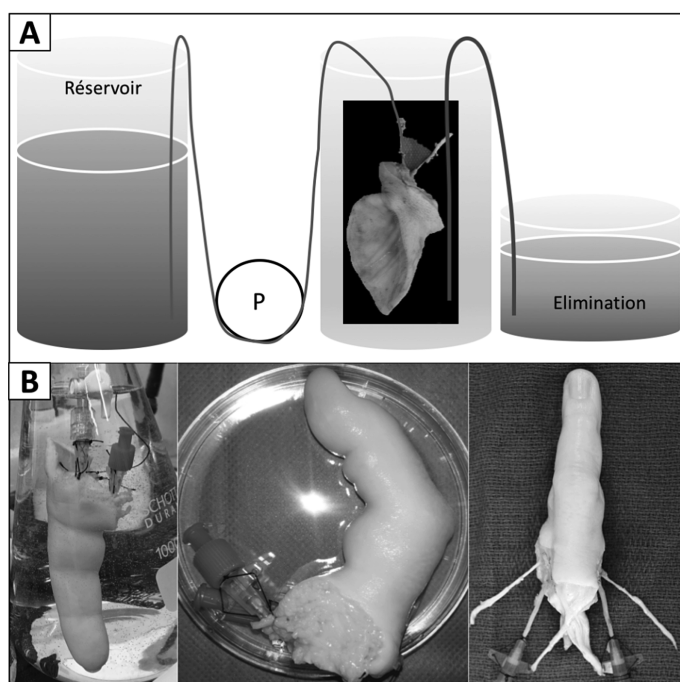


FIG. 3. — Production de matrice digitale humaine par perfusion-décellularisation.

A Vue schématique d'une installation de décellularisation par perfusion : la solution est perfusée à l'aide d'une pompe péristaltique (P) entre le réservoir et l'artère du greffon ; celui-ci est contenu dans la chambre de perfusion, et alimenté via un tube afférent artériel. Le drainage veineux passif des produits de décellularisation (solution passée et débris cellulaires) se fait par un tube efférent. **B** Étapes macroscopiques de décellularisation : à gauche, greffon natif connecté dans la chambre ; au milieu, matrice obtenue avant dégraissage — à noter le blanchiment tissulaire, l'épidermolyse totale et la perte unguéale ; à droite: vue supérieure du greffon digital acellulaire, avec ses pédicules artériels (cathétérisés sur la figure), veineux, nerveux et tendineux — noter l'aspect blanchâtre après traitement, avec épidermolyse et retrait unguéal, attestant du succès distal complet du procédé.

Principes et procédés d'analyse en ingénierie tissulaire

Outre l'évaluation macroscopique, excellent indicateur de zones mal perfusées, les analyses comprennent plusieurs techniques différentes, étudiant de façon spécifique les nombreux tissus différents contenus dans un même greffon.

La première évaluation porte sur l'élimination du contingent cellulaire, soit qualitativement par coloration histologique standard (ici hématoxyline éosine (HE)), soit quantitativement par dosage du taux d'ADN tissulaire avant et après décellularisation, qui reflète indirectement la charge cellulaire. L'ADN pouvant être lui-même responsable de réactions immunitaires [19], des tests *in vivo* de biocompatibilité ont été effectués de façon complémentaire et très probante.

L'évaluation suivante consiste à s'assurer que le procédé n'a pas lésé la MEC : par quantification des collagènes totaux, des glycosaminoglycans et de l'élastine, ou par histologie standard avec le trichrome de Masson (TCM) ou en immunofluorescence des protéines matricielles-clés et les facteurs de croissance associés, qui ont une fonction critique dans la différenciation et la croissance des futures cellules (souches) ré-ensemencées. On s'assure aussi, par ensemencement cellulaire ciblé, que la matrice ainsi produite n'est pas toxique pour les cellules : pré-requis nécessaire — mais non suffisant — pour envisager une future recellularisation. Pour ce qui concerne les analyses très spécifiques, elles varient en fonction des types de tissus composites testés ; à ce titre, les tests mécaniques et les mesures de densité osseuse sont très critiques dans l'évaluation matricielle digitale.

Enfin, et dans le cadre bien particulier des techniques de perfusion, la perméabilité et l'intégrité du réseau vasculaire matriciel est fondamentale. Ce réseau peut être étudié *in vitro* par imagerie macro-/micro vasculaire classique, ou *in vivo* sur des tests de reperfusion sanguine, indicateurs du comportement pour des pressions et viscosités de fluides physiologiques. L'analyse fine et qualitative des composants vasculaires est également souhaitée.

Résultats de l'étude pour les matrices digitales produites (Figure 4)

Les événements notables observés au cours de la perfusion/décellularisation furent d'abord l'épidermolyse bulleuse et ensuite la perte rapide de l'ongle. L'examen du blanchiment au niveau du lit unguéal a été un bon indicateur de progression, le procédé tendant vers un blanchiment complet des structures, comme indice macroscopique de décellularisation ; le dégraissage effectif du tissu adipeux a été clairement établi, après inspection de la section du greffon et après incision de la pulpe digitale.

Les coupes histologiques HE ont confirmé l'absence de cellules résiduelles après décellularisation, et pour tous les tissus traités. Le taux d'ADN a été réduit de 95,32 % ($p < 0,0001$). Ces résultats ont confirmé l'efficacité du protocole au niveau de la destruction cellulaire.

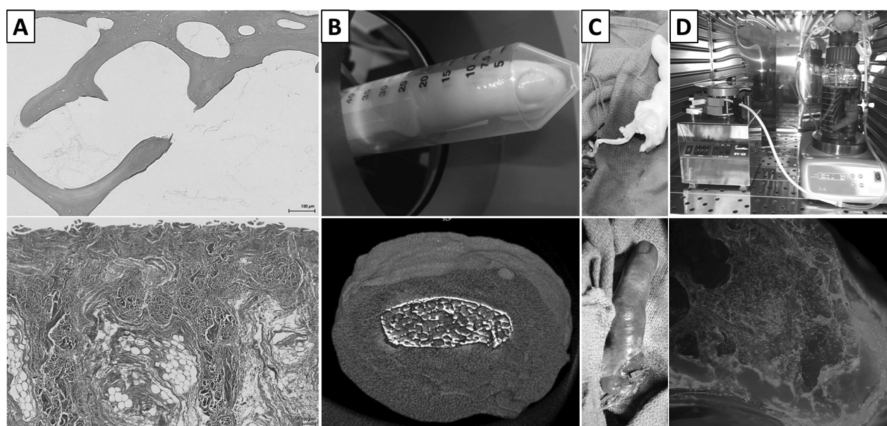


FIG. 4. — Analyse des greffons digitaux matriciels, reperfusion et mise en bioréacteur.

A Histologie après décellularisation : en *haut*, coupe Hématoxyline éosine de la médullaire osseuse ; en *bas*, coupe trichrome de Masson dermique. A noter l'absence de noyaux et l'excellente trame collagénique. **B** Etude de densité osseuse : en *haut*, analyse quantitative par pQCT ; en *bas*, aspect qualitatif de la phalange par micro-CT. **C** Reperfusion sanguine sur receveur porcin : en *haut*, anastomose complète ; en *bas*, déclampage et observation pendant 3 heures. **D** Culture et mise en bioréacteur : en *haut*, aspect du montage stérile en incubateur de recellularisation ; en *bas*, aspect après ensemencement statique fibroblastique, en imagerie fluorescente directe de la viabilité (spots clairs correspondants aux cellules).

Concernant la préservation matricielle, les coupes colorées par TCM ont retrouvé un excellent maintien de la structure collagénique des tissus ; la morphométrie osseuse qualitative 3D par microCT et la tomodensitométrie quantitative périphérique pQCT ont montré des valeurs densité minérale osseuse et d'épaisseur corticale identiques avant et après traitement. Les tests mécaniques, portant sur les forces appliquées aux tendons afin de permettre des mouvements d'excursion complète en flexion/extension, n'ont pas retrouvé de raideur significative dans les différents leviers articulaires, aspect très important car la mobilité de l'ensemble est directement liée à la fonction.

Après 4 jours de culture de fibroblastes sur différents échantillons, les tests de viabilité se sont révélés positifs, avec une bonne densité cellulaire.

La perméabilité vasculaire des doigts matriciels a d'abord été testée par angioscopie, montrant une opacification tant artérielle que veineuse.

Une reperfusion sanguine a enfin été réalisée *in vivo* sur gros animal (porc), sous anesthésie générale et directement avant euthanasie programmée dans le cadre d'autres investigations. Une anastomose termino-latérale entre les artères collatérales digitales matricielles et l'artère iliaque commune du receveur a été effectuée. Après déclampage, une reperfusion rapide de la totalité greffon, avec retour veineux a été observé. Après trois heures d'observation, l'aspect était stable avec un large

érythème dermique, témoignant d'une perfusion efficace du réseau capillaire sous-cutané. La saturation en oxygène mesurée fut de 93 %. Un saignement a été observé après incision de la pulpe distale ; enfin, une angiographie peropératoire a montré l'existence d'une circulation artério-veineuse.

Après stérilisation, nous avons pu mettre des greffons digitaux matriciels en bioréacteur, avec maintien de stérilité pendant 24 h durant la perfusion de milieu de culture en incubateur.

Discussion-Perspectives

Nous avons ainsi pu valider toutes les étapes de production d'une matrice digitale humaine complète, acellulaire, avec préservation qualitative et quantitative d'une MEC cyto-compatibile, ainsi que d'un réseau vasculaire préservé et perfusable. Le protocole détergent/solvant est ainsi démontré assez polyvalent afin d'être appliqué à tous les différents tissus contenus dans l'entité digitale. Des essais antérieurs utilisant des détergents plus doux ou des procédés osmotiques (données non publiées) se sont avérées inefficaces. Même si le type d'agents de décellularisation utilisé dans cette étude doit encore apporter la preuve de sa sécurité clinique, il devrait permettre de satisfaire les besoins expérimentaux nécessaires à la progression de ce champ d'investigation.

L'étape suivante de recellularisation proprement dite devra déterminer deux paramètres essentiels, à savoir : le type de cellules utilisées pour recellulariser ces greffons composites, et la quantité de cellules nécessaires pour garantir la régénération complète et la fonctionnalité de l'organe greffé chez le receveur. Pour de petits greffons, comme les doigts, le nombre de cellules à produire au laboratoire reste gérable ; pour des reconstructions plus importantes, comme les membres complets, ce nombre sera prohibitif. De ce constat, la stratégie qui émerge actuellement est de viser une recellularisation minimale à obtenir *in vitro*, et à compléter par la maturation complète *in vivo* chez le receveur, alors utilisé comme son propre bioréacteur [20]. Pour les matrices vascularisées, la régénération vasculaire constitue la phase préliminaire certainement indispensable.

Ainsi, la préservation d'un accès vasculaire en perfusion-décellularisation, offre la clé non seulement de l'obtention de matrices étendues et de grande complexité, mais aussi une route privilégiée pour l'ensemencement cellulaire et leur nutrition en bioréacteur, ainsi qu'ensuite pour la reperfusion sanguine après transplantation chez un receveur. La régénération durable d'un arbre vasculaire fonctionnel et non-thrombogène, permettant le maintien prolongé du greffon matriciel après transplantation, est un aspect-clé pour le développement futur d'applications pré-cliniques robustes. Cette problématique est pour l'heure commune à tous les champs de recherche destinés à produire des néo-tissus ou des néo-organes vascularisés. La principale difficulté est de restaurer un endothélium complet sur l'ensemble des parois vasculaires proximales et distales, ainsi qu'une couche musculaire lisse fonctionnelle, avec des résultats prometteurs [21-25].

Enfin, les matrices digitales représentent un exemple idéal d'applications cliniques pour ce type de nouvelles technologies d'ingénierie tissulaire, qui doivent respecter le principe de réversibilité totale en cas de complications : pour le membre et a fortiori pour les doigts, l'explantation du greffon en cas d'échec permettra de revenir à l'état initial avant la transplantation, sans préjudice pour le patient ; c'est un principe moins envisageable pour la régénération d'organes solides, dont le caractère vital est cette fois-ci, et dans un certain changement de paradigme par rapport à l'allotransplantation, une contre-indication d'essais premiers.

Conclusions

L'ingénierie tissulaire des tissus composites vascularisés est une discipline naissante et portant les promesses d'une reconstruction idéale, évitant les mutilations autologues et le traitement anti-rejet de l'allogreffe. L'application originale au niveau digital est le lieu idéal pour des futurs essais cliniques, potentiellement inauguraux des premières transplantations de tissus composites vascularisés issus de la bioingénierie.

RÉFÉRENCES

- [1] Dubernard JM, et *al.* Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353:1315-20.
- [2] Shores JT, et *al.*, Outcomes after hand and upper extremity transplantation. *Journal of materials science, Materials in medicine*. 2017;28:72.
- [3] Amaral S and LS. Levin, Pediatric and congenital hand transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2017;22:477-83.
- [4] Devauchelle BL et *al.* Face graft? Extrapolation of facial allotransplantation to children. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2016;44:925-33.
- [5] McCusker CD, Gardiner DM. Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PloS one*. 2013;8:e77064.
- [6] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*. 1993;260:920-6.
- [7] Moran EC et *al.* Whole-organ bioengineering: current tales of modern alchemy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163:259-67.
- [8] Ott HC et *al.* Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature medicine*. 2010;16:927-33.
- [9] Ott HC et *al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008;14:213-21.
- [10] Katari R et *al.* Renal bioengineering with scaffolds generated from human kidneys. *Nephron. Experimental nephrology*. 2014;126:119.
- [11] Orlando G et *al.* Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation*. 2011;91:1310-7.

- [12] Mirmalek-Sani SH et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013;34:5488-95.
- [13] Duisit J et al. Nose and Lip Graft Variants: A Subunit Anatomical Study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141:751-61.
- [14] Duisit JA ; Debluts D, Maistriaux L, Gerdome A, Bol A, Gianello P, Behets C, Lengelé B. Single-artery human ear graft procurement: a simplified approach. *Plastic and reconstructive surgery*. 2017 [Accepted].
- [15] Duisit J et al. Decellularization of the Porcine Ear Generates a Biocompatible, Nonimmunogenic Extracellular Matrix Platform for Face Subunit Bioengineering. *Annals of surgery*. 2017.
- [16] Duisit J et al. Perfusion-decellularization of human ear grafts enables ECM-based scaffolds for auricular vascularized composite tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2018;73:339-354.
- [17] Duisit J et al. Bioengineering a Human Face Graft: The Matrix of Identity. *Annals of surgery*. 2017.
- [18] Jank BJ et al. Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft. *Biomaterials*, 2015; 61:246-56.
- [19] Gilbert TW, JM Freund, SF Badylak. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *The Journal of surgical research*. 2009;152:135-9.
- [20] Badylak S. Perspective: Work with, not against, biology. *Nature*. 2016;540:S55.
- [21] Ren X et al. Engineering pulmonary vasculature in decellularized rat and human lungs. *Nature biotechnology*. 2015;33:1097-102.
- [22] Petersen, TH et al. Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation. 2010;329:538-41.
- [23] Caralt M et al. Liver bioengineering: from the stage of liver decellularized matrix to the multiple cellular actors and bioreactor special effects. *Organogenesis*. 2014;10:250-9.
- [24] Sanchez PL et al. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials*. 2015;61:279-89.
- [25] Stabler CT, et al. Enhanced Re-Endothelialization of Decellularized Rat Lungs. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 2016;22:439-50.

DISCUSSION

M. Francis MICHOT

Comment voyez-vous, dans les années à venir, l'évolution des indications entre la greffe de main telle que vous l'avez exposée et la main prothétique, bionique, à l'heure des recherches sur l'homme augmenté hyper-humain ?

Il y aura certainement, à long terme, une évolution combinée des deux approches : chaque discipline porte à la fois avantages et inconvénients, les prothèses présentant une certaine modularité et robustesse mais sans la dimension biologique, alors que les matrices incarnent une voie régénératrice idéale, mais avec de grands défis de récupération biomécanique. La solution sera certainement dans la bonne balance entre robotique et ingénierie tissulaire, permettant d'apporter aux patients les meilleures reconstructions possibles, trans-prothétique et trans-biologiques mais au demeurant humanistes.

M. Jean DUBOUSSET

Une fonction éventuelle de la main est la sensibilité. Qu'en est-il dans votre système ?

La récupération de la sensibilité est effectivement également un aspect critique dans la fonctionnalité des doigts et de la main. C'est également un défi, car même en ré-implantation ou en allotransplantation, avec des tissus natifs donc, la reprise de sensibilité des membres peut être délicate. Nous avons pu dans d'autres travaux sur la face humaine, montrer la persistance de l'architecture matricielle nerveuse au sein des greffons décellularisés, avec plus particulièrement une excellente préservation des protéines de laminine, capitales pour la réponse axonale. Il faut maintenant pouvoir observer *in vivo* la repousse nerveuse dans ses guides naturels préservés, ce qui constituera de prochains travaux de recherche.

M. Daniel LOISANCE

La voie de recherche est intéressante. Comment expliquer les bons résultats sur un modèle complexe quand les résultats sur des modèles simples sont décevants ?

Nous avons obtenu des résultats prometteurs, mais cette approche est encore très précoce : ce qui nous permet d'envisager un aboutissement différent, par rapport à d'autres tentatives précédentes en ingénierie tissulaire, c'est l'utilisation que nous faisons du réseau vasculaire, tant pour la perfusion de décellularization, que la recellularization ou la reconnexion à un réseau receveur. L'aspect vasculaire est ici le point clé de toute cette approche, et très certainement l'explication de précédents résultats mitigés, dans lesquelles la production matricielle se fait par bains passifs, l'ensemencement cellulaire par dépôt ou injection, et la revascularisation par effet de néovascularisation seule. La perfusion active et immédiate de l'ensemble du volume matriciel est le seul garant d'applications cliniques potentielles, respectant ce principe fondamental où tout greffon dépassant le cm³ de volume doit avoir une perfusion propre par anastomose vasculaire pour assurer sa viabilité.