

# Reconstruction œsophagienne par ingénierie tissulaire - l'expérience de l'hôpital Saint-Louis

## Esophageal Tissue Engineering - The Experience of Saint-Louis Hospital

L Arakelian [1], V Vanneaux [1], T Poghosyan [2], J Catry [3], M Luong-Nguyen [3], J Larghero [1], P Cattan [1,3]

1. CIC de Biothérapies - INSERM UMR 1160 - Institut Universitaire d'Hématologie - Unité de thérapie cellulaire - Hôpital Saint Louis - Paris.

2. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris - Service de chirurgie digestive, oncologique et métabolique - Hôpital Ambroise Paré - Boulogne-Billancourt.

3. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris - Service de chirurgie générale, digestive et endocrinienne - Hôpital Saint-Louis - Paris.

### Mots clés

- ◆ Ingénierie tissulaire
- ◆ Œsophage
- ◆ Bioengineering
- ◆ Matrice acellulaire

### Résumé

L'ingénierie tissulaire, dont le concept repose sur la mise en présence et l'implantation *in vivo* des éléments jugés nécessaires à un remodelage tissulaire vers le phénotype de l'organe voulu, pourrait représenter une alternative aux techniques classiques de remplacement œsophagien. Tout en préservant les organes intra-abdominaux, elle autoriserait un remplacement adapté à la longueur du défaut œsophagien à traiter, ce qui est particulièrement intéressant dans le cadre des atrésies de l'œsophage et des sténoses réfractaires aux dilatations endoscopiques. Elle représenterait une alternative à l'alimentation définitive par jéjunostomie chez les patients sujets à des échecs répétés de reconstruction œsophagienne. L'approche hybride consistant à créer un substitut composé d'une matrice naturelle décellularisée, de cellules épithéliales et de cellules musculaires est jusqu'à présent la voie de recherche la plus aboutie. Dans un avenir proche, les cellules souches mésenchymateuses, de par leur multipotence et leurs propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires, pourraient supplanter les cellules différenciées dans les modèles expérimentaux, puis chez l'homme. Dans un avenir plus lointain, la confection de « matrices intelligentes » non cellularisées, mais contenant les facteurs permettant la régénération tissulaire permettrait de s'affranchir de l'implantation cellulaire et d'obtenir des réponses biologiques standardisées *in vivo*.

### Keywords

- ◆ Tissue engineering
- ◆ Esophagus
- ◆ Bioengineering
- ◆ Absorbable scaffold

### Abstract

Tissue engineering, which consists of the combination and *in vivo* implantation of elements required for tissue remodeling toward a specific organ phenotype, could be an alternative for classical techniques of esophageal replacement. While avoiding the sacrifice of other intra-abdominal organs, this technique would allow a replacement tailored to the exact length of the esophageal defect and that is particularly interesting in case of esophageal atresia or strictures refractory to endoscopic dilatation. Finally, tissue engineering could be a response to the critical situation of repeated failures of esophageal reconstruction.

The current hybrid approach that entails creation of an esophageal substitute composed of an acellular matrix and autologous epithelial and muscle cells provides the most successful results. In the near future, mesenchymal stem cells, because of their potential for differentiation and proangiogenic, immune-modulatory and anti-inflammatory properties could replace differentiated cells in experimental protocol and in humans. Later, esophageal substitutes could be constructed from acellular "intelligent matrices" that contain the molecules necessary for tissue regeneration; this should allow circumvention of the implantation step and still obtain standardized *in vivo* biological responses. At present, tissue engineering applications to esophageal replacement are limited to enlargement plasties with absorbable, non-cellular matrices.

Ce programme de recherche en ingénierie tissulaire a pour but de mettre au point un substitut œsophagien qui pourrait représenter une alternative aux techniques classiques de remplacement de l'œsophage par gastroplasties et coloplasties. Ces dernières autorisent une reprise de l'alimentation chez la plupart des patients, mais comportent certaines limites que l'ingénierie tissulaire pourrait dépasser. A titre d'exemple, le traitement chirurgical des sténoses œsophagiennes réfractaires aux dilatations endoscopiques nécessite actuellement le

remplacement de l'ensemble de l'œsophage. L'ingénierie tissulaire, par la création d'un substitut adapté à la longueur du défaut à traiter, pourrait autoriser le remplacement de la seule zone lésée tout en conservant le reste de l'œsophage et les organes intra-abdominaux habituellement utilisés pour son remplacement. Par ailleurs, l'ingénierie tissulaire représente le seul espoir de reprise d'une alimentation orale chez les patients sujets à des échecs répétés de reconstruction œsophagienne.

### Correspondance :

Pierre Cattan

Service de chirurgie générale, digestive et endocrinienne - Hôpital Saint-Louis - 1, av Claude Vellefaux - 75010 Paris.

E-mail : pierre.cattan@aphp.fr

Disponible en ligne sur [www.academie-chirurgie.fr](http://www.academie-chirurgie.fr)

1634-0647 - © 2016 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

DOI : 10.14607/emem.2016.1.000

Le concept d'ingénierie tissulaire date des années 1990. Il a été défini par Langer et Vacanti comme la création de substituts biologiques faisant appel à des techniques d'ingénierie et de sciences du vivant (1). En pratique, l'idée n'est pas de construire *in vitro* un organe finalisé, mais de mettre en présence et d'implanter *in vivo* des éléments jugés nécessaires à la reconstruction *in vivo* d'un organe déficient. Ces éléments sont en général représentés par une matrice acellulaire et des cellules autologues, le substitut réalisé pouvant alors être considéré comme une autogreffe. Les matrices et les cellules utilisées peuvent faire l'objet de diverses manipulations afin de faciliter le remodelage tissulaire après implantation *in vivo*.

## L'ingénierie tissulaire appliquée à l'œsophage

Les recherches actuelles tendent à répondre à deux situations différentes. La première est la prévention de la sténose après mucoséctomie endoscopique circulaire pour endobranchy-œsophage dégénéré. Seule cette situation a fait l'objet d'essai clinique chez l'homme. Il s'est agi de mettre en place après mucoséctomie soit des patches de cellules épithéliales (2), soit une matrice acellulaire (3). Ces tentatives ont donné des résultats intéressants, mais non entièrement satisfaisants en raison de la complexité de la procédure dans le premier cas et d'un taux élevé de sténoses dans le second.

Ce qui intéresse d'avantage les chirurgiens est la possibilité d'effectuer par ingénierie tissulaire un remplacement circonconférentiel de l'œsophage après résection œsophagienne. Aucun essai clinique n'a encore été réalisé en ce sens. L'ensemble des protocoles de recherche translationnelle menées chez le gros animal sur le sujet concourent à dire qu'afin d'avoir une chance de succès, le substitut doit être formé d'une combinaison de matrice acellulaire et de cellules autologues (4). Le remplacement œsophagien par une matrice acellulaire utilisée isolement, entraîne invariablement une sténose réfractaire aux dilatations endoscopiques.

Il a été établi qu'après implantation, la matrice initialement utilisée comme support cellulaire, était vouée à disparaître et à être remplacée par une matrice sécrétée par les cellules implantées ou par les cellules de l'hôte venues la coloniser (5). Une des principales qualités requises des matrices utilisées est ainsi une bonne biocompatibilité, afin de limiter la réaction inflammatoire après implantation *in vivo* et la fibrose qui en résulte.

Dans le choix des types cellulaires, deux possibilités s'ouvrent au chercheur. Le choix peut se porter sur des cellules différenciées qui pourraient avoir un intérêt pour la régénération œsophagienne, en l'occurrence les cellules épithéliales et les cellules musculaires. L'autre possibilité est d'utiliser des cellules souches mésenchymateuses qui ont la capacité de se différencier en une multitude de types cellulaires, ce qui représente un avantage séduisant pour l'ingénierie tissulaire. Les cellules souches mésenchymateuses ont par ailleurs un potentiel pro-angiogénique qui pourrait favoriser la vascularisation du substitut. Elles ont un pouvoir chimiotactiques qui permettrait d'attirer des cellules susceptibles de participer au remodelage tissulaire. Enfin, ces cellules ont une activité anti-inflammatoire, ce qui est particulièrement intéressant quand on sait l'importance de la réaction inflammatoire qui suit l'implantation du substitut.

## Les étapes

Les différentes étapes du remplacement œsophagien par ingénierie tissulaire sont les suivantes :

1. Des biopsies tissulaires sont réalisées afin d'en extraire les cellules d'intérêt (biopsies de moelle osseuse pour les cellules

souches mésenchymateuses, biopsies musculaires pour les cellules musculaires, biopsies de muqueuse jugale pour les cellules épithéliales)

2. Ces cellules sont caractérisées sur le plan phénotypique et fonctionnel, puis la population cellulaire est expandue en culture.

3. La matrice acellulaire estensemencée de ces cellules à une concentration cellulaire et pour une durée de culture déterminées

4. Le substitut ainsi constitué fait l'objet d'une maturation par implantation dans un « bioréacteur naturel », en l'occurrence le grand épiploon ou le muscle grand dorsal de l'animal. Cette étape permet d'initier la vascularisation du substitut dans un environnement stérile.

5. Après 14 jours de maturation, le remplacement œsophagien est effectué par le substitut laissé en continuité avec son « bioréacteur », à la manière d'un transplant pédiculé.

## Expérience de l'équipe de l'hôpital Saint-Louis

Initialement, notre démarche a été d'utiliser une approche hybride qui a consisté à utiliser deux matrices (une matrice acellulaire issue de la sous-muqueuse intestinale du porc et une membrane amniotique humaine) et deux types cellulaires (cellules musculaires et cellules épithéliales). Dans un premier temps, nous avons démontré la faisabilité de la culture de ces cellules sur ces matrices et avons défini les conditions optimales d'ensemencement et de culture (6). Nous avons ensuite réalisé, chez 30 porcs de race minipigs des remplacements circonconférentiels de l'œsophage cervical par ce substitut, qui a fait l'objet d'une maturation préalable dans le grand épiploon (7). Le remplacement était réalisé sous couvert d'une endoprothèse extractible, afin de calibrer temporairement la zone de greffe. Des sacrifices séquentiels des minipigs pendant 12 mois après le remplacement œsophagien ont permis d'observer aux temps tardifs un remodelage tissulaire de la zone de greffe vers un phénotype œsophagien, avec présence d'un épithélium mature, de glandes sous-muqueuses et d'une couche musculaire pluristratifiée. Bien qu'intéressants, ces résultats ne nous ont pas semblé parfaitement satisfaisants en raison de la lenteur du remodelage tissulaire et de la nécessité de laisser en place une endoprothèse pendant 6 mois afin d'éviter une sténose de la zone de greffe, traduction d'une réaction inflammatoire et fibrosante majeure secondaire à l'implantation du substitut. Par ailleurs, l'approche hybride qui consiste à utiliser deux types cellulaires et deux matrices nous a semblé trop complexe. Enfin, il est probable que le choix du modèle utilisé dans cette étude, c'est-à-dire le remplacement de l'œsophage cervical, n'ait pas été optimal. En effet, l'ascension du substitut au cou nécessite la réalisation d'une épiploplastie qui chez le cochon compromet chez bon nombre d'animaux la vascularisation du substitut. L'ischémie du substitut qui en résulte explique probablement la perte cellulaire massive observée lors des sacrifices précoces par comparaison à l'importante population cellulaire présente dans le substitut à la fin de la période de maturation dans l'épiploon.

Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses issue de la moelle osseuse. En suivant des étapes similaires, nous avons réalisé le remplacement circonconférentiel de l'œsophage abdominal avec une matrice acellulaireensemencée de cellules souches mésenchymateuse chez 10 minipigs. Le remplacement était effectué par la matrice nonensemencée de cellules dans le groupe contrôle. Nous nous sommes cette fois-ci porté sur l'œsophage abdominal afin d'éviter la dévascularisation éventuelle du substitut, car il n'est pas nécessaire pour un remplacement de l'œsophage abdominal de réaliser d'épiploplastie pour ascensionner le substitut pédiculé jusqu'à la zone de greffe. Ce

travail a permis de montrer que les cellules souches mésenchymateuses favorisaient la régénération épithéliale mature dans la lumière du substitut et que leur présence était associée à l'apparition de cellules musculaires dans le substitut dès le deuxième mois, alors qu'aucune cellule musculaire n'est jamais apparue dans la zone de greffe dans le groupe contrôle. La grande fréquence de migration de l'endoprothèse œsophagienne, favorisée par l'hyper motricité de la région œsogastrique, ne nous a permis de suivre ses animaux plus de 3 mois

## Perspectives

1. En ce qui concerne le modèle expérimental, nous nous porterons à l'avenir sur l'œsophage thoracique, afin de ne pas rencontrer les aléas inhérents aux remplacements de l'œsophage cervical et abdominal. Ce choix de l'abord thoracique n'a pas été notre choix initial, bien que plus relevant sur le plan clinique, en raison de la nécessité de réaliser un abord thoracique et un drainage thoracique temporaire postopératoire.

2. Afin de comprendre le rôle joué par les cellules souches mésenchymateuses dans le remodelage tissulaire ainsi que leur devenir, nous utiliseront à l'avenir des cellules marquées par un fluorochrome (mcherry), marquage qui persiste malgré les divisions cellulaires. Il nous sera ainsi notamment possible de déterminer si les cellules différenciées présentent dans la zone de greffe proviennent des cellules souches mésenchymateuses.

3. La matrice que nous avons utilisée jusqu'à présent est issue de la sous-muqueuse intestinale du porc et est commercialisée comme renfort pariétal (Surgisis®). Elle semble être à l'origine d'une importante réaction inflammatoire, faisant le lit de la fibrose et compromettant ainsi la régénération œsophagienne. Nous nous sommes rendu compte que cette réaction inflammatoire était probablement liée à une décellularisation imparfaite de cette matrice. Parallèlement, il est senti que l'utilisation d'une matrice spécifique d'organe pourrait avoir de meilleures performances dans la promotion d'une régénération tissulaire spécifique d'organe (8). Par conséquent, nous avons mis au point un protocole de décellularisation œsophagienne performant, afin d'utiliser à l'avenir comme support une matrice œsophagienne décellularisée par nos propres soins.

Dans un avenir probablement plus lointain, la confection de « matrices intelligentes » permettrait de s'affranchir de l'implantation cellulaire, qui est à l'origine d'une grande variabilité dans la réponse biologique observée *in vivo*. En effet, il est intéressant d'envisager utiliser des matrices porteuses des molécules impliquées dans le remodelage tissulaire et identifiées par l'étude du sécrétome des cellules souches mésenchymateuses (9). L'avantage de ces « matrices intelligentes » par rapport aux matrices cellularisées est la possibilité de standardiser leur production et ainsi d'espérer avoir des réponses biologiques reproductibles *in vivo*.

## Conclusions

Actuellement, les efforts de remplacement circonférentiel de l'œsophage portent sur de courts segments et se heurtent à l'importance des phénomènes inflammatoires locaux qui conduisent à la fibrose, qui limite elle-même les possibilités de remodelage tissulaire vers un phénotype œsophagien. Les recherches actuelles portent sur l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses, dont le potentiel de différenciation, les propriétés pro-angiogénique, immuno-modulatrice et anti-inflammatoire, constituent des atouts prometteurs. Cependant, les applications cliniques existantes de remplacement par ingénierie tissulaire d'autres organes, associées à la

multiplication des protocoles de recherche translationnelle de remplacement œsophagien chez le gros animal, laissent présager à court terme l'obtention d'une autorisation des autorités sanitaires pour l'initiation d'un essai clinique. Outre la mise au point d'un substitut utilisable chez l'homme, la recherche fondamentale et translationnelle menée actuellement sur ce thème permettra de mieux comprendre les mécanismes de réparation et de régénération tissulaire.

## Remerciements

Association Française de l'Atrésie de l'Œsophage (AFAO), Fondation pour la Recherche Médicale (DBS20140930773), Fondation de l'Avenir (ETO-579), Agence de la Biomédecine, Académie Nationale de Médecine.

## Références

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-6.
2. Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Murakami D et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology*. 2012;143:582-8.
3. Hoppo T, Badylak SF, Jobe BA. A novel esophageal-preserving approach to treat high-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in the presence of chronic gastroesophageal reflux disease. *World J Surg*. 2012;36:2390-3.
4. Poghosyan T, Catry J, Luong-Nguyen M, Bruneval P, Domet T et al. Esophageal tissue engineering: Current status and perspectives. *J Visc Surg*. 2016;153:21-9.
5. Londono R, Badylak SF. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of *in vivo* remodeling. *Ann Biomed Eng*. 2015;43:577-92.
6. Poghosyan T, Gaujoux S, Vanneaux V, Bruneval P, Domet T et al. *In Vitro* Development and characterization of a tissue engineered conduit resembling esophageal wall using human and pig skeletal myoblast, oral epithelial cells and biologic scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2013 ;19:2242-52.
7. Poghosyan T, Sfeir R, Michaud L, Bruneval P, Domet T et al. Circumferential esophageal replacement using a tube-shaped tissue-engineered substitute: An experimental study in minipigs. *Surgery*. 2015 ;158:266-77.
8. Keane TJ, DeWard A, Londono R, Saldin LT, Castleton AA et al. Esophageal Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part A*. 2015;17-18: 2293-300.
9. Salgado AJ, Gimble JM. Secretome of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine. *Biochimie*. 2013;95:2195.