

Paris, le 3 juillet 2014

Dossier de presse

Impression 3D Laser du vivant : quelles avancées pour demain?

De l'impression 3D à la Bio-impression	2
- Imprimante 3D + Biologie : la Bio-impression en plein essor	2
- Le concept de Bio-impression : une histoire ancienne	3
- Principe de la Bio-impression 3D et opportunités d'application.....	4
- Techniques d'impression développées dans le monde	5
La Bio-impression Laser à Bordeaux, une approche innovante	6
- Le laboratoire Inserm innovant "Bioingénierie tissulaire" (Unité Inserm 1026)	6
- L'approche de Bio-impression par Laser : comment ça marche?	6
- Les imprimantes assistées par Laser : évolutions technologiques.....	8
Quels résultats avec l'approche Laser?	10
- Les structures imprimées par Laser assisté par ordinateur.....	10
- L'enjeu de la 4D et la Bio-impression <i>in vivo</i>	12
Quelles perspectives pour demain?	12
- Le défi de la Bio-impression	12
- Des questions éthiques.....	13
- Développement de la Startup Poietis	13

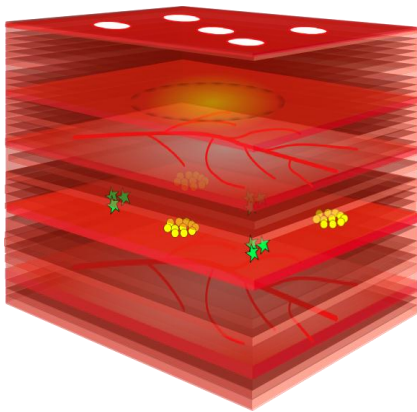
De l'impression 3D à la Bio-impression

- Imprimante 3D + Biologie : la Bio-impression en plein essor

Ces dernières années, l'impression 3D s'est développée dans le domaine de la santé. Les dispositifs médicaux ou prothèses sur mesure ont été les premières applications de cette nouvelle technologie. Par exemple, en 2011, la première prothèse (mâchoire en titane), réalisée grâce à l'impression 3D, a été implantée. En mai 2013, une prothèse de trachée est réalisée pour un nouveau-né. La même année, un crâne imprimé en 3D (le plus grand jamais posé) a été implanté chez une femme de 22 ans aux Pays Bas.

Outre ces dispositifs médicaux réalisés à partir de matières inertes, les chercheurs se sont lancés un défi d'une toute autre nature :

→ **La Bio-impression** consiste à imprimer de la matière **vivante** cellulaire.



La Bio-impression s'est développée en réponse aux défis de l'ingénierie tissulaire qui a pour but de stimuler la régénération de tissus déficients ou de créer des substituts pour restaurer, maintenir et améliorer la fonction tissulaire. Jusqu'à présent, les thérapies basées sur les techniques d'ingénierie tissulaire ne sont pas parvenues à utiliser en clinique les structures cellulaires créées. **En laboratoire, la Bio-impression utilise les principes de l'impression 3D**, et procède ainsi à **l'assemblage couche par couche des constituants des tissus biologiques** (tels que les cellules et la matrice extracellulaire) selon des organisations prédéfinies par conception numérique.

Schéma des différentes couches des tissus biologiques

© F. Guillemot / Inserm

Les chercheurs définissent la Bio-impression comme :

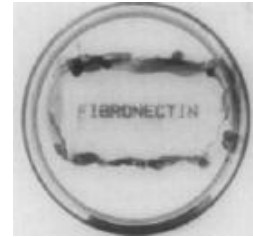
"L'utilisation de procédés de fabrication numérique permettant d'organiser et d'assembler en 3D les constituants des tissus biologiques dans le but de produire des greffons pour la médecine régénératrice ou des modèles physiologiques pour la recherche biomédicale."

F. Guillemot, V. Mironov & M. Nakamura, Biofabrication (2010)

- Le concept de Bio-impression : une histoire ancienne

1984 : Mise au point de la première imprimante 3D capable d'imprimer avec de la matière inerte.

1988 : Robert J. Klebe de l'Université du Texas parvient à décrire dans un article paru dans *Experimental Cell Research* une technique "qui pourrait aider à produire des tissus artificiels qui ressembleraient à des tissus naturels et des organes". A partir d'une imprimante de bureau à jets d'encre, il parvient à imprimer le mot "Fibronectin" en fibronectine, une glycoprotéine de la matrice extra cellulaire. Il réalise le 1^{er} assemblage 3D avec 2 couches de collagène.



1994 : Il parvient, quelques années plus tard, à contrôler le micro positionnement de cellules à l'aide d'un dispositif de tri cellulaire couplé à un ordinateur. Cette technique permettrait de préparer des structures qui ressemblent à des tissus constitués de plusieurs cellules.

2003 : Ecllosion de plusieurs projets de bioimpression par jet d'encre à travers le monde (Thomas Boland – Clemson University US / Makoto Nakamura – Tokyo University). Pour la 1^{ère} fois, le magazine *Science* parle de cette nouvelle technologie.

2005-2007 : Développement de la Bio-impression assistée par Laser (LAB) au laboratoire Inserm "Bioingénierie Tissulaire" qui imprime des structures vivantes cellulaires dès 2006.

2007 - Création de la première société de Bio-impression "Organovo" basée à San Diego, Etats-Unis. Celle-ci utilise la technique de bioextrusion développée depuis quelques années à l'Université du Missouri par Gabor Forgacs. (voir Fig. 2 p.5).

2010 – Démonstration de la faisabilité d'imprimer in vivo, directement dans une souris, par le laboratoire Inserm "Bioingénierie Tissulaire" à Bordeaux.

2013 – Bioimpression de cellules souches embryonnaires humaines par les chercheurs de l'Université Heriot Watt à Edimbourg.

2014 – Création par Organovo d'un modèle de tissu hépatique humain .

Malgré les avancées des recherches, il n'est actuellement pas possible d'imprimer des organes fonctionnels, contrairement à ce que suggérait la [conférence TED \(Technology Entertainment Design\) en mars 2011 d'Antony Atala intitulée "Imprimer un rein"](#).

- Principe de la Bio-impression 3D et opportunités d'application

La fabrication d'un tissu biologique par Bio-impression 3D se décompose en plusieurs étapes (cf. Figure 1) :

- la **conception assistée par ordinateur** de l'architecture du tissu biologique au cours de laquelle l'organisation spatiale de l'ensemble des constituants des tissus est définie (en s'inspirant par exemple de l'architecture des organes et tissus observée par imagerie médicale ou microscopie cellulaire)
- la **programmation** des paramètres d'impression des encres (contenant les cellules), permettant notamment de définir la résolution
- l'**impression** couche par couche des tissus biologiques à l'aide d'automates qui reproduisent les motifs conçus par ordinateur en déposant des micro-gouttelettes d'encre biologiques,
- la **maturation** du tissu imprimé qui permet aux cellules de s'auto-organiser (4D) jusqu'à faire émerger des fonctions biologiques spécifiques.

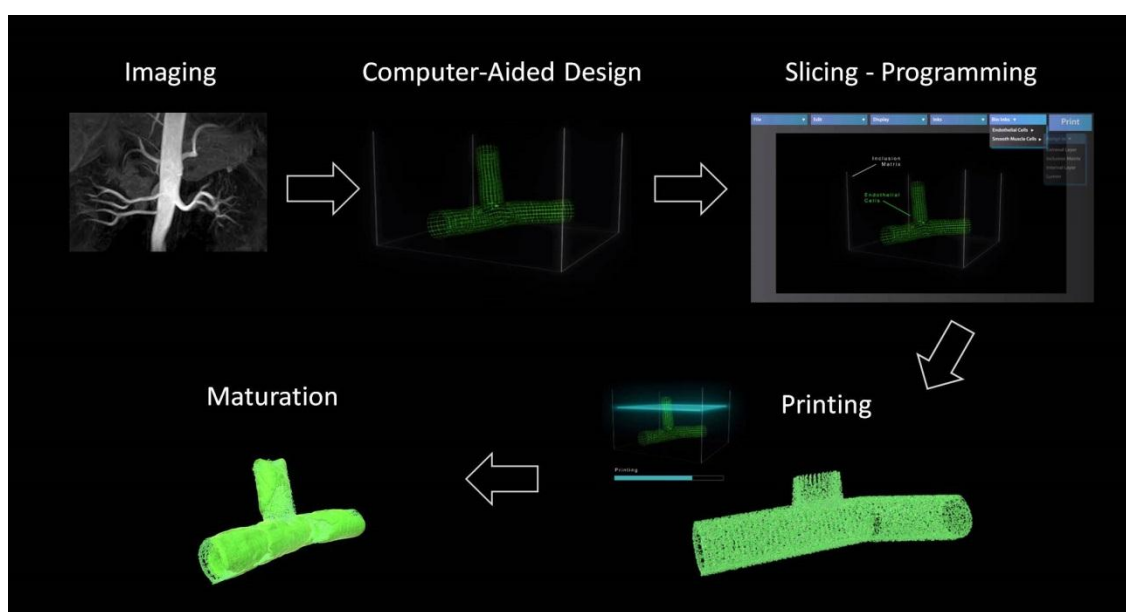


Figure 1. Séquence de fabrication de tissus biologiques par Bio-impression

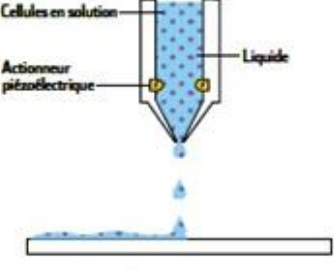
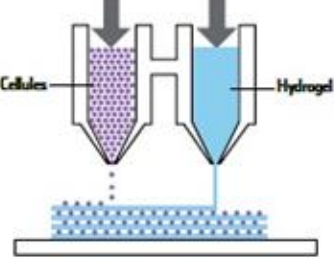
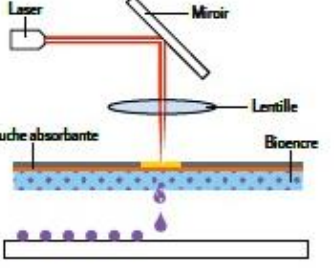
Par rapport aux méthodes conventionnelles de culture cellulaire et d'ingénierie tissulaire, la Bio-impression apporte de **nouvelles possibilités techniques** à l'origine de nouvelles opportunités de fabrication de tissus biologiques :

Nouvelles possibilités techniques	Nouvelles opportunités d'application
Les tissus sont fabriqués par des automates à l'aide d'un pilotage informatique	Obtention de tissus reproductibles à la demande
L'organisation spatiale des constituants tissulaires est contrôlée à l'échelle cellulaire	Fabrication de tissus 3D complexes, reproduisant des microarchitectures définies
A chaque tissu est associé un fichier numérique	Design sur mesure et fabrication de tissus personnalisés (clinique, screening pré-thérapeutique). Partage ou externalisation de la conception.

- Techniques d'impression développées dans le monde

Différents procédés de Bio-impression sont développés dans le monde:

- L'impression par jet d'encre
- La Bioextrusion
- La bioimpression par Laser

 <p style="text-align: center;">Jet d'encre</p>	 <p style="text-align: center;">Bioextrusion</p>	 <p style="text-align: center;">Bioimpression par Laser</p>
<p>La tête d'impression projette des microgouttelettes d'un liquide contenant les cellules. L'éjection de la goutte est provoquée par un procédé thermique ou piezo-électrique.</p> <p>Avantage: Faible coût des instruments (imprimantes de bureau)</p> <p>Inconvénients: Technique limitée aux encres peu concentrées en cellules (sinon obstruction des têtes d'impression). Contraintes de cisaillement importantes imposées aux cellules lors du passage dans l'orifice.</p>	<p>Les constituants des tissus sont poussés mécaniquement à travers une microseringue.</p> <p>Avantages: Simplicité. Première technique mise sur le marché</p> <p>Inconvénients: Coût élevé de l'instrument, Faible résolution.</p>	<p>Chaque impulsion Laser génère une microgouttelette d'un liquide contenant des cellules. Le dispositif de balayage optique permet la formation de motifs complexes.</p> <p>Avantages: Haute résolution. Technique sans orifice qui assure une excellente viabilité cellulaire.</p> <p>Inconvénients: Un seul instrument commercialisé. Robustesse à démontrer.</p>
<p>Figure 2. Description des principales technologies de Bio-impression</p>		

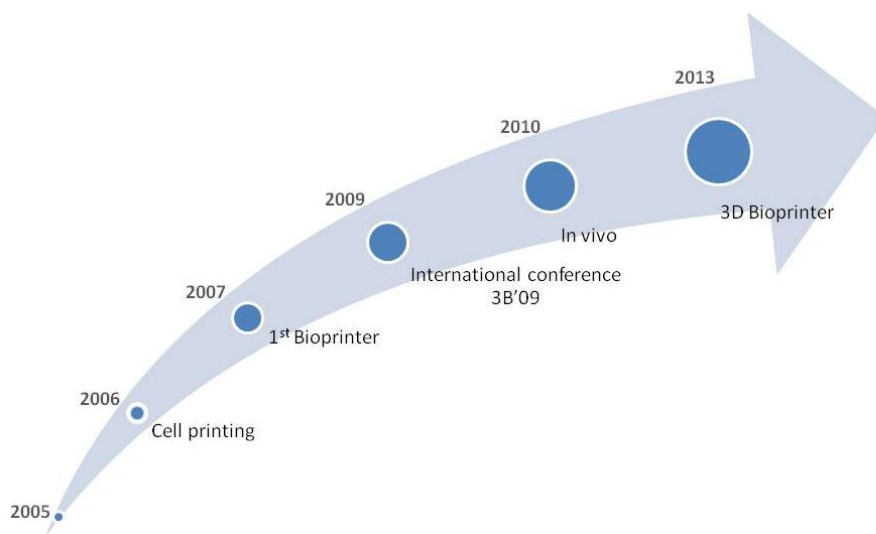
La Bio-impression Laser à Bordeaux, une approche innovante

- Le laboratoire Inserm innovant "Bio-ingénierie tissulaire" (Unité Inserm 1026)

Le laboratoire a été créé en 1981 par Charles Baquey. Des biologistes, médecins (ophtalmologie, chirurgie dentaire), physiciens et chimistes y travaillent (environ 30 personnes) sous la direction depuis 2007 de Joëlle Amédée, directrice de recherche Inserm.

Un des objectifs du laboratoire est de développer des technologies Laser et de micro-fabrication dans le but d'imprimer des tissus *in vitro* et *in vivo*. Les chercheurs du laboratoire ont été les pionniers en Europe en développant dès 2005 la Bio-impression assistée par Laser. Cette unité mixte de recherche de l'Inserm et de l'Université de Bordeaux est l'une des seules au monde à utiliser ce procédé.

Les grandes étapes du laboratoire :



- L'approche de Bio-impression par Laser : comment ça marche?

Les travaux menés par Fabien Guillemot, chargé de recherche Inserm et son équipe depuis 2005 ont conduit à la mise au point de dispositifs et de méthodes innovants de Bio-impression par LASER (Laser-Assisted Bioprinting) (cf. Figure 3).

Leur approche de Bio-impression consiste à prendre en compte la complexité tissulaire afin de :

- contrôler la distribution 3D des cellules en utilisant la Bio-impression par Laser
- conduire à l'auto organisation cellulaire (4D) pour produire des tissus fonctionnels

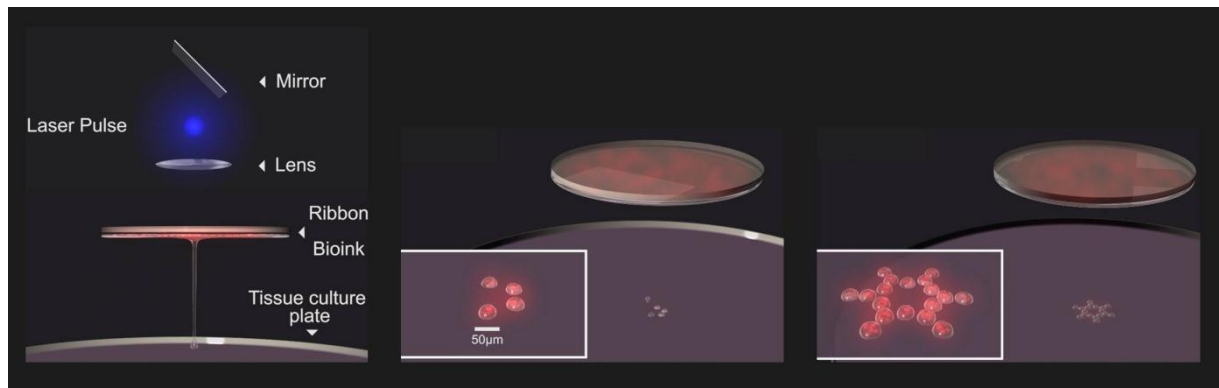


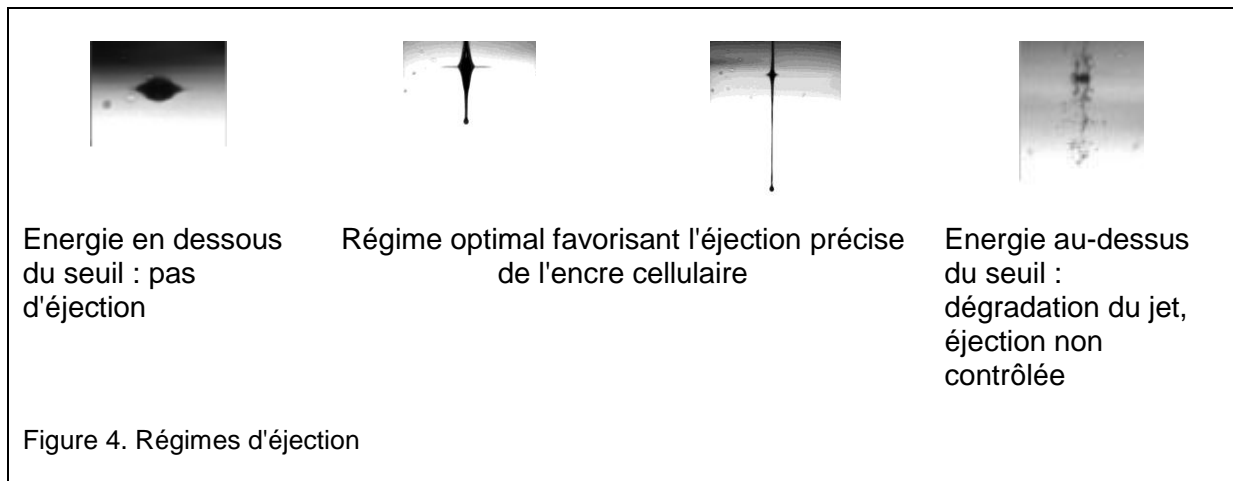
Figure 3. Principe de la Bio-impression assistée par LASER.

L'impulsion Laser (en bleue) dirigée sur une cartouche (composée d'un film d'encre étalé sur une plaque de verre) entraîne la formation d'un jet d'encre vers un substrat sur lequel sont collectées des microgouttelettes de cellules. En contrôlant les conditions physiques de l'éjection (énergie, ...), le volume des gouttelettes peut être contrôlé précisément (~ picolitre). Les motifs de cellules sont obtenus par un balayage rapide de la cartouche par le Laser qui entraîne la formation de 10 000 gouttelettes par seconde.

© F. Guillemot / Inserm

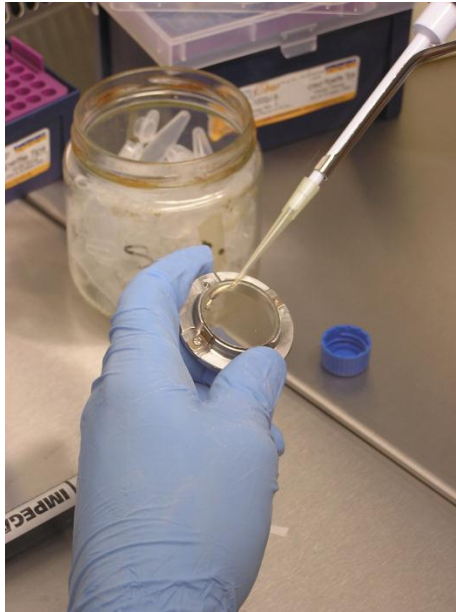
L'impulsion Laser

L'équipe de Fabien Guillemot a montré¹ que les volumes déposés dépendent de l'énergie de l'impulsion Laser, de la viscosité de l'encre cellulaire, de la tension de surface et de l'épaisseur du film de la cartouche. Le contrôle de ses paramètres a permis de définir un "régime d'éjection" optimal.



¹ Guillemot et al. Nanomedicine (2010)

Préparation de l'encre cellulaire



© Ludovic Lescieux Alphanov / Fabien Guillemot Inserm.

Les encres cellulaires consistent en une suspension de cellules dans un milieu spécifique. Avant leur mise en suspension, les cellules sont cultivées (amplification / différenciation) dans des conditions classiques de culture cellulaire. Puis elles sont placées dans un milieu liquide contrôlé et adapté pour assurer la conservation de l'intégrité des cellules au cours de l'impression.

- Les imprimantes assistées par Laser : évolutions technologiques

1^{ère} Bio-imprimante Laser

En 2007, l'équipe de Fabien Guillemot développe une première bioimprimante en collaboration avec NovaLase S.A (Canéjean, France). Celle-ci permet une modélisation 2D de la structure à imprimer sur l'ordinateur et est couplée à un système d'imagerie. L'impression de plusieurs couches (5 encres cellulaires possibles) génère une structure tissulaire complexe 3D.



© UMR Inserm 1026 – Bioingénierie tissulaire

2^{ème} Bio-imprimante Laser

En 2013, l'équipe conçoit une 2^{ème} imprimante en collaboration avec Alphanov (Talence, France).

Intégrée dans un environnement entièrement stérile, elle facilite la manipulation du matériel biologique et permet de modéliser directement en 3D depuis l'ordinateur. Elle peut accueillir jusqu'à 7 encres cellulaires distinctes.

Cette imprimante fait actuellement l'objet de plusieurs demandes de brevet avec la SATT Aquitaine Science Transfert.



© Ludovic Lescieux Alphanov / Fabien Guillemot Inserm.

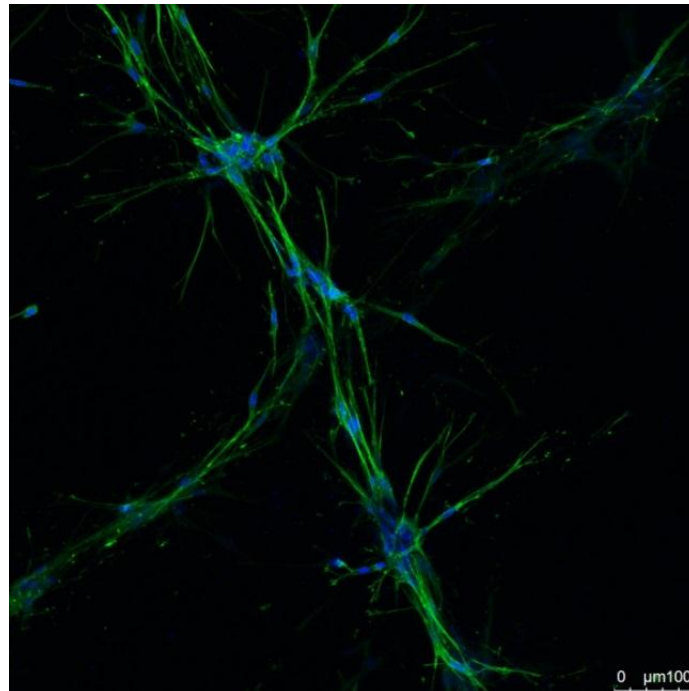
Quels résultats avec l'approche Laser?

- Les structures imprimées par Laser assisté par ordinateur

La Bio-impression assistée par Laser permet la fabrication de tissus complexes grâce à l'impression d'encre biologique dont les concentrations cellulaires sont voisines des conditions physiologiques et ce, avec une très haute résolution (micron, volume en pL) et une vitesse d'exécution élevée (> 10 000 gouttelettes par seconde).

"Dans le domaine de la Bio-impression, la technologie Laser est celle qui offre la résolution la plus élevée" explique Fabien Guillemot, chargé de recherche Inserm.

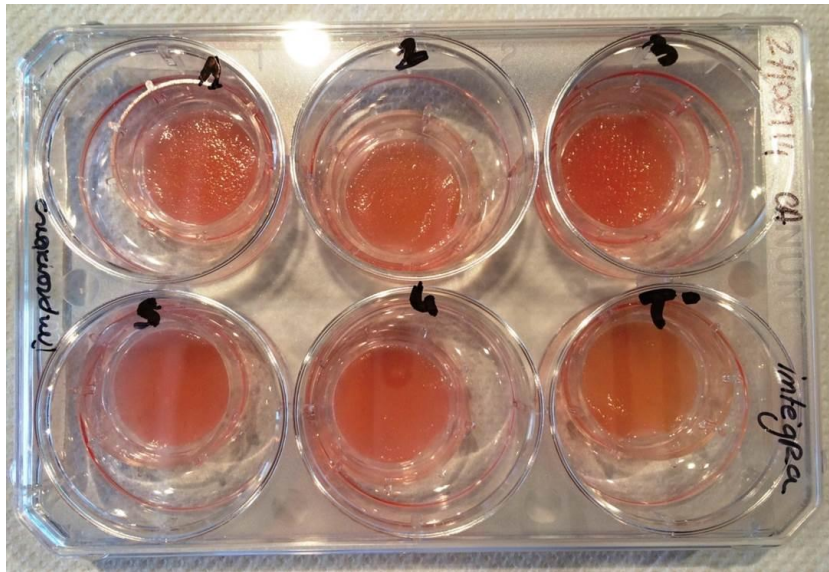
Depuis 2005, l'équipe de recherche est parvenue à imprimer différentes structures et types cellulaires: des multicouches de kératinocytes (cellules de la couche superficielle de la peau et des phanères : ongles, poils, cheveux) et de collagène. Actuellement, les chercheurs travaillent sur l'impression de tissus de cornée et de la peau afin de répondre aux besoins de la médecine régénératrice, de la pharmacologie, de la cosmétique...



Impression de fibroblastes cornéens humains
© Ludovic Lescieux Alphanov / Fabien Guillemot Inserm

Les cellules imprimées sont viables (97% de viabilité après 6h) et les chercheurs ont confirmé que la Bio-impression n'affectait pas la différenciation cellulaire dans le cas d'impression de cellules souches humaines adultes.

L'impression de plusieurs types cellulaires a été réalisée grâce à l'imprimante qui permet d'accueillir plusieurs encres cellulaires, ce qui a permis aux chercheurs d'imprimer en juin dernier de la peau.



Impression de peau réalisée en juin 2014
© Ludovic Lescieux Alphanov / Fabien Guillemot Inserm.

Principales publications de l'équipe Inserm

[Methods Cell Biol.](#) 2014;119:159-74. doi: 10.1016/B978-0-12-416742-1.00009-3.

Cell patterning by Laser-assisted bioprinting.

[Devillard R](#), [Pagès E](#), [Correa MM](#), [Kériquel V](#), [Rémy M](#), [Kalisky J](#), [Ali M](#), [Guillot B](#), [Guillemot F](#).

[Biomaterials.](#) 2010 Oct;31(28):7250-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.055. Epub 2010 Jul 2.

Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization.

[Guillot B](#)¹, [Souquet A](#), [Catros S](#), [Duocastella M](#), [Pippenger B](#), [Bellance S](#), [Bareille R](#), [Rémy M](#), [Bordenave L](#), [Amédée J](#), [Guillemot F](#).

[Acta Biomater.](#) 2010 Jul;6(7):2494-500. doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.029. Epub 2009 Oct 9.

High-throughput Laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering.

[Guillemot F](#)¹, [Souquet A](#), [Catros S](#), [Guillot B](#), [Lopez J](#), [Faucon M](#), [Pippenger B](#), [Bareille R](#), [Rémy M](#), [Bellance S](#), [Chabassier P](#), [Fricain JC](#), [Amédée J](#).

[Biofabrication.](#) 2010 Mar;2(1):014101. doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014101. Epub 2010 Mar 10.

In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice.

[Kériquel V](#)¹, [Guillemot F](#), [Arnault I](#), [Guillot B](#), [Miroux S](#), [Amédée J](#), [Fricain JC](#), [Catros S](#).

Brevets

"*Bioprinting station, assembly comprising such Bioprinting station and Bioprinting method*".

F Guillemot, V Kériquel, S Catros, JC Fricain.

Brevet européen EP10305224.7 déposé le 4 mars 2010

Plusieurs brevets sont en cours de dépôt concernant la deuxième machine.

- L'enjeu de la 4D et la Bio-impression *in vivo*

Contrairement à l'impression classique 3D, la Bio-impression implique de considérer une 4^{ème} dimension : la dimension temporelle au cours de laquelle les cellules imprimées vont s'organiser, migrer et se différencier de manière autonome pour former des tissus fonctionnels. La bioimpression vise donc à guider les processus d'auto-organisation cellulaire qui se produisent naturellement au cours de l'embryogénèse, du développement ou encore lors du remodelage tissulaire.

L'objectif de l'équipe de Fabien Guillemot n'est donc pas seulement de positionner les cellules en 3D mais de définir et modéliser la dynamique d'auto organisation des cellules imprimées.

En parallèle, l'équipe de recherche mène également des expériences *in vivo* sur des souris. Elle est parvenue en 2010 à imprimer des cellules souches mésenchymateuses dans l'os de souris vivantes. La prochaine étape consiste à tester une chirurgie assistée par ordinateur qui permettrait d'imprimer des tissus *in vivo* directement à l'endroit même où cela est nécessaire.

Quelles perspectives pour demain?

- Le défi de la Bio-impression

Le défi de la Bio-impression est encore de produire des tissus fonctionnels dans le but de créer :

Actuellement...

Des modèles prédictifs reproduisant la physiologie de tissus humains sains ou de tissus pathologiques permettant de tester de manière plus prédictive des molécules, ingrédients et candidats médicaments. Ces modèles physiologiques seront utilisés dans le domaine pharmaceutique. (Pour la cosmétique, le marché global des méthodes alternatives a été estimé à 1 milliard d'euros en 2015 (Source Transparency Market Research) avec une croissance annuelle de 13.1%.)

D'ici 3 à 5 ans...

Des tissus individualisés, réalisés à partir des cellules du patient, permettant de **sélectionner *in vitro* sur ces tissus les traitements** et de développer des **solutions thérapeutiques personnalisées**. L'équipe de Fabien Guillemot a pour ambition d'inscrire la Bio-impression dans les développements du nouveau plan cancer qui concernent notamment la médecine individualisée.

D'ici 7 à 10 ans...

Des tissus implantables pour la médecine régénératrice. Le développement et la fabrication de tissus biologiques représentent des enjeux socio-économiques majeurs. Le marché de l'ingénierie tissulaire est évalué à 15 Milliards de dollars en 2014 et devrait doubler d'ici 2018 ([source](#) : MedMarket Diligence, LLC.). Aussi, du fait de l'allongement de la durée de la vie et de l'incidence de pathologies majeures telles que le cancer et le diabète, le nombre de personnes en attente d'une greffe d'organe est en constante augmentation (51 000 personnes en Europe en 2013).

- Des questions éthiques

La Bio-impression 3D est une technologie qui suscite de nombreuses attentes.

*"Cette caractéristique **découle de la dualité numérique – physique (ou biologique) de la Bio-impression qui ouvre la voie à la fabrication à la demande, sur-mesure, de tissus biologiques complexes et personnalisables**"* indique Fabien Guillemot, chargé de recherche à l'Inserm.

La technologie de Bio-impression soulèvera des questions éthiques issues de ses propres évolutions.

"En effet, quand les chercheurs pourront créer des tissus fonctionnels, ils seront alors capables de modifier ces tissus pour les améliorer, indique Fabien Guillemot. Le débat éthique sera nécessaire pour savoir dans quelles mesures la modification des tissus sera possible et à quelles fins", souligne le chercheur.

- Développement de la Startup Poietis

Fort des résultats du laboratoire, l'équipe de Fabien Guillemot crée actuellement une startup : "Poietis".

Cette dernière a été élue en juin « coup de cœur » par la Région Aquitaine et Bordeaux Unitec et vient d'être lauréate du [Concours National de création d'entreprises de technologies innovantes organisé par le Ministère de la Recherche](#).

Cette structure permettra dans un premier temps de fournir aux laboratoires du monde entier les tissus imprimés à des fins de recherche.

En Europe, des laboratoires académiques travaillent sur la Bio-impression à Edimbourg, Manchester (Royaume-Uni), Hanovre (Allemagne), Utrecht (Pays Bas) / Zurich (Suisse).

Des sociétés cherchent à commercialiser des tissus biologiques réalisés par Bio-impression :

- [Organovo](#), San Diego, Etats-Unis (créée en 2007 ; Bio-impression par extrusion)
- [TeVido Biodevices](#), Austin, Etats-Unis (créée en ; Bio-impression jet d'encre)
- [Cyfuse Biomedical](#), Tokyo, Japon (créée en 2010)
- [Regenovo Biotechnology](#) Co., Ltd, Hangzhou, Chine (créée en 2013; Bio-impression par extrusion)

Des sociétés commercialisent des bio-imprimantes (auprès principalement d'acteurs académiques):

- [L'Institut Fraunhofer ILT](#), Aix La Chapelle, Allemagne (bio-imprimante par LASER)
- [EnvisionTEC GmbH](#), Gladbeck, Allemagne (bio-imprimante par extrusion)
- [RegenHU](#), Villaz-St-Pierre, Suisse (bio-imprimantes par extrusion)

Photos :

Des photos sont à disposition dans la banque d'images de l'Inserm :

<http://www.serimedis.inserm.fr/fr/feature/1016/biotis/page/1/nobc/1>

Contact chercheur

Fabien Guillemot

Chargé de recherche Inserm

Unité 1026 Bio ingénierie tissulaire (BIOTIS) (Inserm/Université de Bordeaux)

Groupe d'ingénierie tissulaire assisté par Laser (TEAL)

05 57 57 14 95 / 06 83 54 47 99

Fabien.guillemot@inserm.fr

Contact presse

Juliette Hardy

01 44 23 60 98 / 06 19 36 46 45

presse@inserm.fr