



HAL
open science

Développement d'un modèle original pour étudier la communication des cellules osseuses

Agathe Gremare

► **To cite this version:**

Agathe Gremare. Développement d'un modèle original pour étudier la communication des cellules osseuses. Chirurgie. 2014. dumas-01105421

HAL Id: dumas-01105421

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01105421>

Submitted on 20 Jan 2015

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.

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2014

N°67

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement
Par Agathe, Jeanne, Marcelle GREMARE
Née le 25 octobre 1989 à Paris (14^{ème})
le vendredi 19 décembre 2014

**Développement d'un modèle original pour étudier la
communication des cellules osseuses**

Directeur de thèse
Damien LE NIHOANNEN

Membres du Jury

Président	M. J-C. FRICAÏN	Professeur des Universités
Directeur	M. D. LE NIHOANNEN	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	Mme N-B. THEBAUD	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	M. S. CATROS	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	M. J-M. MARTEAU	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	M. J. SAMOT	Maître de Conférences des Universités

**COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE**

Directeur	M. Jean-François PELI	58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Formation initiale	M. Yves DELBOS	56-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M. Jean-Christophe FRICAIN	57-02
Directeur Adjoint - Chargé des Relations Internationales	M. Jean-François LASSERRE	58-02

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-02
Mlle Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-02
M. J-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Melle Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-03
M. Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-02
M. Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Jean-Pierre	BLANCHARD	Prothèse dentaire	58-02
M. Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mlle Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Sylvain	CATROS	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Stéphane	CHAPENOIRE	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Reynald	DA COSTA NOBLE	Parodontologie	57-01
M. François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Raphael	DEVILLARD	Odontologie conservatrice- Endodontie	58-01
M. Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-02
M. Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-02
M. Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-02
M. Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01

Mme Dominique	ORIEZ	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François	PELI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Johan	SAMOT	Sciences biologiques	57-03
Mlle Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mlle Noémie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M. Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Melle Audrey	AUSSEL	Sciences biologiques	57-03
M. Terence	BARSBY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme Aurélie	BARSBY-EL-KHODER	Prothèse dentaire	58-02
M. Julien	BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu	CLINKEMAILLIE	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M. Guillaume	CRESTE	Prothèse dentaire	58-02
Mme Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Hélène	DENOST	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Guillaume	FENOUL	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mlle Geraldine	FERRERO-MOURGUES	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Nicolas	GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Melle Sandrine	GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Melle Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
Melle Amandine	LAVAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
Melle Alice	LE NIR	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme Karine	LEVET	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Alexandre	MARILLAS	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Matthieu	MEYER	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Melle Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
Melle Virginie	PANNEREC	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Melle Candice	PEYRAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Jean-Philippe	PIA	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
M. Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

A mes parents, à mon frère ainsi qu'à toute ma famille pour leur soutien constant et leurs nombreux encouragements.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord, l'ensemble des membres du jury :

- Damien Le Nihouannen, maître de conférences des universités en physiologie animale, qui a dirigé cette thèse et qui m'a permis de participer à des congrès en France et à l'étranger.
- Noélie-Bruneilde Thébaud ; maître de conférences des universités en sciences biologiques, praticien hospitalier ; qui a accepté d'être la rapportrice de cette thèse et qui m'a fait partager son « savoir endothélial ».
- Sylvain Catros et Jean-Marie Marteau ; tous deux maîtres de conférences des universités en chirurgie buccale – pathologie et thérapeutique, praticiens hospitaliers ; ainsi que Johan Samot ; maître de conférences des universités en sciences biologiques, praticien hospitalier ; qui me font l'honneur de juger ce travail.
- Jean-Christophe Fricain ; professeur des universités en chirurgie buccale – pathologie et thérapeutique, praticien hospitalier ; qui a accepté de présider ce jury. Qu'il soit assuré de mon plus profond respect.

Mes travaux ont été effectués au sein de l'équipe de bio ingénierie tissulaire U1026. Durant année, j'ai fait la connaissance de nombreuses personnes que je tiens à remercier. Je remercie donc :

- Joëlle Amédée, directrice de cette unité de recherche, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire,
- Reine Bareille, pour sa disponibilité et ses précieux conseils en culture cellulaire,
- mes camarades de bureau : Julien, Audrey, Hugo, Annabelle, Camille, Juliette, Carole, Emma et Robin avec qui j'ai beaucoup travaillé mais aussi beaucoup ri,
- l'ensemble du personnel de l'unité (chercheurs, enseignants-chercheurs ITA/BIATSS) pour leur conseil et leur gentillesse,
- ainsi que la société Biomatlante®, qui a fourni les pastilles de phosphate de calcium utilisées dans certaines expériences.

Pour terminer, je tiens à remercier :

- Aurore, ma binomette, pour tous les moments forts passés ensemble et tous ceux à venir,
- Ainsi que Frédérique, Lorane, Ny aina et Pauline.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
1. INTRODUCTION.....	8
2. L'OS ALVEOLAIRE.....	9
2.1. L'aspect structural	9
2.1.1. L'os cortical (ou os compact)	9
2.1.2. L'os trabéculaire (ou os spongieux)	10
2.1.3. La paroi ligamentaire	10
2.1.4. Les surfaces osseuses	10
2.2. L'aspect histologique.....	11
2.2.1. La composante osseuse	11
2.2.1.1. Les cellules.....	11
2.2.1.2. La matrice extracellulaire.....	12
2.2.2. La composante médullaire.....	12
2.3. Les propriétés du tissu osseux alvéolaire	13
2.3.1. Le remodelage osseux	13
2.3.2. La cicatrisation osseuse	14
3. L'INGENIERIE TISSULAIRE	16
3.1. La définition de l'ingénierie tissulaire	16
3.2. L'ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie maxillo-faciale	17
3.2.1. La reconstruction mandibulaire.....	17
3.2.2. La régénération osseuse pré implantaire	17
3.3. La communication cellulaire	18
3.3.1. Entre les ostéoblastes et les ostéoclastes	18
3.3.2. Entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales	20
4. APPROCHE EXPERIMENTALE : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE ORIGINAL POUR ETUDIER LA COMMUNICATION ENTRE LES CELLULES OSSEUSES	23
4.1. Introduction	23
4.1.1. Le contexte scientifique	23
4.1.2. Les objectifs	26
4.2. Matériel et méthodes	27
4.2.1. Le milieu de culture cellulaire.....	27
4.2.2. L'isolement des HBMSCs à partir de moelle osseuse humaine.....	27

4.2.3.	L'isolement des cellules mononucléées à partir du sang de cordon ombilical humain et cultures primaires des ostéoclastes et des cellules progénitrices endothéliales	27
4.2.4.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux	29
4.2.4.1.	La coloration de la phosphatase alcaline	30
4.2.4.2.	La coloration de Von Kossa.....	30
4.2.4.3.	Les immunofluorescences <i>in situ</i>	30
4.2.5.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique.....	31
4.2.6.	La mise en place d'un modèle unique de tri-culture	32
4.2.6.1.	La coloration de la tartrate résistante acide phosphatase	34
4.2.6.2.	La coloration de la phosphatase alcaline	34
4.2.6.3.	La quantification de la surface de résorption ostéoclastique en contact direct	34
4.2.7.	Les analyses statistiques.....	34
4.3.	Résultats	35
4.3.1.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux	35
4.3.2.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique.....	38
4.3.3.	La mise en place d'un modèle de tri-culture	39
4.3.3.1.	La coloration de la tartrate résistante acide phosphatase et la coloration de la phosphatase alcaline	39
4.3.3.2.	La quantification de la surface de résorption ostéoclastique en contact direct	40
4.4.	Discussion	41
4.4.1.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux	42
4.4.2.	L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique.....	43
4.4.3.	La Mise en place d'un modèle de tri-culture.....	45
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	47
	BIBLIOGRAPHIE	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma d'une dent et de son parodonte d'après Zunzarren [2].....	9
Figure 2 : Schéma de la structure de l'os cortical.	10
Figure 3 : Schéma de la structure de l'os trabéculaire.	10
Figure 4 : Schéma du cycle de remodelage osseux.	14
Figure 5 : Schéma des étapes de l'ingénierie tissulaire d'après Blitterswijk [13].	16
Figure 6 : Schéma de la communication en contact direct entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques d'après Matsuo [16].	19
Figure 7 : Schéma de la communication en contact indirect entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques d'après Boyle [17].....	20
Figure 8 : Schéma de la communication entre cellules ostéoblastiques et endothéliales d'après Grellier [18].....	21
Figure 9 : Schéma du dialogue entre les cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et endothéliales.....	22
Figure 10 : Schéma des milieux de culture utilisés au laboratoire pour les mono-cultures de cellules ostéoblastiques ostéoclastiques et endothéliales et pour les co-cultures entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques, entre cellules ostéoblastiques et endothéliales et du milieu de culture testé pour la co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales.	23
Figure 11 : La différenciation ostéoclastique est possible en présence du milieu EBM-2.....	24
Figure 12 : L'ostéoclastogenèse est inhibée par l'acide ascorbique et l'hydrocortisone présents dans le Bullet kit de l'EGM-2MV.	24
Figure 13 : Les caractéristiques des cellules progénitrices endothéliales et des cellules ostéoclastiques sont mises en évidence en présence d'EGM2*/ α MEM.	25
Figure 14 : Les milieux de culture EGM2* et EGM2*/ α MEM n'influent pas sur la différenciation ostéoclastique.....	26
Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'isolement des HBMSCs à partir de moelle osseuse humaine.	27
Figure 16 : Schéma récapitulatif des étapes pour la culture primaire des ostéoclastes et des cellules progénitrices endothéliales à partir de cellules mononucléées issues de sang de cordon ombilical.....	29
Figure 17 : Schéma des différentes conditions de culture pour l'étude de l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux.	29
Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes étapes pour étudier l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique.	32

Figure 19 : Schéma des deux conditions de culture mises en place dans l'établissement du modèle de tri-culture. 33

Figure 20 : Schéma du modèle de tri-culture en contact direct permettant la quantification de la surface de résorption ostéoclastique..... 33

Figure 21 : Les phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux sont conservés en présence d'EGM2*/ α MEM après 3 jours de culture..... 36

Figure 22 : Les phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux sont conservés en présence d'EGM2*/ α MEM après 7 et 10 jours de culture..... 37

Figure 23 : L'activité de résorption ostéoclastique n'est pas modifiée par l'EGM2*/ α MEM. 38

Figure 24 : Les caractéristiques des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques sont mises en évidence dans le modèle de tri-culture. 39

Figure 25 : La résorption ostéoclastique a été quantifiée en contact direct. 40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages du facteur de von Willebrand, du CD-31 et de la VE-cadhérine..... 31

LISTE DES ABREVIATIONS

α MEM : alpha minimum essential medium
BMPs : bone morphogenetic proteins
CMNs : cellules mononucléées
EBM-2 : endothelial basal medium-2
EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid
EGM-2MV : endothelial growth medium-2 micro vascular
EphB4 : ephrin receptor B4
HBMSCs : human bone marrow stromal cells
IGF : insulin-like growth factor
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MEB : microscopie électronique à balayage
MEC : matrice extracellulaire
OBs : cellules ostéoblastiques
OCs : cellules ostéoclastiques
OPG : osteoprotegerin
PAL : phosphatase alcaline
PBS : phosphate buffered saline
PBS-BSA : phosphate buffered saline-bovine serum albumin
PECs : progenitor endothelial cells
PFA : paraformaldehyde
PGE2 : prostaglandin E2
PTH : parathyroid hormone
RANK-L : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
SVF : sérum de veau fœtal
TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase
TGF β : transforming growth factor beta
VE-cad : Vascular Endothelial-cadherin
VEGF : vascular endothelial growth factor
vWF : von Willebrand factor

1. INTRODUCTION

Le corps humain est composé de 206 os de formes et tailles variées. Au niveau de la face, le maxillaire et la mandibule portent respectivement les arcades dentaires supérieure et inférieure. Le maxillaire et la mandibule se composent d'os basal supportant les procès alvéolaires qui contiennent les racines des dents. Les procès alvéolaires sont constitués d'os alvéolaire. Cet os présente une enveloppe corticale entourant une couche centrale d'os trabéculaire. Comme les autres os de l'organisme, l'os alvéolaire est continuellement remodelé et possède des capacités de cicatrisation. Cependant, lorsque la corticale externe est absente (après une chirurgie interruptrice mandibulaire ou une avulsion avec alvéolectomie, par exemple) les capacités de cicatrisation de l'os alvéolaire sont insuffisantes pour aboutir à une cicatrisation osseuse *ad integrum*. Ce phénomène entraîne des déficits fonctionnels et esthétiques. Pour les corriger, le praticien doit alors avoir recours à des stratégies de régénération osseuse chirurgicale (comme la chirurgie par lambeau libre microanastomosé ou l'autogreffe) dont les principaux inconvénients sont le défaut de vascularisation du greffon et la morbidité au niveau du site donneur.

Pour pallier les limites de ces techniques, l'ingénierie tissulaire semble être la solution la plus pertinente. L'ingénierie tissulaire osseuse applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques pour maintenir, restaurer ou améliorer la fonction du tissu osseux lésé. Afin d'optimiser la viabilité et l'intégration de ce substitut, il est important de s'intéresser aux communications entre les cellules qui composent le tissu osseux. L'objectif de ce projet de recherche était de développer un modèle original permettant d'étudier la communication entre les cellules osseuses.

La première partie de cette thèse décrit ainsi l'os alvéolaire du point de vue structural et histologique ainsi que ses propriétés de remodelage et de cicatrisation. Le concept d'ingénierie tissulaire, ses applications en chirurgie maxillo-faciale ainsi que les bases de la communication cellulaire seront abordés dans une seconde partie. Enfin les étapes qui ont conduit à la validation du système de culture pour étudier la communication entre cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et endothéliales seront exposées dans une dernière partie.

2. L'OS ALVEOLAIRE

2.1. L'aspect structural

Le maxillaire et la mandibule se composent d'os basal supportant les procès alvéolaires qui contiennent les racines des dents. Le procès alvéolaire est constitué d'os alvéolaire et appartient au groupe des os plats. Il est présente donc (1) une enveloppe d'os cortical (ou os compact) se prolongeant avec l'os basal de la mandibule ou du maxillaire sans délimitation anatomique visible, (2) une couche centrale d'os trabéculaire (ou os spongieux) et (3) une paroi ligamentaire formant la paroi alvéolaire osseuse en rapport avec la racine dentaire (*Figure 1*) [1].

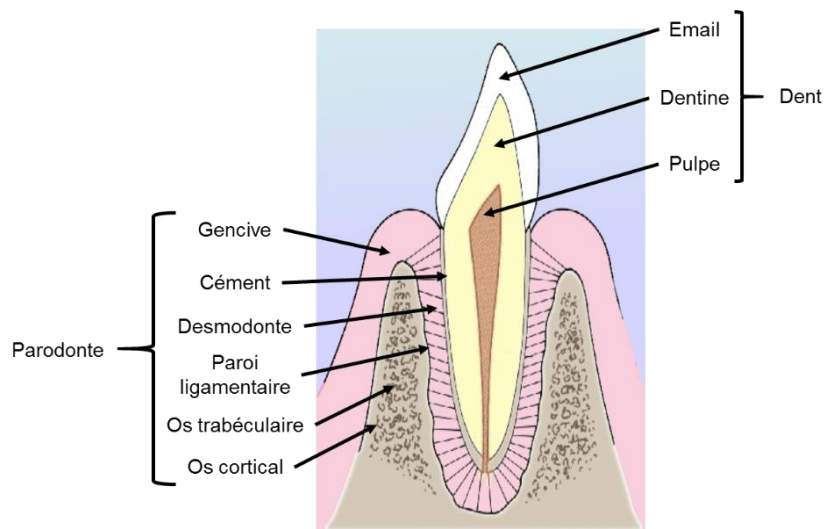


Figure 1 : Schéma d'une dent et de son parodonte d'après Zunzarren [2].

2.1.1. L'os cortical (ou os compact)

L'os cortical est un os haversien, c'est-à-dire qu'il est composé d'ostéons. Chaque ostéon possède un canal vasculo-nerveux (ou canal de Havers) entouré de lamelles osseuses concentriques contenant des ostéocytes. Les ostéons sont reliés entre eux par les canaux de Volkmann. L'espace entre les ostéons est constitué de fragments de lamelles concentriques anciennes (*Figure 2*) [1].

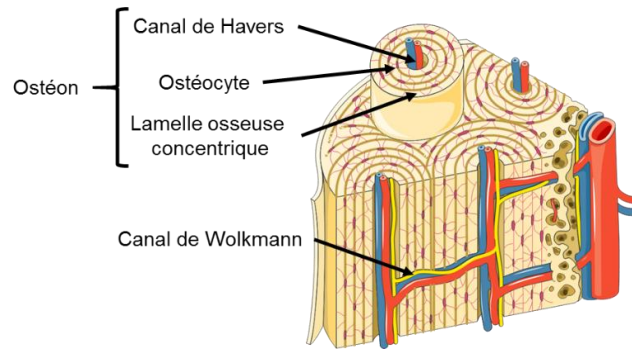


Figure 2 : Schéma de la structure de l'os cortical.

2.1.2. L'os trabéculaire (ou os spongieux)

L'os trabéculaire est formé de travées osseuses d'os lamellaire anastomosées entre elles. L'espace entre ces travées est occupé par la moelle osseuse (*Figure 3*) [1].

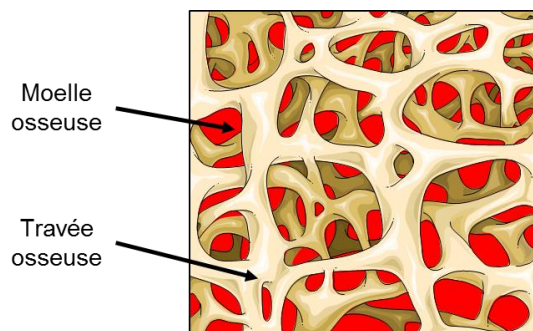


Figure 3 : Schéma de la structure de l'os trabéculaire.

2.1.3. La paroi ligamentaire

Il s'agit d'une mince couche de tissu osseux (100 μm à 200 μm) présentant une structure particulière. En effet, d'une part, elle permet l'ancrage des fibres de Sharpey (ces fibres desmodontales s'insèrent également sur la surface cémentaire assurant ainsi la fixation de la dent dans l'alvéole) et, d'autre part, elle est perforée par les canaux de Volkmann mettant ainsi en communication l'espace médullaire osseux et le desmodonte d'où la dénomination de « lame criblée » qui est parfois utilisée pour désigner cette paroi [1].

2.1.4. Les surfaces osseuses

La surface externe de l'os compact est recouverte par le périoste. Ce dernier comporte une couche externe fibreuse et une couche interne ostéogénique contenant des fibroblastes, des pré-ostéoblastes et des cellules bordantes [1].

La surface interne de l'os compact et la surface entière d'os spongieux sont recouvertes par l'endoste. Cette couche cellulaire séparant la surface et la moelle osseuse est peuplée de pré-ostéoblastes, de pré-ostéoclastes et de cellules bordantes [1].

2.2. L'aspect histologique

Comme exposé précédemment, la moelle osseuse est contenue dans les cavités de l'os spongieux. Les compartiments osseux et médullaire sont donc en étroite interaction. Dans cette partie, nous aborderons leur histologie respective.

2.2.1. La composante osseuse

L'os alvéolaire est un tissu conjonctif minéralisé richement vascularisé et innervé. Il est majoritairement composé de cellules de lignée ostéoblastique et ostéoclastique. Ces cellules sont entourées par une matrice extracellulaire qui présente une phase organique et une phase minérale.

2.2.1.1. Les cellules

Les cellules de la lignée ostéoblastique regroupent les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes. Ces trois types cellulaires proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Les ostéoblastes sont des cellules de forme cuboïdale. Ils assurent, dans un premier temps, la production de l'ostéoïde (fraction organique de la matrice extracellulaire osseuse) qui sera minéralisé dans un second temps. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes retournant à l'état quiescent. Elles ont une forme aplatie et bordent l'endoste et le périoste. Le « tapis » continu qu'elles forment le long des surfaces osseuses constitue une barrière entre la moelle osseuse et l'os minéralisé. La présence ou l'absence des cellules bordantes sur la surface de l'os, empêche ou rend possible, la fixation des ostéoclastes sur la matrice osseuse, leur conférant ainsi un rôle important dans la régulation de la résorption osseuse. Les ostéocytes constituent une autre possibilité de différenciation terminale des cellules ostéoblastiques. Chaque ostéocyte est emmuré dans la matrice osseuse minéralisée et se situe dans une lacune périostéocytaire ou ostéoplaste.

Ces lacunes sont reliées entre elles par des canalicules contenant les prolongements cytoplasmiques des ostéocytes. Malgré leur faible activité métabolique, les ostéocytes peuvent synthétiser du collagène de type I qui sera ensuite minéralisé [1,3,4].

La lignée ostéoclastique est représentée par les ostéoclastes. Ces cellules géantes multinucléées assurent la résorption de la matrice osseuse. Elles sont issues de la fusion de précurseurs circulants de la lignée myéloïde. L'ostéoclastogenèse est régulée par de nombreux facteurs et principalement par le "macrophage colony stimulating factor" (M-CSF) et le "receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand" (RANK-L) [1,3,4].

2.2.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) correspond à l'ensemble de macromolécules sécrétées et entourant les cellules. Elle joue un rôle essentiel dans la constitution, le maintien et le remodelage tissulaire.

La MEC du tissu osseux est composée d'une fraction organique (entre 30% et 35% en masse environ), dont le composant principal est le collagène de type I, et d'une fraction minérale (entre 65% et 70% en masse environ), constituée essentiellement d'hydroxyapatite (phosphate de calcium). La partie organique comprend des fibres de collagènes, des protéines non collagéniques et de l'eau. Parmi les protéines collagéniques, bien que la forme de type I soit majoritaire, des collagènes de type III, V, VII et XII sont également présents. Les protéines non collagéniques, sont principalement représentées par des protéines carboxylées (comme l'ostéocalcine), des glycoprotéines (comme l'ostéonectine), des sialoprotéines (telles que l'ostéopontine et la "bone sialoprotein"), des protéines d'adhésion et des protéoglycanes. Enfin, une faible quantité de lipides est également présente [3,4].

2.2.2. La composante médullaire

La moelle osseuse présente une fraction hématopoïétique, la « moelle rouge » et une fraction adipeuse, la « moelle jaune » qui ne sera pas décrite ici. La moelle osseuse rouge est composée de cellules stromales (fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes), de leurs molécules sécrétées (matrice extracellulaire et facteurs de croissance) et d'un réseau microvasculaire (capillaires sinusoides). Ce stroma forme un microenvironnement adapté à la croissance des cellules souches. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en globules rouges, globules blancs et plaquettes et les cellules souches mésenchymateuses en cellules des tissus conjonctifs plus ou moins spécialisés (ostéocytes ou fibroblastes par exemple).

Chez l'Homme, la moelle osseuse constitue ainsi un « réservoir » de cellules souches adultes. Ces cellules sont capables d'autorenouvellement (possibilité de se diviser sans se différencier pendant une période prolongée) et sont multipotentes. Cette propriété leur confère de nombreuses possibilités d'utilisation thérapeutique.

La transplantation des cellules souches hématopoïétiques de moelle osseuse est, par exemple, utilisée dans le traitement des cancers hématologiques ou lymphoïdes [5–7].

2.3. Les propriétés du tissu osseux alvéolaire

Comme les autres os de l'organisme, l'os alvéolaire est continuellement remodelé et possède des capacités de cicatrisation.

2.3.1. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un cycle continu d'événements qui permet le remplacement d'un os ancien par de l'os nouveau. Il est le résultat d'une coopération fonctionnelle entre des cellules de la lignée ostéoblastique et ostéoclastique. Chaque cycle comporte cinq phases : (1) la phase d'activation, (2) la phase de résorption, (3) la phase d'inversion, (4) la phase de formation et (5) la phase de quiescence (*Figure 4*).

- (1) Sous l'action de facteurs pro-résorbants comme la parathormone (PTH), la vitamine D₃ ou la prostaglandine E₂ (PGE₂), les cellules bordantes se rétractent. Lors de la phase d'activation, les ostéoclastes peuvent ainsi accéder et adhérer à la matrice osseuse.
- (2) Lors de la phase de résorption, la différenciation et l'activation ostéoclastique sont principalement sous la dépendance des cytokines M-CSF et RANK-L. Les ostéoclastes sont des cellules spécialisées dans la résorption osseuse. Ils adhèrent à la surface osseuse et forment un « bourrelet » cytoplasmique renforcé par des podosomes. L'ensemble délimite la lacune de résorption (ou lacune de Howship). Dans ce compartiment, l'ostéoclaste relargue des ions H⁺ et Cl⁻ et des enzymes protéolytiques, comme la "tartrate-résistante acid phosphatase" (TRAP), qui dégradent respectivement les composantes minérales et organiques du tissu osseux. La TRAP est ainsi le marqueur ostéoclastique que nous avons utilisé dans la partie expérimentale.
- (3) Lors de la phase d'inversion, les ostéoclastes meurent par apoptose et des cellules macrophagiques éliminent les « débris » à la surface de la matrice osseuse.

- (4) La phase de formation débute par le recrutement des ostéoblastes dans les lacunes de résorption. Dans un premier temps, les ostéoblastes comblent la lacune en synthétisant un tissu ostéoïde. Dans un second temps, ils produisent des vésicules matricielles riches en phosphatase alcaline (PAL). Cette enzyme favorise la formation de cristaux de phosphate de calcium et par conséquent, la minéralisation du tissu ostéoïde. La PAL et les dépôts de phosphate de calcium sont ainsi respectivement les marqueurs précoces et tardifs de la différenciation ostéoblastique que nous avons utilisés dans la partie expérimentale.
- (5) Enfin, la phase de quiescence se caractérise par un arrêt d'activité des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques et par la présence de cellules bordantes au niveau de l'endoste [1,3,4].

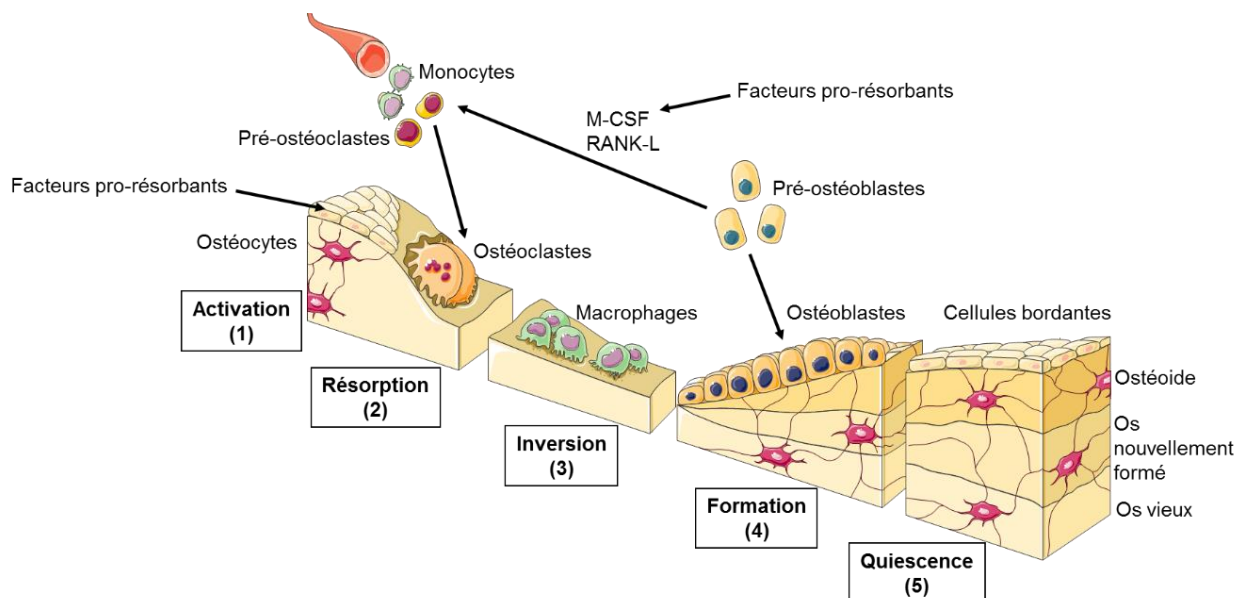


Figure 4 : Schéma du cycle de remodelage osseux.

2.3.2. La cicatrisation osseuse

Pour décrire les capacités de cicatrisation de l'os alvéolaire, l'exemple de l'avulsion dentaire a été choisi. Dans ce cas, les capacités de cicatrisation de l'os alvéolaire aboutissent au comblement de l'alvéole. Ce processus biologique reproduit, chez l'adulte, la cascade d'évènements conduisant à l'ossification membranaire lors du développement embryonnaire.

Il comprend trois étapes successives : (1) la réaction inflammatoire immédiate au traumatisme avec formation d'un caillot sanguin ainsi que la libération de facteurs de croissance et de cytokines, (2) la différenciation ostéoblastique ainsi que la formation d'os immature et enfin, (3) le remodelage osseux où l'architecture osseuse est mise en adéquation avec les contraintes mécaniques.

Le périoste joue un rôle important dans le mécanisme de cicatrisation osseuse car il constitue une source de cellules ostéoprogénitrices. La perte de la corticale de l'os alvéolaire (lors d'avulsion avec alvéolectomie ou de chirurgie interruptrice mandibulaire, par exemple) et donc du périoste qui la recouvre, altère ainsi les capacités de cicatrisation de l'os alvéolaire. Le praticien doit alors avoir recours à des stratégies de régénération osseuse. La chirurgie par lambeau libre microanastomosé et l'autogreffe sont les techniques de référence respectives pour la reconstruction mandibulaire et la régénération osseuse pré implantaire. Pour pallier leurs limites principales (le défaut de vascularisation du greffon et la morbidité au niveau du site donneur), l'ingénierie tissulaire semble être une alternative [8,9].

3.1. La définition de l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire se définit comme « l'ensemble des méthodes et des techniques s'inspirant de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques pouvant maintenir, améliorer et restaurer les fonctions des tissus vivants ». Pour obtenir un tissu hybride, elle associe ainsi, une matrice, une composante cellulaire et/ou biochimique [10–12].

Les étapes « classiques » de l'ingénierie tissulaire comprennent tout d'abord (1) un prélèvement de cellules chez le patient (2) qui seront mises en culture pour être amplifiées et/ou différenciées. (3) Les cellules sont ensuiteensemencées sur une matrice et (4) l'ensemble est alors placé dans un bioréacteur avec des facteurs de croissance. (5) Après un temps de maturation suffisant, le construit tissulaire est implanté chez le patient où il sera remodelé (*Figure 5*) [13].

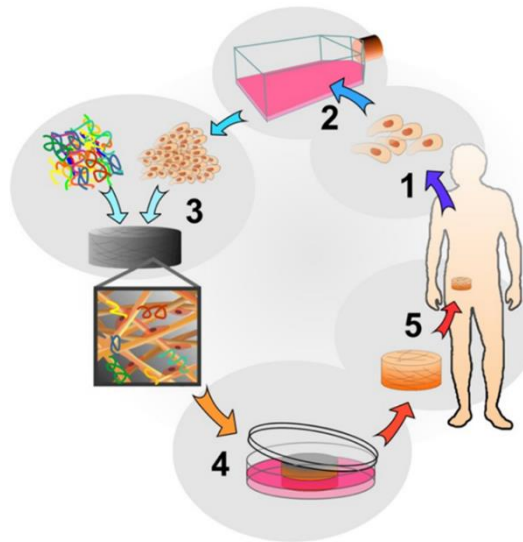


Figure 5 : Schéma des étapes de l'ingénierie tissulaire d'après Blitterswijk [13].

L'objectif de cette thématique pluridisciplinaire est double. Le construit tissulaire peut constituer (1) une alternative aux greffes d'organes en ayant l'avantage de conserver un produit autologue et donc d'éviter les traitements immunosuppresseurs mais aussi (2) un outil de recherche et développement en permettant la mise au point de modèles d'étude en deux ou trois dimensions [14].

3.2. L'ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie maxillo-faciale

Dans le domaine de la chirurgie maxillo-faciale, l'ingénierie tissulaire osseuse est utilisée dans deux indications : la reconstruction mandibulaire et la régénération osseuse pré implantaire. La revue de la littérature montre, qu'aujourd'hui, l'ingénierie tissulaire n'est pas une technique utilisée en première intention. En effet, seules quelques équipes dans le monde montrent que cette technique est applicable au travers d'une vingtaine de cas cliniques publiés [9].

3.2.1. La reconstruction mandibulaire

Les objectifs, à court terme, des reconstructions mandibulaires sont la vascularisation, la stabilité primaire et la résistance mécanique du greffon. Dans ce contexte, les protocoles de traitement par ingénierie tissulaire associent une matrice, majoritairement en phosphate de calcium, ainsi que des "bone morphogenetic proteins" (BMPs). L'ensemble est alors prévascularisé *in vivo*, puis stabilisé avec des vis d'ostéosynthèse et des cages de titane préformées avant l'implantation. Les BMPs sont des protéines de la superfamille du "transforming growth factor beta" (TGFB) impliquées dans le recrutement, la prolifération et la différenciation ostéoblastique. Dans cette application, l'utilisation de cellules est peu fréquente. En effet, la revue de la littérature montre que le résultat est moins prédictible qu'avec les BMPs. Par ailleurs, le manque d'ajustage, la mauvaise résistance mécanique et le défaut de vascularisation des greffons notamment sur site anatomique altéré par traitement antérieur (radiothérapie) constituent les principales limites de cette technique [9].

3.2.2. La régénération osseuse pré implantaire

Le principal objectif de la régénération osseuse pré implantaire est la diminution de l'invasivité des procédures chirurgicales. Le protocole de traitement associe une matrice injectable (fibrine, collagène, ciment phosphocalcique) et des cellules autologues (essentiellement des cellules souches mésenchymateuses). La matrice est, ensuite, généralement cellularisée *in vitro*. L'absence de contrôle des paramètres d'ensemencement cellulaire au sein de la matrice (densité et organisation cellulaire) constitue la principale limite de cette technique. La revue de la littérature montre que l'utilisation des BMPs est limitée. En effet, leurs effets secondaires (œdème persistant) sont potentiellement importants [9].

Les objectifs et les protocoles de traitement varient ainsi en fonction des indications cliniques. Grâce aux techniques de prototypage rapide et de bioimpression assistée par laser l'adaptation des greffons aux tissus adjacents, d'une part, et l'ensemencement cellulaire, d'autre part, pourraient être mieux contrôlés [14].

Un des principaux défis de l'ingénierie tissulaire osseuse est la vascularisation. Pour y parvenir, trois stratégies majeures sont envisagées et combinables : (1) la fonctionnalisation des matrices avec des facteurs angiogènes, (2) la prévascularisation *in vitro* et (3) la prévascularisation *in vivo* [15].

Cependant, afin de pouvoir recréer un tissu osseux vascularisé, et avec pour objectif d'optimiser sa viabilité et son intégration, il est impératif de comprendre sa physiologie et notamment les communications cellulaires existantes.

3.3. La communication cellulaire

Le contact direct et le contact indirect sont les deux principaux modes de communication cellulaire. La communication en contact direct met en jeu des jonctions adhérentes et des jonctions communicantes. Les jonctions adhérentes sont caractérisées par une interaction directe entre les molécules membranaires de deux cellules adjacentes. Les jonctions communicantes (ou jonctions de type GAP) sont constituées d'un assemblage de deux hémi-canaux. Elles délimitent ainsi un canal permettant le passage d'ions ou de métabolites entre deux cellules voisines. En contact indirect, la sécrétion de molécules par une cellule permet l'activation de récepteurs cellulaires spécifiques sur cette même cellule (effet autocrine) ou sur une cellule voisine (effet paracrine) [3].

Comme exposé précédemment, l'os est un tissu vivant, dynamique et peuplé, en partie, de cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et endothéliales. Leur dialogue est fondamental pour le remodelage osseux. L'objectif de cette partie est de décrire les principaux modes de communication entre ces cellules.

3.3.1. Entre les ostéoblastes et les ostéoclastes

La communication, en contact direct, entre ces deux types cellulaires dépend essentiellement de l'interaction entre des protéines transmembranaires de la famille des "ephrinB" avec leurs récepteurs [16]. Le ligand "ephrinB2" est porté par la membrane des cellules ostéoclastiques.

L' "ephrin receptor B4" (EphB4) est porté par la membrane des précurseurs ostéoblastiques. La liaison ligand/récepteur entraîne une inhibition de la fonction ostéoclastique et une augmentation de la différenciation ostéoblastique (*Figure 6*) [16].

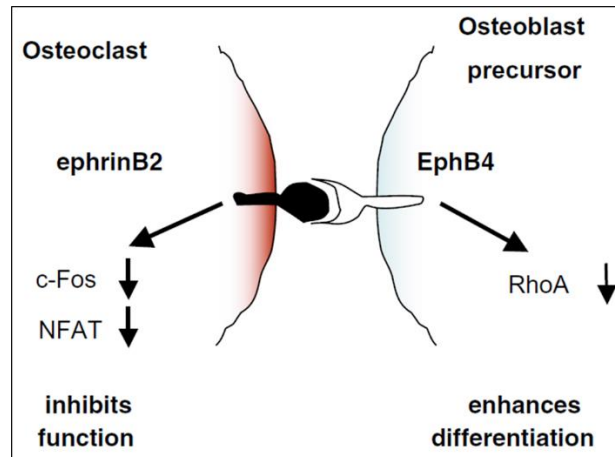


Figure 6 : Schéma de la communication en contact direct entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques d'après Matsuo [16].

La communication, en contact indirect, entre ces deux types cellulaires dépend essentiellement des facteurs M-CSF, RANK-L, et ostéoprotégérine (OPG) [17]. Le M-CSF est produit par les cellules souches mésenchymateuses et les pré-ostéoblastes. Le M-CSF agit précocement dans la formation des cellules ostéoclastiques en différenciant les monocytes en pré-ostéoclastes et en initiant ensuite le phénomène de fusion cellulaire. Sous l'action de facteurs pro-résorbants (comme la PTH, la vitamine D₃ et la PGE₂), le RANK-L est alors produit par les ostéoblastes matures, les cellules stromales de la moelle osseuse, les lymphocytes T activés et les fibroblastes synoviaux. Il se lie à son récepteur RANK, présent sur la membrane des ostéoclastes et permet la fusion, le grossissement et l'activité ostéoclastique (*Figure 7a*). La molécule RANK-L peut aussi être présente à la membrane des cellules ostéoblastiques et intervenir dans la communication en contact direct entre cellules ostéoblastiques et cellules ostéoclastiques [17].

Sous l'action de facteurs anti-résorbants (tels que les œstrogènes, la calcitonine et les BMPs-2/4), l'OPG, est produite par les pré-ostéoblastes. L'OPG est un récepteur soluble qui se fixe au RANK-L et empêche la liaison RANK-L/RANK. L'OPG inhibe ainsi la différenciation et l'activité ostéoclastique (*Figure 7b*) [17].

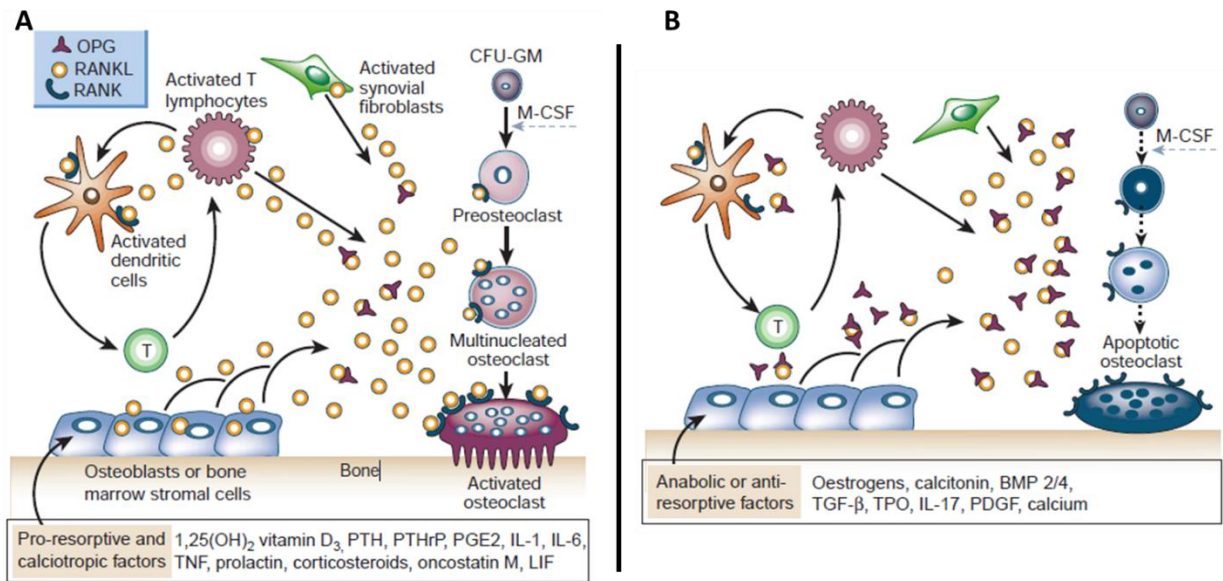


Figure 7 : Schéma de la communication en contact indirect entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques d'après Boyle [17].

A est un schéma représentatif du mécanisme d'action des facteurs pro-résorbants. B est un schéma représentatif du mécanisme d'action des facteurs anti-résorbants.

3.3.2. Entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales

En contact direct, le cytoplasme des cellules ostéoblastiques et celui des cellules endothéliales sont directement connectés. Cette communication est rendue possible par un canal qui permet le passage d'ions et de métabolites. Chaque canal (ou jonction de type GAP) est formé par l'association de deux héli canaux eux-mêmes constitués par l'assemblage de six monomères de connexines. La connexine 43 est prédominante dans les jonctions de type GAP entre cellules ostéoblastiques et cellules endothéliales [3,18].

La communication entre cellules ostéoblastiques et endothéliales, en contact indirect, est un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs. Les cellules endothéliales produisent des BMPs-2/4/7, de l' "endothelin 1" (ET-1) et de l' "insulin-like growth factor" (IGF). Ces facteurs favorisent la prolifération, la migration et la différenciation ostéoblastique. En réponse, les cellules ostéoblastiques produisent du "vascular endothelial growth factor" (VEGF) [18].

Le VEGF a un rôle central dans la communication cellulaire entre cellules ostéoblastiques et endothéliales. En effet, il agit, d’une part, sur les cellules endothéliales (en favorisant leur migration, leur prolifération ainsi que la formation de structures tubulaires) et, d’autre part, sur les cellules ostéoblastiques (en favorisant leur prolifération, leur migration ainsi que leur différenciation). La production de VEGF est stimulée par les BMPs, le “basic fibroblast growth factor” (bFGF), le TGF β , l’IGF, la PTH et la vitamine D (*Figure 8*) [18].

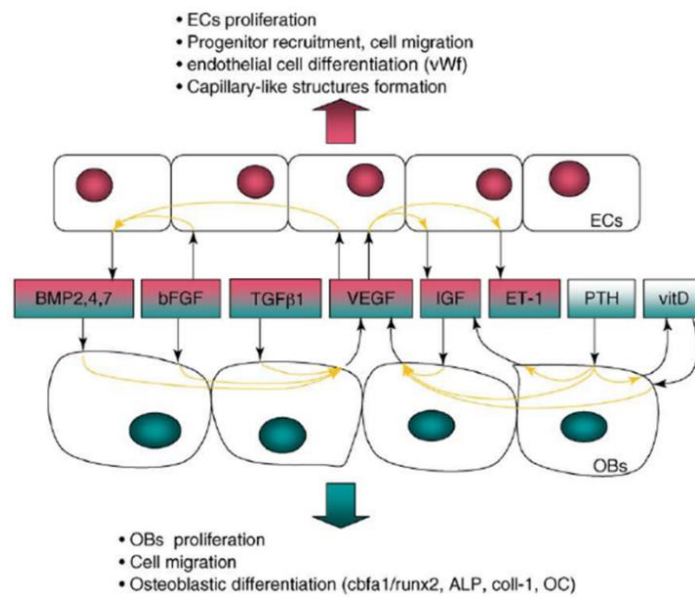


Figure 8 : Schéma de la communication entre cellules ostéoblastiques et endothéliales d’après Grellier [18].

Ainsi les interactions entre ostéoblastes-ostéoclastes et ostéoblastes-cellules endothéliales sont respectivement caractérisées principalement par la liaison “ephrinB2/EphB4”, par la triade M-CSF/RANK-L/OPG, par des jonctions de type GAP et par des facteurs diffusibles comme le VEGF (*Figure 9*).

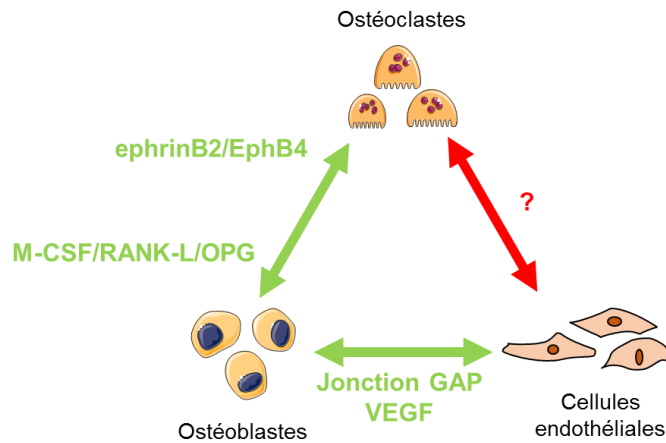


Figure 9 : Schéma du dialogue entre les cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et endothéliales.

Bien que le dialogue entre cellules ostéoclastiques et endothéliales demeure peu étudié certains auteurs suggèrent que le VEGF est un facteur important dans la communication entre ces cellules. En effet, les cellules ostéoclastiques et endothéliales possèdent, à leurs surfaces des récepteurs au VEGF [19]. D'après la revue de la littérature, seul un modèle de co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales a été décrit. Il associait en contact indirect, des cellules murines transformées de la lignée monocytes/macrophages (RAW 264.7) et des cellules progénitrices endothéliales murines [20]. Cependant, aucun modèle de co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales humaines n'a encore été développé.

4. APPROCHE EXPERIMENTALE : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE ORIGINAL POUR ETUDIER LA COMMUNICATION ENTRE LES CELLULES OSSEUSES

4.1. Introduction

4.1.1. Le contexte scientifique

Dans un travail précédent, nous avons étudié la communication entre cellules ostéoclastiques et endothéliales. Au laboratoire, l' "alpha minimum essential medium" (α MEM, Cat N° A10490-01, Gibco®) et l' "endothelial growth medium-2 micro vascular" (EGM-2MV, Cat N° CC-4176, Lonza®) sont respectivement les milieux de référence pour différencier et cultiver les cellules ostéoclastiques et les cellules endothéliales à partir de cellules mononucléées isolées du sang de cordon ombilical humain. Pour la co-culture entre ces deux types cellulaires, un milieu composé, à volumes égaux, d'EGM-2MV et d' α MEM est utilisé. Lors de ce travail, nous avons d'abord essayé d'établir un modèle de co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales en utilisant ce milieu de culture (*Figure 10*). Cependant, l'ostéoclastogenèse y était inexistante.

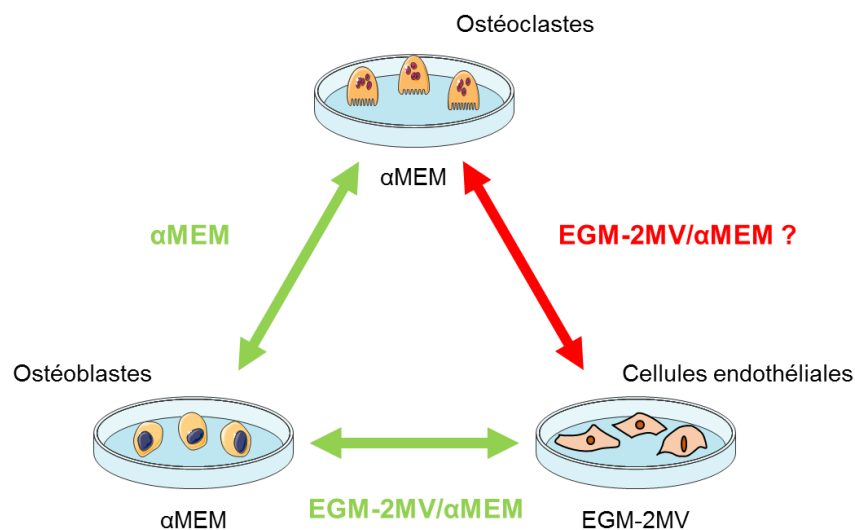


Figure 10 : Schéma des milieux de culture utilisés au laboratoire pour les mono-cultures de cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et endothéliales et pour les co-cultures entre cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques, entre cellules ostéoblastiques et endothéliales et du milieu de culture testé pour la co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales.

Le milieu de culture EGM-2MV correspond à l'association de l' "endothelial basal medium-2" (EBM-2, Cat N° CC-3156, Lonza®) avec les facteurs du Bullet kit (Cat N°CC-4147, Lonza®). Dans une étude précédente, nous avons montré que l'ostéoclastogenèse était possible en présence d'EBM-2. Ce résultat suggère qu'un, ou plusieurs, facteur(s) présent(s) dans le Bullet kit inhibe(nt) l'ostéoclastogenèse (*Figure 11*).

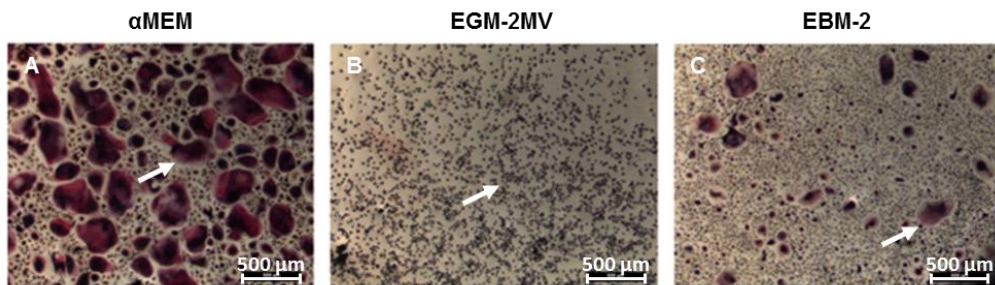


Figure 11 : La différenciation ostéoclastique est possible en présence du milieu EBM-2.

A, B et C sont des images représentatives de cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF et de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture α MEM (A), EGM-2MV (B) ou EBM-2 (C) après une coloration de la TRAP.

Dans la même étude, les différents facteurs présents dans le Bullet kit ont été testés séparément. Les résultats ont montré que l'acide ascorbique et l'hydrocortisone inhibaient l'ostéoclastogenèse (*Figure 12*).

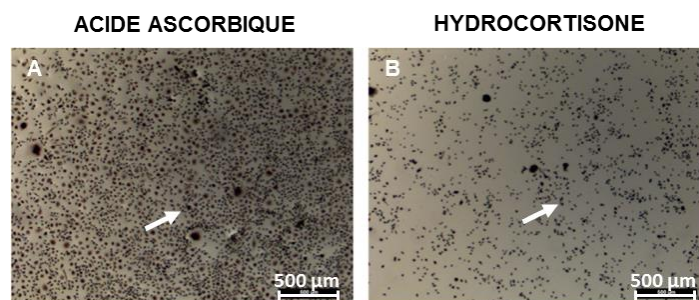


Figure 12 : L'ostéoclastogenèse est inhibée par l'acide ascorbique et l'hydrocortisone présents dans le Bullet kit de l'EGM-2MV.

A et B sont des images représentatives de cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF et de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EBM-2, en présence d'acide ascorbique (A) ou d'hydrocortisone (B) après une coloration de la TRAP.

Un nouveau milieu de culture, l'EGM2*/ α MEM, a été ainsi établi. Ce milieu est composé, à volumes égaux, d' α MEM et d'EGM2* (où l'EGM2* correspond à de l'EGM-2MV sans l'acide ascorbique ni l'hydrocortisone présents initialement dans le Bullet kit).

Dans l'EGM2*/ α MEM, les “progenitor endothelial cells” (PECs) et les ostéoclastes ont été respectivement caractérisés par des immunomarquages du “von Willebrand factor” (vWF) et du CD-31 ainsi que par une coloration de la “tartrate-résistante acid phosphatase” (TRAP) (*Figure 13*).

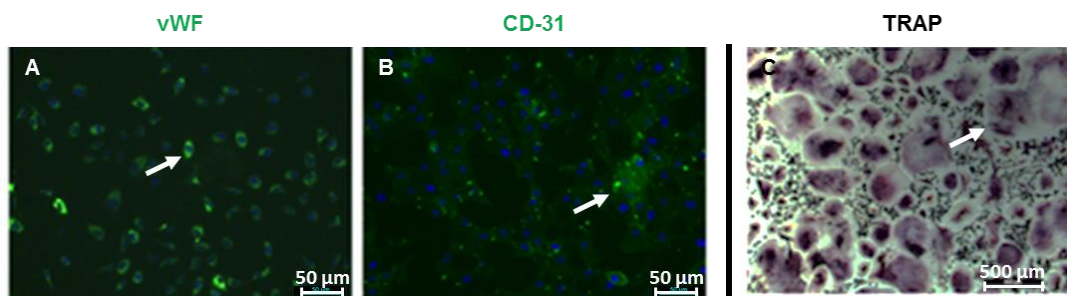


Figure 13 : Les caractéristiques des cellules progénitrices endothéliales et des cellules ostéoclastiques sont mises en évidence en présence d'EGM2*/ α MEM.

A et B sont des images représentatives des immunomarquages du vWF (A) et du CD-31 (B) de cellules progénitrices endothéliales après 8 passages et cultivées pendant 11 jours en présence d'EGM2*/ α MEM. Les cellules progénitrices endothéliales ont été initialement obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain et cultivées en présence d'EGM-2MV. C est une image représentative de cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EGM2*/ α MEM après une coloration de la TRAP.

Des analyses quantitatives complémentaires ont été réalisées sur les principales caractéristiques de la différenciation ostéoclastique que sont : le nombre d'ostéoclastes (A), la surface ostéoclastique (B), le nombre de noyaux (C) et le rapport nucléo-cytoplasmique (D). Aucune différence n'a été mise en évidence pour ces quatre critères. Ceci indique l'absence d'influence de l'EGM2*/ α MEM sur la différenciation ostéoclastique comparativement au milieu de référence qui est l' α MEM (*Figure 14*).

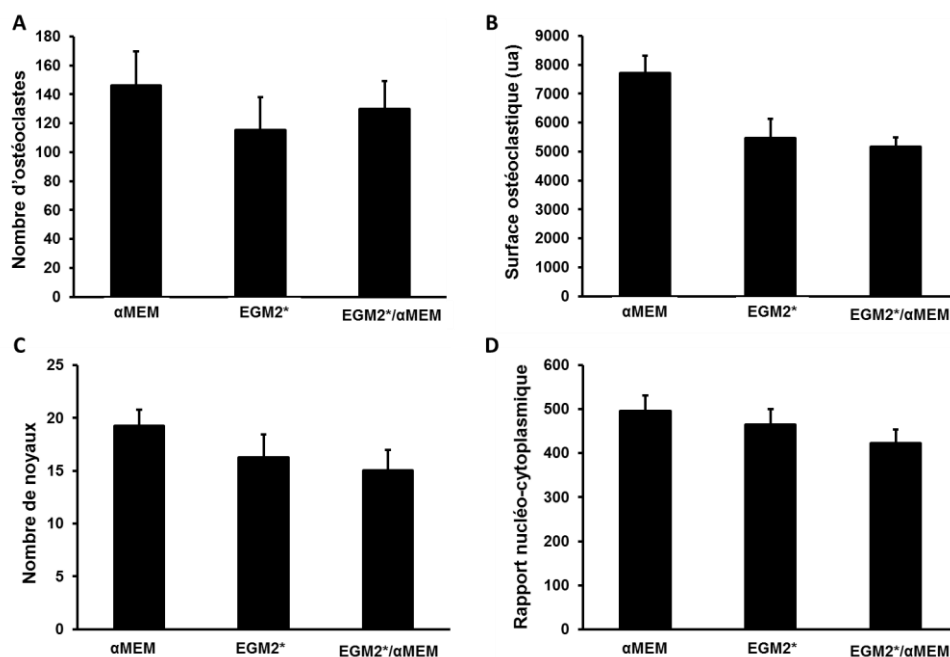


Figure 14 : Les milieux de culture EGM2* et EGM2*/αMEM n'influent pas sur la différenciation ostéoclastique.

L'effet des milieux de culture EGM2* et EGM2*/αMEM sur les caractéristiques des ostéoclastes a été déterminé par analyse d'images. Les ostéoclastes, obtenus à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF et de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture αMEM, EGM2* ou EGM2*/αMEM ne présentent pas de différence significative pour le nombre moyen d'ostéoclastes formés (A), la surface moyenne ostéoclastique (B), le nombre moyen de noyaux par ostéoclaste (C) et le rapport nucléo-cytoplasmique moyen (D).

Les résultats des expériences précédentes nous ont permis de valider l'utilisation du milieu de culture EGM2*/αMEM pour la co-culture entre cellules ostéoclastiques et endothéliales.

4.1.2. *Les objectifs*

D'autres travaux réalisés précédemment au laboratoire ont permis d'établir un modèle de co-culture entre cellules ostéoblastiques et endothéliales [18,21]. L'objectif général de ce travail était ainsi d'associer ces deux résultats et de développer un modèle original de tri-culture de cellules primaires humaines pour étudier la communication des cellules du tissu osseux. Nous avons donc évalué la capacité du milieu de culture EGM2*/αMEM à être utilisé dans ce modèle. Pour cela, nous avons étudié les effets de l'EGM2*/αMEM sur (1) la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux et sur (2) l'activité ostéoclastique. Enfin, (3) nous avons mis au point un modèle de tri-culture.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Le milieu de culture cellulaire

Le milieu de culture cellulaire, EGM2*/ α MEM, était composé à volumes égaux d' α MEM et d'EGM2*. L'EGM2* correspondait à de l'EGM-2MV sans acide ascorbique ni hydrocortisone.

4.2.2. L'isolement des HBMSCs à partir de moelle osseuse humaine

Pour obtenir les "human bone marrow stromal cells" (HBMSCs), de la moelle osseuse humaine a été récupérée lors d'une intervention de chirurgie orthopédique (convention datée du 15/06/04). Les cellules ont étéensemencées à J0 à raison de 5×10^5 cellules/cm² dans des flasques de 75cm². Les cellules ont ensuite été mises en culture dans de l' α MEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest®) et 0,1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, Cat N° 15140-122, Gibco®). Les cellules ont été ensuite mises à l'étuve (37°C, 89% d'humidité, 5% de CO₂). Le milieu de culture a été changé tous les quatre jours, permettant ainsi l'élimination des cellules non adhérentes. Au onzième jour de culture, les HBMSCs ont été obtenues (*Figure 15*).

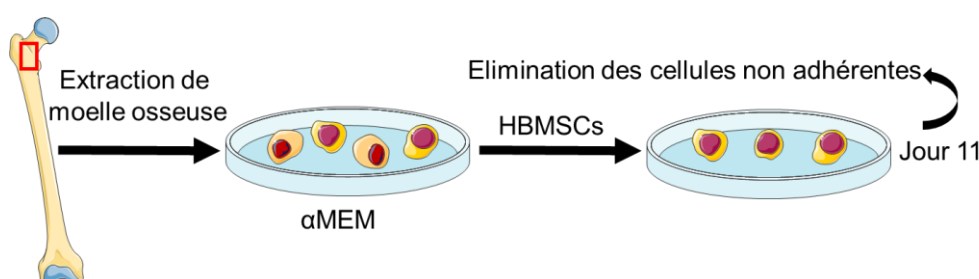


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'isolement des HBMSCs à partir de moelle osseuse humaine.

4.2.3. L'isolement des cellules mononucléées à partir du sang de cordon ombilical humain et cultures primaires des ostéoclastes et des cellules progénitrices endothéliales

Les ostéoclastes et les cellules progénitrices endothéliales (utilisées comme modèle de cellules endothéliales) ont été obtenus à partir de la différenciation de cellules mononucléées (CMNs) de sang de cordon ombilical humain. Le sang de cordon ombilical humain a été récupéré auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Bordeaux (convention CPIS 14.14).

Après dilution à moitié dans du “phosphate buffered saline-ethylene diamine tetra acetic acid” à 2mM (PBS 1X-EDTA, Cat N° 14190-094, Gibco® ; Cat N° E6758, Sigma Aldrich®), le sang a été déposé sur un liquide de séparation (Histopaque, Cat N°10771, Sigma Aldrich®) pour réaliser un gradient de densité permettant de séparer les différents types cellulaires. Les tubes ont été centrifugés (1600 rpm, 30 minutes, 20°C, sans le frein), les anneaux de CMNs récupérés, regroupés deux par deux dans des tubes puis complétés avec du PBS 1X-EDTA à 2 mM. Après une seconde centrifugation (1200 rpm, 10 minutes, 20°C, avec le frein), l’ensemble des anneaux de CMNs a été regroupé dans un seul tube qui a été complété avec du PBS 1X-EDTA à 2 mM. Après une dernière centrifugation (1200 rpm, 10 minutes, 20°C, avec le frein), les CMNs ont été mises en suspension dans le milieu de culture. Après une dilution des CMNs au 1/20^{ème} dans de l’acide acétique dilué au 1/35^{ème} pour hémolyser les globules rouges, une numération cellulaire sur cellule de Malassez a été effectuée.

Pour obtenir les cellules ostéoclastiques (OCs), les CMNs ont étéensemencées à J0 à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules/cm² dans des plaques 24 puits. Dans les conditions contrôles, les CMNs ont été mises en culture et différenciées en présence d’ α MEM complété avec 10% de SVF et 0,1% d’antibiotiques. Les cellules ont été ensuite mises à l’étuve (37°C, 89% d’humidité, 5% de CO₂). Le milieu de culture a été changé à J1 puis tous les deux jours, permettant ainsi l’élimination des cellules non adhérentes. Le milieu de culture a été complété avec de l’acide ascorbique et des facteurs de différenciation ostéoclastique M-CSF (Cat N° 216-MC-025, R&D Systems®) et RANK-L (Cat N° B90-TN/CF, R&D Systems®) à des concentrations respectives de 50 μ g/ml, 10 ng/ml et 50 ng/ml. Au onzième jour de culture, les ostéoclastes ont été obtenus (*Figure 16*).

Pour obtenir les “progenitor endothelial cells” (PECs), les puits de culture ont été préalablement recouverts avec du collagène de type I (500 μ l/puits, 15 minutes, température ambiante). Les CMNs ont étéensemencées à J0 à raison de 20×10^6 cellules/puits dans des plaques 12 puits. Les cellules ont été mises en culture et différenciées en présence d’EGM-2MV complété avec 5% de SVF et 0,1% d’antibiotiques. Les plaques ont été ensuite mises à l’étuve (37°C, 89% d’humidité, 5% de CO₂). Le milieu de culture a été changé à J1 puis tous les deux jours, permettant ainsi l’élimination des cellules non adhérentes. Au onzième jour de culture, les PECs (au passage 0) ont été obtenues (*Figure 16*).

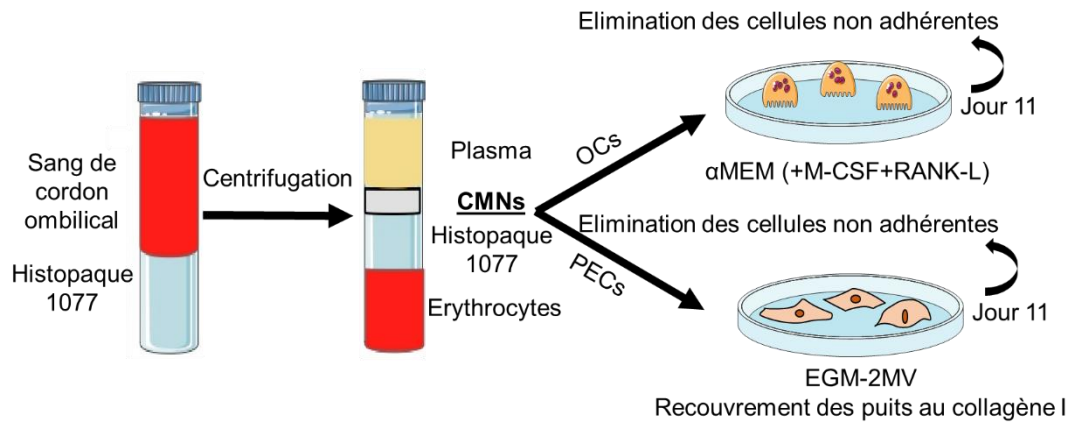


Figure 16 : Schéma récapitulatif des étapes pour la culture primaire des ostéoclastes et des cellules progénitrices endothéliales à partir de cellules mononucléées issues de sang de cordon ombilical.

4.2.4. L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux

Pour étudier la conservation des phénotypes, les “human bone marrow stromal cells” (HBMSCs) et les “progenitor endothelial cells” (PECs) ont été cultivées en mono- et en co-culture, soit en présence d'EGM2*/ α MEM (milieu testé), soit en présence d'EGM-2MV/ α MEM (milieu contrôle) (Figure 17). En mono-culture, les HBMSCs et les PECs ont été respectivement ensemencées à raison de 10×10^3 cellules/cm² et 20×10^3 cellules/cm². En co-culture, les HBMSCs et les PECs ont été respectivement ensemencées à raison de 5×10^3 cellules/cm² et 10×10^3 cellules/cm², soit un ratio de 1:2. Les PECs utilisées étaient au passage 7. Après 3 et 7 jours de culture, les cellules ostéoblastiques et les PECs ont été respectivement caractérisées par une coloration de la phosphatase alcaline et par des immunomarquages du facteur de von Willebrand, du CD-31 et de la VE-cadhérine. La minéralisation de la matrice extracellulaire a été observée par une coloration de Von Kossa après 10 jours de culture.

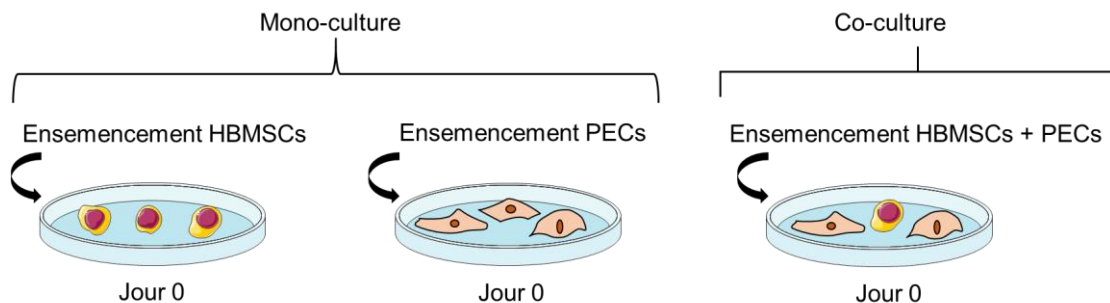


Figure 17 : Schéma des différentes conditions de culture pour l'étude de l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux.

4.2.4.1. La coloration de la phosphatase alcaline

La coloration de la phosphatase alcaline (PAL) colore en bleu cette protéine enzymatique qui est sécrétée par les ostéoblastes et présente dans la matrice extracellulaire.

Pour cette coloration, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X puis fixées avec du citrate acétone pendant 30 secondes à température ambiante. Après, un rinçage à l'eau du robinet de 20 secondes, un séchage a été réalisé pendant 15 minutes. Les cellules ont été ensuite incubées dans la solution de coloration (2 ml de "fast blue" pour 83 µl de naphthol), pendant 30 minutes, à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après un rinçage à l'eau du robinet et une incubation dans la solution d'hématoxyline de Mayer pendant 10 minutes, un rinçage à l'eau distillée a été réalisé pendant 3 minutes. La coloration a été ensuite observée en microscopie photonique (Leica® DMI3000 B).

4.2.4.2. La coloration de Von Kossa

La coloration de Von Kossa met en évidence la minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC). Les dépôts minéralisés de phosphate et la MEC non minéralisée sont respectivement colorés en noir et en jaune.

Pour cette coloration, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 20 minutes à 4°C. Ensuite, pour éliminer le PFA, 3 rinçages à l'eau distillée ont été effectués. Les cellules ont été ensuite incubées dans une solution de nitrate d'argent, pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après un rinçage à l'eau distillée et une incubation dans une solution de carbonate de sodium (pendant 2 minutes à température ambiante), un dernier rinçage à l'eau distillée a été réalisé. La coloration a été ensuite observée en microscopie photonique.

4.2.4.3. Les immunofluorescences *in situ*

Des immunofluorescences *in situ* ont été réalisées pour mettre en évidence la présence de trois marqueurs endothéliaux : le facteur de von Willebrand (vWF, marqueur intra vésiculaire), le CD-31 (marqueur membranaire) et la VE-cadhérine (VE-cad, marqueur de jonctions entre cellules endothéliales).

Pour ces immunofluorescences *in situ*, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et fixées avec du PFA 4% pendant 20 minutes, à 4°C. Les cellules ont été ensuite perméabilisées à froid avec du Triton 0,1% pendant 5 minutes, puis rincées avec du PBS 1X.

Les sites peptidiques aspécifiques des cellules ont alors été saturés avec du “phosphate buffered saline-bovine serum albumin” (PBS-BSA) 1% pendant 60 minutes à température ambiante, puis rincés avec du PBS 1X. Pour chacun des marqueurs, l’anticorps primaire respectif et le tampon de saturation ont été ajoutés (*Tableau 1*). L’ensemble a été incubé pendant 90 minutes à température ambiante. Après deux rinçages avec du PBS 1X, l’anticorps secondaire et le tampon de saturation ont été ajoutés (*Tableau 1*). L’ensemble a été incubé pendant 60 minutes à température ambiante à l’abri de la lumière. Après deux rinçages avec du PBS 1X, les noyaux des cellules ont été mis en évidence par le marquage DAPI (4’ 6’-diamidino-2-phénylindole au 1/35000^{ème} dans du PBS 1X, Cat N° E6758, Invitrogen®). Les cellules ont alors été rincées avec du PBS 1X puis observées en microscopie à fluorescence (Leica® DMI3000 B).

Marqueurs recherchés	Anticorps primaires et tampons de saturation	Anticorps secondaires et tampons de saturation
vWF	Anticorps de lapin anti humain dilué au 1/500 ^{ème} (Cat N° A0082, DAKO®) dans du PBS-BSA 0,5%	Anticorps anti lapin dilué au 1/250 ^{ème} (Cat N° A11008, DAKO®) dans du PBS-BSA 0,5%
CD-31	Anticorps de souris anti humain dilué au 1/250 ^{ème} (Cat N° 14-039-82, E Biosciences®) dans du PBS-BSA 0,5%	Anticorps anti souris dilué au 1/250 ^{ème} (Cat N° A11029, DAKO®) dans du PBS-BSA 0,5%
VE-cad	Anticorps de souris anti humain dilué au 1/250 ^{ème} (Cat N° 555661, BD Biosciences®) dans du PBS-BSA 1%	Anticorps anti souris dilué au 1/250 ^{ème} (Cat N° A11029, DAKO®) dans du PBS-BSA 0,5%

Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages du facteur de von Willebrand, du CD-31 et de la VE-cadhérine.

4.2.5. L’effet de l’EGM2*/ α MEM sur l’activité ostéoclastique

Pour savoir si le milieu EGM2*/ α MEM avait un effet sur l’activité ostéoclastique, des cellules mononucléées (CMNs) ont été différenciées en ostéoclastes sur des pastilles de phosphate de calcium (CaP, pastilles denses composées à 60% d’hydroxyapatite et de 40% de béta tricalcium phosphate, Biomatlante®) soit en présence d’EGM2*/ α MEM (milieu testé), soit en présence d’ α MEM (milieu contrôle) (*Figure 18*).

Après 11 jours de culture, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et fixées avec du PFA 4% pendant 20 minutes à 4°C. Les pastilles ont été ensuite rincées avec de l'hypochlorite de sodium à 2,6% et brossées avec une brosse à dents pour enlever les cellules. Les pastilles ont ensuite été déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes pendant 5 minutes pour chaque bain (30%, 50%, 70%, 80%, 90% et 100% deux fois). Les échantillons ont été ensuite immergés pendant 3 minutes dans une solution pure d'hexamethyldisilazane (Cat N° L16519, Alfa Aesar®), puis mis à sécher dans une étuve à 30°C pendant 24 heures. Après métallisation (emscope® sc-500), les pastilles ont été observées en microscopie électronique à balayage (MEB, Hitachi® S-2500). Pour les deux conditions, nous disposions de trois pastilles. En MEB, 15 photographies ont été prises par pastille. Les surfaces résorbées ont été mesurées par analyse d'images (Image J, NIH) à partir des clichés obtenus en MEB.

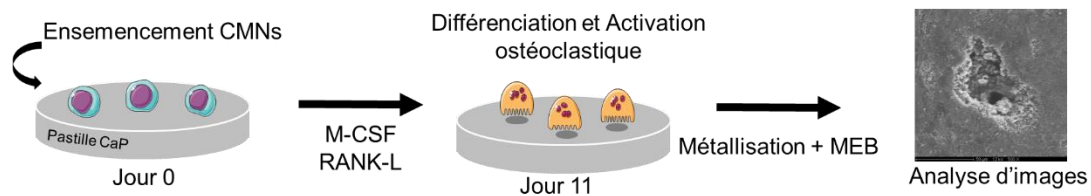


Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes étapes pour étudier l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique.

4.2.6. La mise en place d'un modèle unique de tri-culture

Grâce aux résultats des expériences précédentes, nous avons pu mettre en place un modèle de tri-culture. Les “human bone marrow stromal cells” (HBMSCs), les cellules mononucléées (CMNs) et les “progenitor endothelial cells” (PECs) étaient cultivées en présence d'EGM2*/ α MEM, soit en contact direct (tous les types cellulaires ensemble dans le puits de culture), soit en contact indirect (les CMNs étaient ensemencées dans le puits de culture et les HBMSCs ainsi que les PECs étaient ensemencées sur un insert, les séparant ainsi par une membrane semi-perméable). En contact direct, les HBMSCs, les CMNs et les PECs (au passage 8) ont été respectivement ensemencées à raison de 5×10^3 cellules/cm², $1,5 \times 10^6$ cellules/cm² et 10×10^3 cellules/cm². En contact indirect, les densités d'ensemencement étaient identiques à celles du contact direct. Les quantités d'HBMSCs et de PECs ont été calculées en fonction de la surface de l'insert de culture qui est de 33 mm².

Après 11 jours de culture, les cellules ostéoblastiques et les cellules ostéoclastiques ont été respectivement caractérisées par une coloration de la PAL et une coloration de la TRAP (*Figure 19*).

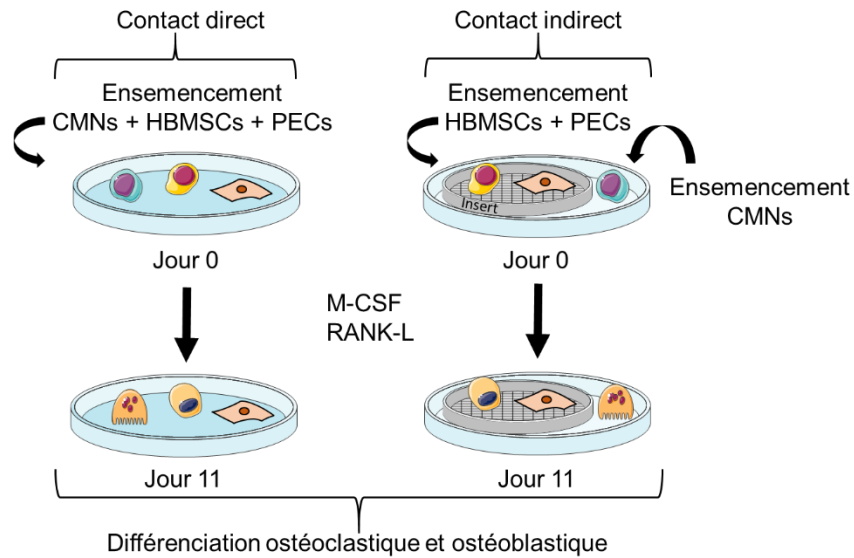


Figure 19 : Schéma des deux conditions de culture mises en place dans l'établissement du modèle de tri-culture.

Pour vérifier la capacité de résorption des cellules ostéoclastiques, un modèle de tri-culture en contact direct a été également réalisé sur des pastilles de phosphate de calcium (CaP) (*Figure 20*).

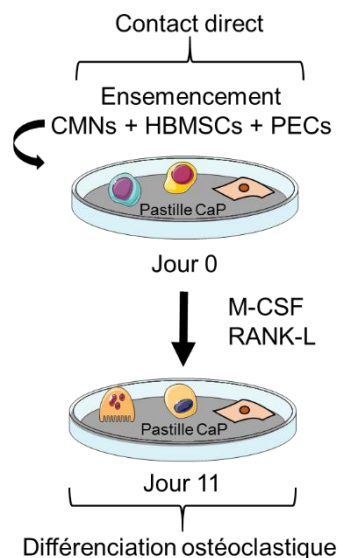


Figure 20 : Schéma du modèle de tri-culture en contact direct permettant la quantification de la surface de résorption ostéoclastique.

4.2.6.1. La coloration de la tartrate résistante acide phosphatase

La coloration de la TRAP colore en violet la “tartrate-resistant acid phosphatase”.

Pour la coloration de la TRAP, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% pendant 20 minutes à 4°C. La solution de coloration a été préparée selon les indications du fournisseur (Cat N° 387A-1KT, Sigma Aldrich®). Les cellules ont été incubées à l'étuve (37°C, 89% d'humidité, 5% CO₂) pendant 45 minutes en présence de la solution de coloration. Après trois rinçages à l'eau distillée, les cellules ont été observées en microscopie photonique.

4.2.6.2. La coloration de la phosphatase alcaline

(Voir protocole page 30)

4.2.6.3. La quantification de la surface de résorption ostéoclastique en contact direct

(Voir protocole page 31)

4.2.7. Les analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme d'images ou de moyenne \pm écart-type, où le « n » indique le nombre d'expériences indépendantes. La comparaison statistique a été évaluée par un t-test. La différence a été considérée comme statistiquement significative si $p < 0,05$.

En tri-culture, la quantification de la surface de résorption ostéoclastique en contact direct été réalisée une fois en *triplicat*. Toutes les autres expériences ont été réalisées trois fois en *triplicat*.

4.3. Résultats

4.3.1. L'effet de l'EGM2/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux*

Après 3 et 7 jours de culture, le marqueur ostéoblastique précoce (la phosphatase alcaline (PAL)) et les marqueurs endothéliaux (le facteur de von Willebrand (vWF), le CD-31 et la VE-cadhérine (VE-cad)), étaient exprimés similairement en présence des deux milieux de culture (EGM2*/ α MEM et EGM-2MV/ α MEM), que ce soit en mono- ou en co-culture. Les “progenitor endothelial cells” (PECs) présentaient un aspect pavimenteux et les cellules ostéoblastiques (OBs) un aspect en nodule (résultats non présentés). De la même façon, pour la coloration de Von Kossa, nous n'avons pas observé de différence qualitative entre les deux conditions de culture. Ces résultats montrent que le milieu de culture EGM2*/ α MEM préserve les phénotypes des deux types cellulaires par rapport au milieu de culture contrôle (EGM-2MV/ α MEM) (*Figures 21 et 22*).

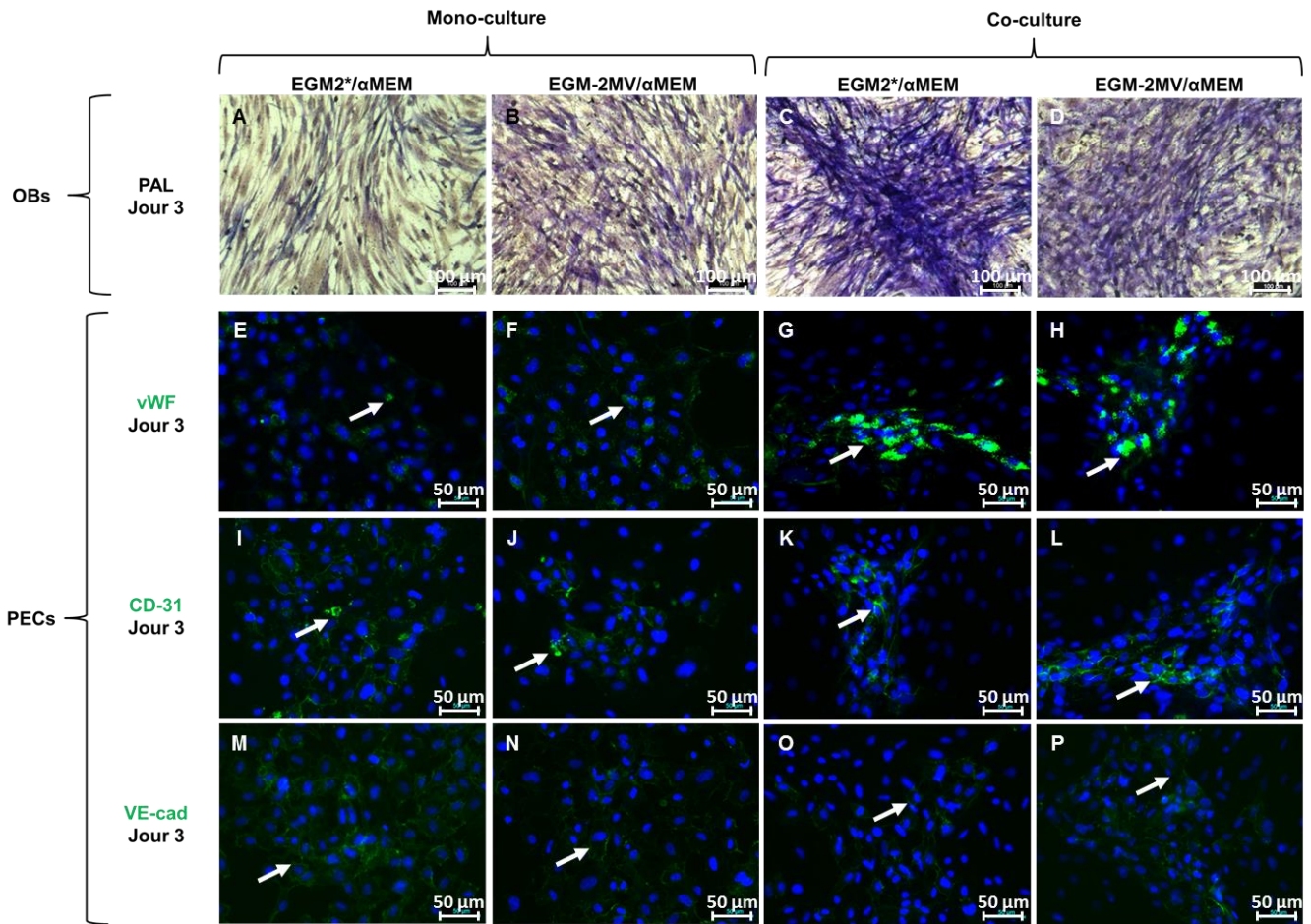


Figure 21 : Les phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux sont conservés en présence d'EGM2*/αMEM après 3 jours de culture.

A, B, C et D sont des images représentatives de la coloration de la PAL de cellules ostéoblastiques obtenues à partir d'HBMSCs cultivées pendant 3 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (A) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (B), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (C) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (D). E, F, G et H sont des images représentatives des immunomarquages du vWF de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 3 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (E) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (F), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (G) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (H). I, J, K et L sont des images représentatives des immunomarquages du CD-31 de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 3 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (I) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (J), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (K) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (L). M, N, O et P sont des images représentatives des immunomarquages de la VE-cad de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 3 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (M) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (N), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (O) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (P).

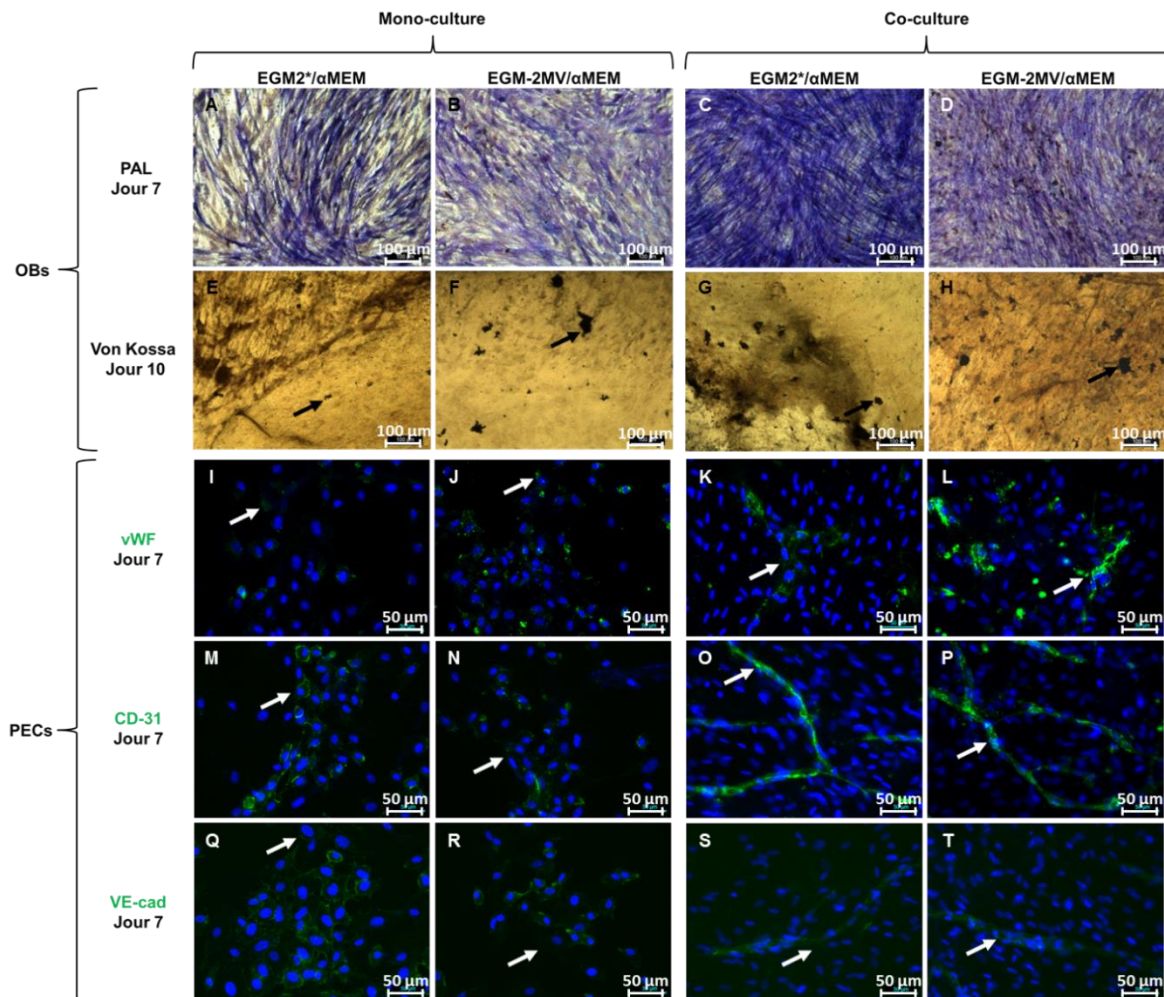


Figure 22 : Les phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux sont conservés en présence d'EGM2*/αMEM après 7 et 10 jours de culture.

A, B, C et D sont des images représentatives de la coloration de la PAL de cellules ostéoblastiques obtenues à partir d'HBMSCs cultivées pendant 7 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (A) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (B), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (C) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (D). E, F, G et H sont des images représentatives de la coloration de Von Kossa de cellules ostéoblastiques obtenues à partir d'HBMSCs cultivées pendant 10 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (E) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (F), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (G) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (H). I, J, K et L sont des images représentatives des immunomarquages du vWF de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 7 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (I) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (J), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (K) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (L). M, N, O et P sont des images représentatives des immunomarquages du CD-31 de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 7 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (M) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (N), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (O) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (P). Q, R, S et T sont des images représentatives des immunomarquages de la VE-cad de cellules progénitrices endothéliales obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 7 jours, en mono-culture en présence d'EGM2*/αMEM (Q) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (R), en co-culture en présence d'EGM2*/αMEM (S) ou en présence d'EGM-2MV/αMEM (T).

4.3.2. L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur l'activité ostéoclastique

Après 11 jours de culture sur des pastilles de phosphate de calcium, l'activité de résorption des cellules ostéoclastiques a été analysée. Aucune différence significative n'a été mesurée pour la surface résorbée par des cellules ostéoclastiques cultivées en présence d'EGM2*/ α MEM ou en présence d' α MEM. Ce résultat indique que le milieu de culture EGM2*/ α MEM n'influe pas sur l'activité de résorption ostéoclastique (Figure 23).

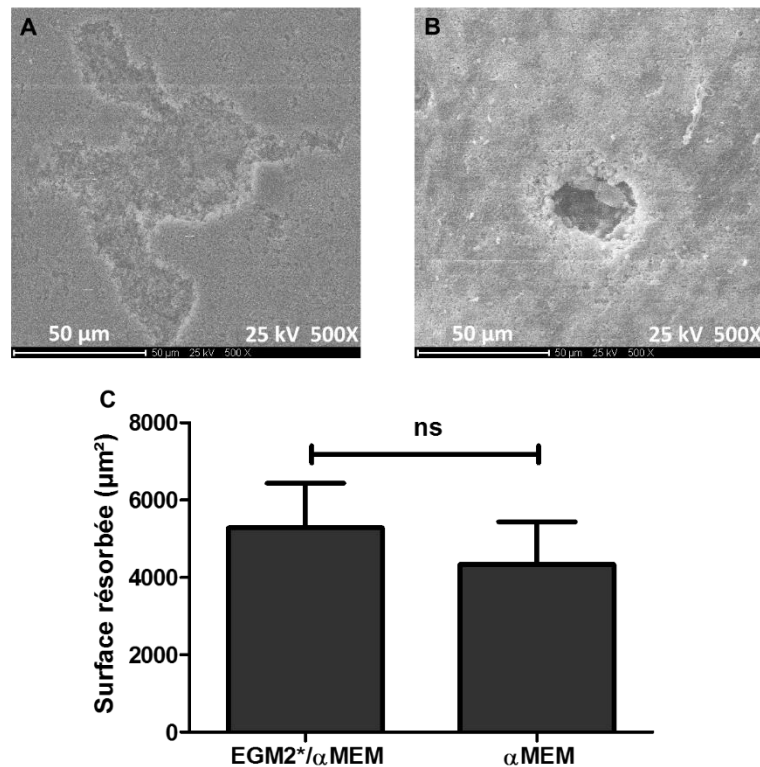


Figure 23 : L'activité de résorption ostéoclastique n'est pas modifiée par l'EGM2*/ α MEM.

A et B sont des images représentatives de la résorption réalisée par des cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain et cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EGM2*/ α MEM (A) ou dans le milieu de culture α MEM (B). C est un graphique représentatif de la quantification de surface de résorption réalisée par des cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain et cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, en présence d'EGM2*/ α MEM (milieu testé) ou en présence d' α MEM (milieu contrôle). La surface résorbée moyenne par champ a été calculée, pour chacune des deux conditions. Les données sont présentées comme la moyenne \pm l'écart-type ; n = 3 expériences indépendantes. La comparaison statistique a été évaluée par t-test.

4.3.3. La mise en place d'un modèle de tri-culture

4.3.3.1. *La coloration de la tartrate résistante acide phosphatase et la coloration de la phosphatase alcaline*

Grâce aux résultats précédents, nous avons pu mettre en place un modèle de tri-culture. Après 11 jours de culture, des cellules ostéoclastiques (cellules positives pour la coloration de la TRAP) et des cellules ostéoblastiques (cellules positives pour la coloration de la PAL) ont été observées dans les deux conditions de culture testées (contact direct et contact indirect). Bien que les cellules progénitrices endothéliales n'aient pas pu être mises en évidence après 11 jours de culture, le milieu de culture EGM2*/ α MEM semble être un milieu adéquat pour la tri-culture (cellules ostéoblastiques, cellules ostéoclastiques, cellules progénitrices endothéliales). D'une manière intéressante, nous avons également observé que l'ostéoclastogenèse semblait augmenter en contact indirect (*Figure 24*).

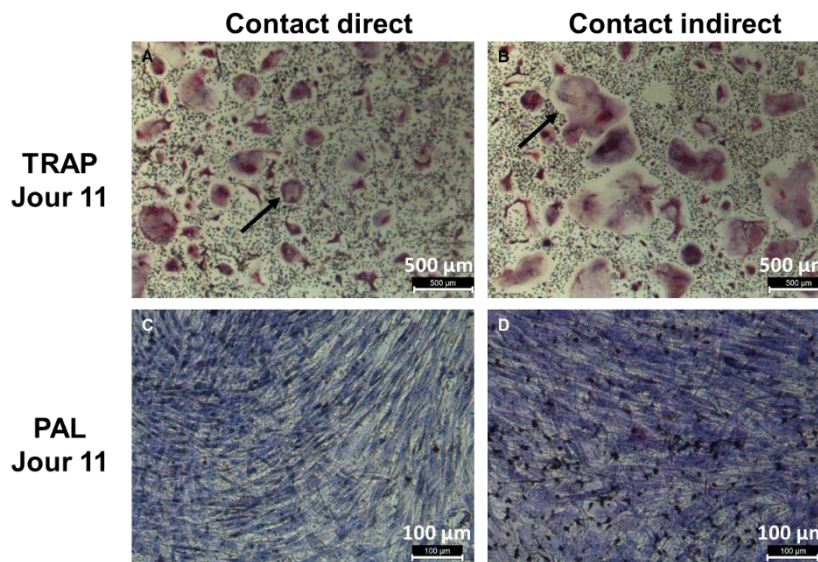


Figure 24 : Les caractéristiques des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques sont mises en évidence dans le modèle de tri-culture.

A et B sont des images représentatives de la coloration de la TRAP de cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EGM2*/ α MEM, en contact direct (A) ou en contact indirect (B) avec des cellules ostéoblastiques et des cellules progénitrices endothéliales. C et D sont des images représentatives de la coloration de la PAL de cellules ostéoblastiques obtenues à partir d'HBMSCs cultivées pendant 11 jours en présence d'EGM2*/ α MEM, en contact direct (C) ou en contact indirect (D) avec des cellules ostéoclastiques et des progénitrices endothéliales.

4.3.3.2. La quantification de la surface de résorption ostéoclastique en contact direct

Après 11 jours de culture, en contact direct, sur des pastilles de phosphate de calcium, l'activité de résorption des cellules ostéoclastiques a été observée et quantifiée en microscopie électronique à balayage. L'expérience réalisée tend à montrer que la surface moyenne résorbée en tri-culture ($4402 \pm 2863 \mu\text{m}^2$) n'est pas significativement différente de celle obtenue en mono-culture ($5286 \pm 2966 \mu\text{m}^2$) (Figure 25).

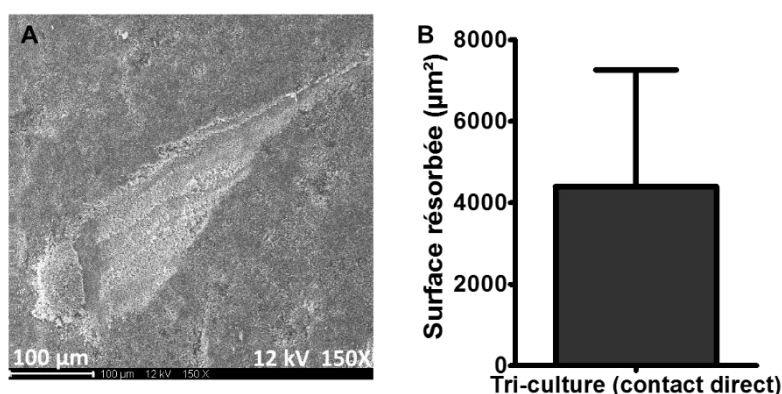


Figure 25 : La résorption ostéoclastique a été quantifiée en contact direct.

A est une image représentative de la résorption réalisée par des cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EGM2*/αMEM, en contact direct avec des cellules ostéoblastiques et des cellules progénitrices endothéliales. B est un graphique représentatif de la résorption réalisée par des cellules ostéoclastiques obtenues à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain cultivées pendant 11 jours en présence de 10 ng/ml de M-CSF, de 50 ng/ml de RANK-L, dans le milieu de culture EGM2*/αMEM, en contact direct avec des cellules ostéoblastiques et des cellules progénitrices endothéliales. La surface résorbée moyenne par champ a été calculée en contact direct. Les données sont présentées comme la moyenne \pm l'écart-type ; expérience réalisée une fois en *triplicat*.

4.4. Discussion

Au cours de ce projet, nous avons montré que l'EGM2*/ α MEM était un milieu adéquat pour la co-culture entre les cellules ostéoblastiques et les "progenitor endothelial cells" (PECs) ainsi que pour la tri-culture entre les cellules ostéoblastiques, les cellules ostéoclastiques et les PECs.

Concernant le modèle de cellules ostéoblastiques que nous avons utilisé lors de ces expériences, des "human bone marrow stromal cells" (HBMSCs) obtenues à partir de moelle osseuse humaine étaient ensemencées à J0. Au onzième jour de culture, les cellules présentaient un phénotype ostéoblastique par l'expression de la phosphatase alcaline (PAL), marqueur ostéoblastique précoce, et par la présence de précipités contenant du phosphate mis en évidence par la coloration de Von Kossa, marqueur ostéoblastique tardif. Ces résultats sont identiques à ceux observés dans la littérature [22].

D'après les données de la littérature, les ostéoclastes peuvent être caractérisés par les huit critères suivants : (1) cellules géantes, (2) multinucléées, (3) positives pour la coloration de la TRAP (4) positives pour la vinculine, (5) présence de l'anneau d'actine, (6) présence de vésicules d'acidification, (7) présence du récepteur à la calcitonine et (8) présence d'une activité de résorption [23]. Les cellules obtenues présentaient 3 des 8 critères précédemment cités. En effet, après 11 jours de culture, les cellules étaient géantes, multinucléées, positives pour la coloration de la TRAP et capables de résorption. Elles ont donc pu être qualifiées de cellules ostéoclastiques.

Dans ces mêmes expériences, les PECs ont été utilisées comme modèle de cellules endothéliales. Ces précurseurs, engagés dans la lignée endothéliale, ont été mis en évidence chez l'adulte par Asahara *et al.* en 1997 [24]. Ils peuvent être isolés à partir de différents tissus : la moelle osseuse, le sang périphérique, le tissu adipeux/musculaire/nerveux ainsi que le sang de cordon ombilical [25]. Nous avons choisi d'isoler les PECs à partir de sang de cordon ombilical. En effet, cette source fournit sept fois plus de PECs que le sang périphérique [26]. L'isolement et la culture des PECs ont été effectués selon le protocole décrit par Thébaud *et al* [27]. Au troisième et au septième jour de culture, les cellules présentaient un phénotype endothélial par l'expression du facteur de von Willebrand (vWF), du CD-31 et de la VE-cadhérine (VE-cad). Ces résultats sont identiques à ceux observés dans la littérature [22].

Le milieu de culture cellulaire, EGM2*/ α MEM, est composé à volumes égaux d' α MEM et d'EGM2*, où l'EGM2* correspond à de l'EGM-2MV sans en acide ascorbique ni hydrocortisone. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent, qu'à haute concentration, l'acide ascorbique et l'hydrocortisone inhibent la différenciation ostéoclastique [28,29].

4.4.1. L'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux

Il a été montré, dans la littérature, que pour les co-cultures entre des HBMSCs et des PECs, le ratio optimal était de 1:2 [21]. Nous avons donc utilisé ce ratio dans ces expériences.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes ostéoblastiques montrent que les cellules obtenues après 3 et 7 jours de culture en présence d'EGM2*/ α MEM (condition testée) et d'EGM-2MV/ α MEM (condition contrôle) expriment la PAL. Cette expression, au septième jour de culture, est cohérente avec une différenciation de nos HBMSCs en ostéoblastes précoces [21]. Les cellules obtenues après 10 jours de culture en présence d'EGM2*/ α MEM et d'EGM-2MV/ α MEM sont positives pour la coloration de Von Kossa. Cette observation, au dixième jour de culture est cohérente avec une différenciation de nos HBMSCs en ostéoblastes matures [21].

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'effet de l'EGM2*/ α MEM sur la conservation des phénotypes endothéliaux montrent que les cellules obtenues, après 3 et 7 jours de culture en présence d'EGM2*/ α MEM (condition testée) et d'EGM-2MV/ α MEM (condition contrôle), expriment le vWF, le CD-31 et la VE-cad. Cette expression est en accord avec les données de la littérature [21].

Les résultats obtenus ayant montré une conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux dans l'EGM2*/ α MEM, une quantification de l'activité de la PAL ainsi que de la cytométrie en flux sont envisagées afin de déterminer le pourcentage des populations cellulaires présentes et exprimant, ou non, chaque marqueur étudié. L'expression concomitante des trois marqueurs endothéliaux (facteur de von Willebrand, CD-31, VE-cadhérine) par les PECs ainsi que l'évolution temporelle de cette expression pourront, également, être vérifiées.

En co-culture, nous avons observé une coloration de la PAL plus intense qu'en monoculture ainsi que la formation de structures tubulaires par les cellules endothéliales. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature [21]. En effet, en co-culture, il existe une co-stimulation entre cellules ostéoblastiques et endothéliales.

Les cellules endothéliales stimulent les cellules ostéoblastiques en produisant notamment de la BMP-2. Les cellules ostéoblastiques produisent alors du VEGF qui stimule, en retour, les cellules endothéliales [18].

Les données de la littérature montrent que les comportements cellulaires diffèrent entre les modèles de culture en deux ou trois dimensions. En effet, en trois dimensions, en monoculture, les HBMSCs forment des agrégats alors qu'en co-culture avec des PECs, ces mêmes agrégats d'HBMSCs sont entourés par un anneau de PECs [30]. Bien qu'aucun effet n'ait été observé lors des cultures en deux dimensions entre le milieu de culture EGM2*/ α MEM et le milieu de culture EGM-2MV/ α MEM, il serait intéressant de vérifier que l'EGM2*/ α MEM n'a pas d'effet sur le comportement des cellules ostéoblastiques et endothéliales, en mono- et en co-culture, dans un environnement tridimensionnel.

Enfin, il est important de souligner que notre technique d'ensemencement ne permettait pas de contrôler de l'organisation spatiale des HBMSCs et des PECs. Cette limite pourrait être palliée par la bioimpression assistée par laser. Cette technique innovante permet d'imprimer plusieurs types cellulaires tout en contrôlant leur disposition spatiale. Ainsi au laboratoire, des bioimpressions de HBMSCs et de "human umbilical vein endothelial cells" (HUVECs) ont été réalisées (données non publiées).

4.4.2. L'effet de l'EGM2/ α MEM sur l'activité ostéoclastique*

Au cours de ces expériences, nous avons évalué l'activité ostéoclastique en mesurant la surface résorbée par les cellules ostéoclastiques sur des pastilles de phosphate de calcium.

Le milieu de culture EGM2*/ α MEM contient de l'acide ascorbique dans la proportion du volume d' α MEM uniquement. Dans une étude précédente, nous avons montré que la différenciation ostéoclastique était inhibée en présence de l'acide ascorbique contenu dans l'EGM-2MV. L'acide ascorbique présent dans le milieu de culture EGM2*/ α MEM ne provient que de la proportion volumique d' α MEM (50%) et est donc deux fois moins concentré que dans les cultures en présence du milieu EGM-2MV uniquement.

Parmi les différents matériaux utilisés pour étudier la résorption osseuse *in vitro*, les coupes de dentine constituent une matrice de premier choix. En effet, elles comportent, comme l'os, une fraction organique et une fraction minérale. Le volume résorbé peut donc être quantifié en mesurant les quantités de collagène et calcium relarguées [31]. Leur surface est également plus homogène, ce qui diminue les artefacts dus à l'hétérogénéité de la surface des pastilles synthétiques [23]. Il semblerait donc intéressant de confirmer nos résultats en utilisant ces substrats.

Grimandi *et al.* ont montré que, lors d'expériences impliquant l'apparition du phénomène de résorption ostéoclastique, cette activité commençait en périphérie de la pastille. Dans le cas de cultures cellulaires de courte durée, elle est donc hétérogène et doit être évaluée en considérant l'intégralité de la surface de la pastille [23].

Nos cellules ostéoclastiques ayant été cultivées pendant 11 jours, nous avons pu considérer que la résorption ostéoclastique était homogène et pouvait être évaluée à partir d'un nombre suffisant d'images (n=45 par condition).

La surface de résorption ostéoclastique peut également être mesurée par une coloration des puits de résorption au bleu de toluidine et une observation en microscopie photonique couplée à une analyse d'images [23,31]. Cependant, la résorption ostéoclastique étant parfois peu marquée et non détectable en microscopie photonique, l'observation en microscopie électronique à balayage reste donc une méthode plus fiable [23]. Par ailleurs, contrairement au comptage du nombre de puits, la mesure de la surface résorbée est un critère fiable qui ne varie pas en fonction du grossissement [23].

Grâce à des programmes informatiques adaptés, la mesure de surface peut être semi-automatisée (proposition par le programme et validation par l'opérateur) et ceci permet d'améliorer l'objectivité des mesures [23]. La variation importante des niveaux de gris entre les images obtenues en microscopie électronique à balayage, a rendu impossible l'utilisation de ces programmes. Nos mesures ont donc été effectuées manuellement et par un seul opérateur.

Des techniques de profilométrie permettent de mesurer la profondeur du puits de résorption ostéoclastique et donc de quantifier le volume résorbé [31].

Il semblerait donc intéressant de confirmer nos observations avec des analyses complémentaires permettant de prendre en compte non seulement la surface résorbée mais également le volume des puits de résorption ostéoclastique.

Bien qu'il n'y ait pas de différence significative pour la surface résorbée, une augmentation non significative est observée dans la condition EGM2*/ α MEM par rapport à la condition α MEM. Cette tendance pourrait s'expliquer par la présence de facteurs pro ostéoclastiques (comme le VEGF) dans l'EGM2*.

En effet, comme les cellules endothéliales et les cellules ostéoclastiques auraient la même origine hématopoïétique, elles présentent des récepteurs communs à leur surface. Les données de la littérature ont ainsi montré que le VEGF favorisait l'ostéoclastogenèse [19].

4.4.3. La Mise en place d'un modèle de tri-culture

Le diamètre des pores de la membrane de l'insert utilisé lors de la tri-culture en contact indirect mesurait 1 μ m (données fournies par Greiner bio-one®) alors que les diamètres des cellules ostéoblastiques et des cellules progénitrices endothéliales étaient respectivement d'environ 20 μ m et 10 μ m [1]. Les cellules ne pouvaient donc pas passer théoriquement à travers les pores. Les facteurs sécrétés pouvaient, néanmoins, diffuser librement entre les deux compartiments. Un contact indirect entre les cellules ostéoclastiques d'une part, et les cellules ostéoblastiques et les cellules progénitrices endothéliales d'autre part, était ainsi possible. Jusqu'à 7 jours de culture, la présence des HBMSCs et des PECs dans l'insert de culture correspondait au modèle de co-culture que nous avons validé. En contact direct, les cellules ont été observées jusqu'au cinquième jour de culture (résultats non présentés). Cependant, dans les modèles de tri-culture, les PECs n'ont pas été caractérisées. Après 7 jours de culture, les données de la littérature montrent que les PECs cultivées avec des cellules ostéoblastiques disparaissent à cause d'une compétition favorable à ces dernières [21]. Dans nos modèles de culture, que ce soit en contact direct ou indirect, un phénomène similaire peut être envisagé. Cependant, le rôle des cellules ostéoclastiques dans cette compétition reste inconnu.

Comme nous souhaitions principalement mettre en évidence la capacité de résorption des cellules ostéoclastiques, la tri-culture a été arrêtée au onzième jour. Afin de caractériser les trois types cellulaires, il serait ainsi pertinent d'arrêter cette culture plus précocement, c'est à dire au septième jour. Cependant dans cette condition, l'activité de résorption ostéoclastique sera probablement moins homogène sur les matrices synthétiques.

D'autre part, l'augmentation de l'ostéoclastogenèse, en contact indirect, peut s'expliquer par deux phénomènes : soit par l'absence de compétition entre les cellules ostéoclastiques, d'une part, et les cellules endothéliales et ostéoblastiques, d'autre part (nombre de cellules très inférieur, absence de jonctions communicantes par rapport au contact direct) soit par la présence de facteurs diffusibles.

Une quantification de ce phénomène est prévue par un comptage du nombre d'ostéoclastes, ainsi que par mesure de la surface ostéoclastique, par comptage du nombre de noyaux et par détermination du rapport nucléo-cytoplasmique.

Après 11 jours de tri-culture en contact direct, bien que l'expérience n'ait pu être réalisée qu'une seule fois, l'activité de résorption des cellules ostéoclastiques ne semble pas être significativement différente de celle observée en mono-culture. Des expériences sont actuellement en cours afin de confirmer cette tendance.

Une des perspectives de ce modèle de tri-culture est la caractérisation plus précise de la communication entre cellules ostéoclastiques et endothéliales par l'étude des facteurs pouvant intervenir dans la modulation du comportement de ces deux types cellulaires.

Les modèles de tri-culture actuellement décrits dans la littérature sont basés sur (1) des associations de cellules ostéoblastiques et des cellules progénitrices endothéliales humaines associées avec des macrophages humains induits à partir de la lignée cellulaire THP-1 [32], (2) de cellules humaines de fraction stromale vasculaire et des cellules CD14+ issues du sang périphérique humain [33]. Le modèle de tri-culture que nous avons développé associe initialement des HBMSCs, des cellules mononucléées humaines et des PECs humaines. Après 11 jours de culture, il regroupe des cellules ostéoblastiques, des cellules ostéoclastiques et des cellules progénitrices endothéliales. Ce modèle est plus proche des conditions physiologiques que ceux précédemment évoqués. Il constitue donc un outil prometteur dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Enfin, il est important de noter que les ostéocytes constituent la population cellulaire majoritaire au sein du tissu osseux. La culture de ces cellules nécessitant des conditions spécifiques, ce modèle est maîtrisé par peu d'équipes de recherche et donc peu utilisé. Malgré cela, et toujours dans l'objectif de se rapprocher d'avantage des conditions physiologiques, il sera indispensable, dans le futur, d'envisager un modèle de quadri-culture incluant des ostéocytes.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des données obtenues au cours de ce projet de recherche nous a permis d'établir que le milieu de culture EGM2*/ α MEM permettait (1) la conservation des phénotypes ostéoblastiques et endothéliaux, (2) l'obtention d'ostéoclastes fonctionnels et (3) la mise en place d'un modèle unique de tri-culture. Ce milieu de culture constitue donc un outil prometteur en ingénierie tissulaire osseuse : (1) pour établir et comprendre les interactions entre les différentes populations cellulaires du tissu osseux et ainsi optimiser l'utilisation de ces cellules lors de la conception de produits d'ingénierie tissulaire osseuse et (2) pour permettre de comprendre si des molécules thérapeutiques, par exemple, peuvent avoir un effet (direct ou indirect) sur d'autres populations cellulaires en relation avec les cellules ciblées. Ces nouveaux outils que sont ce milieu de culture et ce système de tri-culture présentent donc un potentiel d'utilisation important dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse en ouvrant de nouvelles perspectives dans le domaine de l'étude de la communication cellulaire. Bien que son application en chirurgie maxillo-faciale soit encore marginale, l'ingénierie tissulaire osseuse s'inscrit dans une perspective d'avenir. En effet, la recherche a permis de nombreuses évolutions dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Lorimier S, Kemoun P. Histophysiologie du parodonte. *EMC - Médecine Buccale* 28-115-P-10 2012;7(6):1–23. doi:10.1016/S1877-7864(12)54751-8.
- [2] Zunzarren R, UFR d'odontologie de Bordeaux Segalen. Guide clinique d'odontologie. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2011.
- [3] Guerrero J. Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement mécanique et 3D : application à l'ingénierie du tissu osseux. n.d.
- [4] Lalande C. Développement d'un nouveau produit d'ingénierie tissulaire osseuse à base de polymères et de cellules souche du tissu adipeux. Bordeaux 2; 2011.
- [5] Bryon P-A. Anatomie et histologie de la moelle osseuse. [Httpwwwem-Premiumcomdocelec-Bordeauxfrdatatraitessa13-11277](http://www.em-premium.com/doc/elec/Bordeaux/fr/da/traite/ssa13-11277) n.d.
- [6] Aussel A. Méthodes de suivi des cellules souches dans le cadre de l'ingénierie tissulaire: évaluation expérimentale d'une méthode de fluorescence utilisant la protéine Td Tomato. 2012.
- [7] Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813–26. doi:10.1056/NEJMra052638.
- [8] Nefussi JR. Biologie de la réparation osseuse : technique d'augmentation du volume osseux implantable. *EMC Médecine Buccale* 28-815-M-02 2011.
- [9] Catros S, Guillemot F, Amédée J, Fricain J-C. Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques. *Médecine Buccale Chir Buccale* 2010;16:227–37. doi:10.1051/mcbcb/2010031.
- [10] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [11] Vinatier C, Bordenave L, Guicheux J, Amédée J. Les cellules souches en ingénierie des tissus ostéoarticulaires et vasculaires. *Médecine/sciences* 2011;27:289–96. doi:10.1051/medsci/2011273289.
- [12] Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat* 2008;213:66–72. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [13] Blitterswijk CA van. *Tissue engineering*. London: Academic; 2007.
- [14] Catros S. Etude de la Micro-Impression d'Eléments Biologiques par Laser pour l'Ingénierie du Tissu Osseux. Bordeaux 1; 2010.
- [15] Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized Bone Tissue Engineering: Approaches for Potential Improvement. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:363–82. doi:10.1089/ten.teb.2012.0012.
- [16] Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:201–9. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027.
- [17] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42. doi:10.1038/nature01658.
- [18] Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2009;27:562–71. doi:10.1016/j.tibtech.2009.07.001.
- [19] Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication?: VEGF AND BONE CELL SIGNALLING. *Cell Biochem Funct* 2013;31:1–11. doi:10.1002/cbf.2911.
- [20] Pang H, Wu X-H, Fu S-L, Luo F, Zhang Z-H, Hou T-Y, et al. Co-culture with endothelial progenitor cells promotes survival, migration, and differentiation of osteoclast precursors. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430:729–34. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.081.

- [21] Thébaud NB, Siadous R, Bareille R, Remy M, Daculsi R, Amédée J, et al. Whatever their differentiation status, human progenitor derived - or mature - endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6:e51–60. doi:10.1002/term.1539.
- [22] Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993;29A:699–707.
- [23] Grimandi G, Soueidan A, Anjrini AA, Badran Z, Pilet P, Daculsi G, et al. Quantitative and reliable in vitro method combining scanning electron microscopy and image analysis for the screening of osteotropic modulators. *Microsc Res Tech* 2006;69:606–12. doi:10.1002/jemt.20326.
- [24] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
- [25] Levenberg S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:516–23. doi:10.1016/j.copbio.2005.08.007.
- [26] Krawiec JT, Vorp DA. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials* 2012;33:3388–400. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.014.
- [27] Thebaud NB, Bareille R, Remy M, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4:473–84. doi:10.1002/term.261.
- [28] Hie M, Tsukamoto I. Vitamin C-deficiency stimulates osteoclastogenesis with an increase in RANK expression. *J Nutr Biochem* 2011;22:164–71. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.01.002.
- [29] Tobias J, Chambers TJ. Glucocorticoids impair bone resorptive activity and viability of osteoclasts disaggregated from neonatal rat long bones. *Endocrinology* 1989;125:1290–5. doi:10.1210/endo-125-3-1290.
- [30] Guerrero J, Catros S, Derkaoui S-M, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater* 2013;9:8200–13. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.025.
- [31] Pascaretti-Grizon F, Mabillean G, Basle MF, Chappard D. Measurement by vertical scanning profilometry of resorption volume and lacunae depth caused by osteoclasts on dentine slices: OPTICAL INTERFERENCE PROFILOMETRY AND OSTEOCLAST LACUNAE. *J Microsc* 2011;241:147–52. doi:10.1111/j.1365-2818.2010.03410.x.
- [32] Dohle E, Bischoff I, Böse T, Marsano A, Banfi A, Unger RE, et al. Macrophage-mediated angiogenic activation of outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2014;27:149–64; discussion 164–5.
- [33] Papadimitropoulos A, Scherberich A, Güven S, Theilgaard N, Crooijmans HJA, Santini F, et al. A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 2011;21:445–58; discussion 458.

Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, le Directeur de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Agathe Grémare

, Le 19 décembre 2014

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR en CHIRURGIE DENTAIRE – n°67

Discipline Sciences Biologiques

Développement d'un modèle original pour étudier la communication entre les cellules osseuses

Résumé

Les propriétés de cicatrisation de l'os alvéolaire sont parfois insuffisantes pour aboutir à une cicatrisation *ad integrum*. Le praticien doit alors avoir recours à des stratégies de régénération osseuse. Pour pallier leurs limites, l'ingénierie tissulaire semble être une solution. Elle applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques. Pour optimiser la viabilité et l'intégration du substitut osseux, une connaissance de la physiologie, en particulier des communications cellulaires existantes, est nécessaire. Au cours de ce travail de recherche nous avons évalué la capacité d'un milieu de culture à être utilisé dans un modèle de tri-culture de cellules primaires humaines associant des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules progénitrices endothéliales. Nos résultats montrent une conservation des phénotypes ostéoblastiques, et endothéliaux ainsi que l'obtention d'ostéoclastes fonctionnels. Ceci nous a permis d'établir un modèle unique de tri-culture. La validation de ce milieu de culture est donc un premier pas prometteur vers l'étude de la communication entre les cellules impliquées dans la régénération du tissu osseux et donc vers l'amélioration des outils utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.

Mots-clés

Ingénierie tissulaire – Communication cellulaire – Ostéoblastes – Ostéoclastes – Cellules progénitrices endothéliales – Tri-culture.

Development of an original model to investigate bone cell communication

Summary

The healing potential of alveolar bone is sometimes insufficient to achieve *ad integrum* regeneration. To overcome this limitation, surgeons have to resort to bone regeneration strategies among them, tissue engineering appears as a solution. It applies the principles of engineering and life sciences in order to develop biologic substitutes. To improve cell viability and integration of the bone substitute, the fundamental understanding of the physiology, particularly focusing on existent cellular communication, is crucial. In this work, we evaluated the applicability of a specific cell medium to a unique tri-culture model, composed of human primary cells, namely osteoblasts, osteoclasts and endothelial progenitor cells. Our results show that this medium was able to maintain both osteoblastic and endothelial cell phenotype and obtain functional osteoclasts. These results allowed us to establish a tri-culture model. The validation of this cell culture medium is the first step for the establishment of the conditions to study the communication between cells involved for bone regeneration. These studies will open new opportunities in the development of more efficient bone tissue engineering approaches.

Key-words

Tissue engineering – Cell communication – Osteoblasts – Osteoclasts – Endothelial progenitor cells – Tri-culture model.

Université de Bordeaux – Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques
16-20 Cours de la Marne
33082 BORDEAUX CEDEX