



HAL
open science

Étude de la différenciation des SCAPs en progéniteurs endothéliaux et de leur bioimpression assistée par laser

Sarah Sandrin

► **To cite this version:**

Sarah Sandrin. Étude de la différenciation des SCAPs en progéniteurs endothéliaux et de leur bioimpression assistée par laser. Chirurgie. 2015. dumas-01121714

HAL Id: dumas-01121714

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01121714>

Submitted on 2 Mar 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 2015

N°17

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

Présentée et soutenue publiquement
Par Sarah SANDRIN

Né(e) le 13/12/1988 à Montfermeil (93), France
Le 23 Février 2015

**Etude de la différenciation des SCAPs en progéniteurs
endothéliaux et de leur bioimpression assistée par laser**

Directeur de thèse

Docteur Noëlie-Brunehilde Thébaud

Membres du Jury

Président	M. Jean-Christophe Fricain	Professeur des Universités
Directeur	Mme Noëlie-Brunehilde Thébaud	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	M. Raphaël Devillard	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	M. Christophe Bou	Maître de Conférences des Universités

UNIVERSITE BORDEAUX

Président

M. Manuel TUNON de LARA

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

<i>Directrice</i>	Mme Caroline BERTRAND	58-02
<i>Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale</i>	Mme Dominique ORIEZ	58-01
<i>Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche</i>	M. Jean-Christophe FRICAIN	57-02
<i>Directeur Adjoint - Chargé des Relations Internationales</i>	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

M 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 Noélie	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 Elsa	GAROT	Odontologie Pédiatrique	56-01
M. Nicolas	GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Melle Sandrine	GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Melle Olivia	KEROUEDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
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
Mlle Marie	MEDIO	Orthopédie dento-faciale	56-02
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
Mlle Chloé	PELOURDE	Orthopédie Dento-faciale	56-02
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

22/01/2015

A Notre Président de Jury

Monsieur le Professeur Jean-Christophe FRICAIN

Professeur des Universités – Docteur d'état en Chirurgie dentaire

Section Chirurgie-buccale-pathologie et thérapeutique 57-02

Merci de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de cette thèse. Au cours de mes années universitaires, j'ai eu le grand plaisir d'assister à vos cours magistraux. Je retire de votre enseignement de riches connaissances, qui m'aideront dans ma pratique de futur chirurgien-dentiste. Veuillez trouver l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Notre Directeur de Thèse

Madame le Docteur Noëlie-Brunehilde THEBAUD

Maître de conférences des Universités - Docteur d'état en Chirurgie dentaire

Section Sciences biologiques 57-03

Je vous remercie d'avoir accepté la direction de cette thèse. Ces nombreux mois au sein du laboratoire de recherche INSERM ont été une expérience inoubliable. Je vous remercie de m'avoir fait connaître l'univers de la recherche. Merci également pour ces trois années hospitalo-universitaires passées à vos côtés à l'hôpital Saint-André. Je garderai un très bon souvenir des vacances de pédodontie le mercredi matin.

Je vous prie de trouver dans ce travail toute l'expression de ma gratitude.

A Notre Rapporteur

Monsieur le Docteur Raphaël DEVILLARD

Maître de conférences des Universités - Docteur d'état en Chirurgie dentaire

Section Odontologie conservatrice – Endodontie 58-01

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de collaborer à ce travail en tant que rapporteur.

Je vous remercie pour votre disponibilité et votre implication dans ce travail.

Nous n'avons malheureusement pas beaucoup eu l'occasion de travailler ensemble mais j'espère que ce travail de recherche vous a satisfait.

Je vous prie de trouver dans cette thèse une marque de profond respect et de reconnaissance.

A Notre Assesseur

A Monsieur le Docteur Christophe BOU

Maître de conférences des Universités - Docteur d'état en Chirurgie dentaire

Section Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale 56-03

Je vous prie d'accepter mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. J'ai eu l'heureux privilège d'être encadré par vos soins à l'hôpital Saint-André et je suis honorée de clôturer ce chapitre à vos côtés. Je garderai un très bon souvenir de ces vacances hospitalières passées avec vous. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre pédagogie, votre rigueur de travail et votre bonne humeur permanente.

A mes chers parents, je tiens à vous dédier cette thèse que je n'aurai jamais pu terminer sans vous. Je vous remercie pour votre soutien, vos conseils, votre écoute et votre patience. Je suis heureuse de savoir que vous pourrez assister à ma soutenance. Merci d'être là, merci d'être vous, merci pour tout. Je vous aime très fort.

A Gaël et à Pierre mes deux frères adorés. Merci à vous deux pour cette complicité qui nous lie depuis toujours. Merci à Gaël d'avoir toujours su trouver les mots pour m'encourager et me soutenir. Je te souhaite tout le bonheur du monde avec Laetitia (n'oubliez pas de me faire un petit coucou du haut du mont Blanc!). Merci à Pierre d'avoir toujours le mot pour nous faire rire. Je te souhaite grosse ***** pour tes concours, je sais que tu y arriveras. Merci à vous trois que j'aime très fort. Je serai toujours là pour vous.

A Gabriel, mon petit architecte préféré. Merci pour ton amour, ta tendresse et ta bonne humeur. Merci de me faire rire tous les jours. Tu es ma force. Je t'aime. Ta Sandrillon.

A toute ma famille : Merci à toi Mimi pour ton amour que tu me portes depuis toujours, merci à tonton Lapin, Claudine, Philippe, Thierry, Nathalie, Cathy, Noël, Maminouche, Frédéric, Mara, Sébastien, Katel, Tristan, Noëline, Nolwenn, Sébastien, Nico, Charlotte, Jimmy, Théo et tous les petits cousins.

A mamie Janine qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais qui j'espère aurait été fière de moi.

A toute la famille Cheyrou pour leur soutien et leur amour. Merci de m'avoir fait découvrir les joies du Périgord. Merci François d'avoir eu la patience de lire et de corriger ma thèse. Merci Elisabeth pour votre bonne humeur permanente. Merci à la petite famille Mougel qui continue de s'agrandir. Merci cléclé de marcher enfin! Tu vas pouvoir embêter tes parents maintenant. Merci Fanouch, notre petite journaliste, pour tous ces moments de rigolade (petit coucou à Heidy).

J'adresse également toute ma gratitude à mes ami(e)s :

A mes amis d'enfance préférés : Alice, Marion, Marie et Juju. Que de bons souvenirs et de délires passés avec vous. Quoi de mieux qu'un beau mariage pour s'entraîner pour les futures Olympiades ?! Merci à vous quatre, mes amis de toujours.

A Adeline, mon amie, ma confidente. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble au Rose avec Nelly. Surtout ne change rien.

A mes trois captains favoris : Alexia, Lucie et PH.

Maman Télé Rallye, un grand merci pour tous ces beaux moments partagés ensemble, tous ces fous rires et ces délires! De Mayotte à Robert Piquet en passant par le BB25, ça n'a été que du bonheur. Merci pour cette belle amitié qui est née. Merci également à Mr Fatas Camillou toutou et à petit Elliott. Je vous souhaite plein de bonheur.

Mon captain pyélonéphrite, merci pour ta bienveillance, ton aide et ton soutien. Ma petite Lucie je suis heureuse d'avoir pu croiser ta route et d'avoir partagé plein de bons moments avoir toi. Tu resteras mon petit moulin à parole préféré! Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton Doudou.

Mon Chaaaaat! Merci mon captain PH pour ta joie et ta bonne humeur, pour ta gentillesse sans faille. Merci d'être toi tout simplement.

A Marianne Oussouss, un grand merci pour toutes ces années de complicité, toutes ces bouteilles pour la route et tous ces chants mélodieux. Même si tu n'as plus autant la classe maintenant que tu es à Paris, jt'aime bien quand même. On aura bien rigolé et ce n'est pas prêt de s'arrêter!

A Hélène, alias la Louste, merci pour ta gentillesse, ton écoute, tes potins et tous ces bons moments passés à la Mongie et à Urt. Merci pour tous tes conseils, je ne sais pas si je serais prête un jour pour le hors-piste mais je sais que la règle d'or c'est : pas plus de TROIS couleurs (haha).

A mes petits T1 adorés: Noémie, Camille et Camille. Quelle joie d'avoir fait votre connaissance. Merci ma nono pour ton soutien et ton amitié. Tu sais toujours trouver les mots pour me faire rire. Merci CossCoss pour tous ces délires et ces bons moments de rigolade. Merci mon petit boulé pour ta gentillesse et ta sagesse (malgré ton choix pour la pédo, haha).

A Audrey, mon ancienne colloc de choc. Merci à toi d'avoir été là. Je suis heureuse pour toi, l'année 2016 sera merveilleuse! Félicitations.

A Gaby, Laeti et Fanny, mes Princesssss! Merci pour ces soirées, ces potins et tous ces moments de rigolade. Kiss love sorry muuudAm.

A Camille, mon super binôme du labo. Un grand merci à toi future interne pour ton soutien et ton écoute. Je suis très contente d'avoir pu te rencontrer et d'avoir passé tous ces bons moments avec toi au labo et en dehors. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Noic.

A Alexis, je te remercie pour ton aide notamment dans la récolte des dds, même si elles ont toutes été contaminées (j'aurais dû te prévenir qu'il ne fallait pas cracher dedans...). Merci pour ton soutien et j'espère que tu réussiras dans tes recherches.

A Pierre Sore, ma copine adorée. Merci pour ta gentillesse, ton humour, ton écoute, tes potins, tes retards et ta coquetterie... merci d'avoir fait ton Sore quoi!

A Pierre Said, Pierre Portal, Mathieu, Lucho, Bounce et Alexandre, merci les mecs pour ces soirées passées ensemble, pour vos bières-pong et votre bonne humeur.

Au cabinet dentaire de Cestas : Merci à Estelle, Thac, Tiphaine, Sandrine, Véronique et Chantal pour votre soutien et votre confiance.

J'adresse aussi mes remerciements aux personnes du laboratoire INSERM de Bordeaux. La recherche est loin d'être un travail solitaire et jamais je n'aurais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes : merci à Julien, Annabelle, Robin, Emeline, Catherine et Reine.

Merci Audrey pour m'avoir soutenue et encouragée dans les moments de doute «c'est ça la recherche».

Merci Jean pour l'intérêt dont tu as fait preuve envers mon travail et pour ton aide précieuse.

Enfin je tiens à te remercier Murielle pour ta générosité, ta bonne humeur et tous tes bons conseils. Tu m'as appris énormément de choses et je t'en suis très reconnaissante. J'espère que ce travail sera à la hauteur de tes attentes et de tout ce que tu as su me transmettre.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
I. INTRODUCTION GENERALE	13
II. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE.....	15
2.1 LE TISSU OSSEUX.....	15
2.1.1 L'architecture de l'os	15
2.1.2 La Matrice Extracellulaire et le remodelage osseux	16
2.1.3 L'étroite relation entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins	17
2.2 L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE.....	19
2.2.1 L'ingénierie tissulaire : concepts généraux.....	19
2.2.2 Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire osseuse	21
2.2.2.1 <i>Les cellules souches : généralités</i>	22
2.2.2.2 <i>Les cellules souches adultes</i>	23
2.2.2.3 <i>Les cellules souches mésenchymateuses issues de l'organe dentaire</i>	25
a- <i>Les DPSCs et les SHED</i>	27
b- <i>Les SCAPs: Stem Cells from Apical Papilla</i>	30
2.2.3 «scaffolds» ou échafaudages.....	32
2.2.4 Les signaux	36
2.2.4.1 <i>Les signaux biochimiques</i>	36
2.2.4.2 <i>Les signaux biomécaniques</i>	37
2.2.5 L'ingénierie tissulaire osseuse : Exemples d'applications cliniques dans la sphère orale et maxillo-faciale.....	37
2.2.6 Limites de l'ingénierie tissulaire «basée sur scaffold»	41
2.2.7 Les solutions pour pallier les limites d'un produit d'ingénierie tissulaire osseux «basé sur scaffold».....	42
2.2.7.1 <i>Les stratégies de vascularisation existantes en ingénierie tissulaire osseuse</i> ...	42
2.2.7.2 <i>La prévascularisation in vitro : principes</i>	44
III. ETUDE EXPERIMENTALE.....	47
3.1 LE PROJET IFRO	47

3.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE	48
3.3 MATERIELS ET METHODES	53
3.3.1 Isolement et culture des SCAPS	53
3.3.2 Immuno-sélection des SCAPS par billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD105	54
3.3.3 Cytométrie en Flux – caractérisation des SCAPS	54
3.3.4 Induction de la différenciation des SCAPS en SCAPS-E	55
3.3.5 Caractérisation des SCAPS-E.....	56
3.3.5.1 <i>Immunofluorescence</i>	56
3.3.5.2 <i>Polymérase Chain Reaction – PCR</i>	57
3.3.6 Bio-impression d'éléments biologiques assistée par Laser (LAB).....	58
3.4 RESULTATS.....	62
3.4.1 Isolement et caractérisation des SCAPS <i>in vitro</i>	62
3.4.2 Différenciation endothéliale des SCAPS.....	63
3.4.3 La bioimpression assistée par laser	66
3.5 DISCUSSION.....	70
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	73
V. BIBLIOGRAPHIE	74
VI. ANNEXES	78

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Deux types d'organisations de l'os : os compact et os spongieux, d'après Nguyen et al. [1].....	16
Figure 2 : Gap-jonctions – Organisation des connexines en connexons et des connexons en cal intercellulaire, d'après Alberts et al. [10].....	18
Figure 3 : Triade biologique en ingénierie tissulaire, d'après Murphy et al. [16].....	21
Figure 4 : Localisation des cellules souches d'origine dentaire en fonction des différents stades de développement de la dent, d'après Egusa et al. [17].....	26
Figure 5 : Régénération d'un défaut osseux mandibulaire par implantation d'un produit d'ingénierie tissulaire composé de DPSCs et de collagène, d'après d'Aquino et al. [47].....	38
Figure 6: Implantation in vivo d'un tissu osseux artificiel issue d'une stratégie d'ingénierie tissulaire, d'après Mesimäki et al. [63].....	40
Figure 7 : Illustration reflétant l'étroite relation entre la vascularisation et la survie cellulaire liée à une distance critique, d'après Liu et al. [2].....	42
Figure 8 : Différentes stratégies de vascularisation, d'après Nguyen et al. [1].....	43
Figure 9: Schéma illustrant la réorganisation des cellules endothéliales en structure « capillaires-like » au sein d'une coculture ostéo-endothéliale, d'après Kirkpatrick et al. [65].....	45
Figure 10: Objectifs de l'étude expérimentale.....	49
Figure 11 : Dispositif expérimental du LAB et les paramètres impliqués, d'après Guillemot et al. [64].....	51
Figure 12 : Mécanismes et Régimes d'éjection induit par le laser, d'après Guillemot et al. [64].....	52
Figure 13 : Dents de sagesse immatures avec leurs papilles apicales.....	54
Figure 14 : Les quatre conditions de bioimpression.	59
Figure 15 : Caractérisation des SCAPs par cytométrie en flux.....	62
Figure 16 : Observation des SCAPs-E au microscope optique.	63
Figure 17 : Immunofluorescence des SCAPs-E pour le marqueur CD31.....	64
Figure 18 : Immunofluorescence des SCAPs-E pour le marqueur vWf.....	65
Figure 19 : RT-PCR des SCAPs-E.....	65
Figure 20 : Bioimpression cellulaire à 24h des quatre échantillons.....	67
Figure 21 : Observation des PDECs à 24h post-implosion après un Live/Dead.	68
Figure 22: Observation au microscope confocal des PDECs imprimées sur un « lit » de SCAPs et sur du collagène de type I à 48h post-implosion.	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux marqueurs de surface présents chez les BMMSCs et les DSCs.....	27
Tableau 2: Les trois grandes familles de matériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.....	35

LISTE DES ABREVIATIONS

α -MEM	α -Modification of Eagle's Medium
APC	Allophycocyanin
BET	Bromure d'Ethidium
BMMSCs	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phénylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPSCs	Dental Pulp Stem Cells
DSCs	Dental Stem Cells
DSPP	Dentin Sialo Phospho Protein
EBM-2	Endothelial Cell Basal Medium – 2
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acide
EGM-2-MV	Endothelial Cell Growth Media- 2 Microvascular
FGF	Fibroblast growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HOP	Human Osteoblastic Progenitor
IFRO	Institut Français pour la Recherche Odontologique
IGF	Insulin-like Growth Factor
ITO	Ingénierie Tissulaire Osseuse
LAB	Laser Assisted Bioprinting
LIFT	Laser-Induced Forward Transfer
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MSC	Mesenchymal Stem Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDECs	Progenitor Derived Endothelial Cells
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PFA	Paraformaldéhyde

SCAPS	Stem Cells from Apical Papilla
SHED	Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth
SP	Side Population
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAE	Tris Acetate EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWf	Von Willebrand Factor

I. INTRODUCTION GENERALE

La réparation osseuse reste une préoccupation constante pour les chirurgiens, qu'elle fasse suite à une perte de substance post-traumatique, à une résection oncologique ou dans le cadre d'une chirurgie pré-prothétique implantaire. Ainsi l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) représente-t-elle un formidable espoir tant pour les praticiens que pour leurs patients. Si cette révolution thérapeutique constitue aujourd'hui un domaine de recherche en plein essor, les applications cliniques quant à elles restent limitées : la principale raison est l'insuffisance de la vascularisation au cours des premières phases d'implantation des produits issus de ces stratégies de reconstruction [1]. La vascularisation est au cœur de la néoformation osseuse et des mécanismes de réparation. Or, l'angiogenèse naturelle et spontanée qui se met en place après implantation reste lente et insuffisante pour assurer à elle seule la vascularisation complète de l'implant. Afin d'éviter une hypoxie voire une nécrose de tissus volumineux à implanter, il est indispensable de trouver une solution pour résoudre ce problème majeur de vascularisation [2]. La pré-vascularisation des organes artificiels est essentielle à leur maturation, leur intégration au sein de l'organisme et leur survie puisque la diffusion de nutriments et d'oxygène à partir des capillaires périphériques ne dépasse pas quelques μm [3]. Indispensable au développement de l'os et à sa stabilité *in vivo*, la vascularisation représente aujourd'hui en ingénierie tissulaire un véritable challenge pour les chercheurs.

De plus, les méthodes d'ingénierie conventionnelles basées sur «scaffold» utilisées afin d'élaborer un produit d'ingénierie tissulaire ne sont pas toujours efficaces et sont fréquemment sources de complications voire d'échecs. C'est pourquoi, une nouvelle approche permettant d'imprimer des cellules souches humaines avec une résolution micrométrique à l'aide d'un laser s'est développée au sein de la communauté scientifique [4]. Cette technique de micro-impression assistée par laser permet de contrôler l'organisation des différents éléments du tissu et les processus d'auto-assemblages cellulaires.

Le projet, financé par l'IFRO (Institut Français pour la Recherche Odontologique) et développé par l'unité INSERM 1026, a pour objectif « l'étude des interactions entre cellules endothéliales et ostéogéniques issues de cellules souches de la papille apicale dans des modèles de coculture obtenue par bioimpression laser ». Il vise à favoriser la néovascularisation en ingénierie tissulaire osseuse tout en contrôlant l'ensemencement cellulaire *via* la bioimpression laser. Pour ce faire, il s'appuie sur l'une des quatre grandes stratégies de vascularisation utilisées : la prévascularisation *in vitro*.

Au cours de cette thèse nous décrirons en premier lieu la fonction et la structure du tissu osseux. Nous soulignerons l'importance de la vascularisation dans le processus d'ostéogenèse et de réparation tissulaire. Puis nous développerons le concept d'ingénierie tissulaire et plus particulièrement celui de l'ingénierie tissulaire osseuse. Nous mettrons en lumière les limites de cette nouvelle technique et les différentes stratégies mises en place pour y pallier.

Enfin nous présenterons notre étude expérimentale qui s'inscrit dans le cadre du projet financé par l'IFRO, projet se fixant, entre autres, comme objectif l'obtention, à partir de cellules souches de la papille apicale (SCAPs), de progéniteurs orientés vers la lignée endothéliale. Puis dans un second temps, nos travaux porteront sur la mise en culture des SCAPs et des progéniteurs endothéliaux grâce à la technique de bioimpression assistée par laser.

II. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

On ne peut envisager un mécanisme de réparation tissulaire sans une compréhension du développement normal du tissu à régénérer : les connaissances du tissu osseux, de son architecture, de sa composition, des influences du microenvironnement sur son développement ou encore de ses relations avec les tissus environnants représentent en effet un pré requis incontournable à toute stratégie thérapeutique.

2.1 LE TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est un tissu conjonctif hautement spécialisé capable d'assurer plusieurs fonctions essentielles : une fonction mécanique (assure les mouvements, la locomotion et le soutien de l'organisme), une fonction hématopoïétique (présence de la moelle osseuse dans laquelle on retrouve, entre autre, des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses), une fonction métabolique (maintien de l'homéostasie phosphocalcique) et une fonction de protection (protection des organes internes vitaux : le cœur et les poumons *via* la cage thoracique, le système nerveux *via* la boîte crânienne ou les vertèbres...) [5]. Les os du squelette ont des formes variables qui dépendent de leur fonction et de leur situation: os longs comme l'humérus, os courts comme les phalanges de la main, os plats comme les os du crâne, os irréguliers comme les vertèbres. Cependant, quelle que soit leur morphologie, ils possèdent une organisation et une architecture similaires.

2.1.1 L'architecture de l'os

L'architecture du tissu osseux correspond à deux types d'organisations complexes : l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux (**Figure 1**). L'os cortical (ou compact) constitue la coque externe des os et s'organise en ostéons (unités de structures intimement intriquées et orientées dans le sens des contraintes mécaniques). Ils recueillent en leur centre les canaux de Havers à l'intérieur desquels circulent les vaisseaux sanguins et les nerfs. L'os trabéculaire (ou spongieux) est constitué de travées formant un réseau tridimensionnel entouré par du tissu adipeux et hématopoïétique richement vascularisé. Sa structure poreuse permet aux vaisseaux de pénétrer et circuler librement. Bien que la structure et la fonction de l'os

cortical différent de celles de l'os spongieux, les deux types d'os présentent un point commun: leur important réseau vasculaire. Cette caractéristique souligne l'importance de la vascularisation dans le développement et la survie du tissu osseux [1].

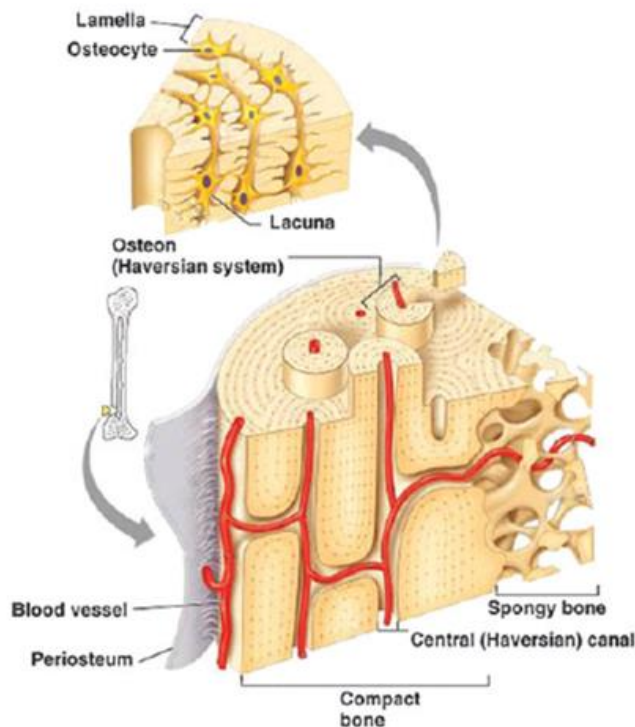


Figure 1: Deux types d'organisations de l'os : os compact et os spongieux, d'après Nguyen *et al.* [1]

La microstructure de l'os compact et de l'os spongieux est composée d'une matrice extracellulaire et de cellules osseuses (lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques) leur conférant toutes les propriétés nécessaires à leur développement et leur intégration dans l'organisme.

2.1.2 La Matrice Extracellulaire et le remodelage osseux

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de deux fractions : une phase minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite et une phase organique [5]. La fraction organique de la MEC est principalement composée de collagène de type I (90%), de protéines non collagéniques et de facteurs de croissance tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), IGF-I et II (Insulin-like Growth Factor I et II), BMP (Bone Morphogenic Protein), FGF (Fibroblast growth Factor), PDGF (Platelet-derived Growth Factor) et VEGF (Vascular

Endothelial Growth Factor). Par le jeu de ces deux fractions, la MEC confère à l'os sa dureté et sa résistance. Cependant, malgré sa rigidité, l'os est un tissu dynamique en perpétuel remaniement qui s'adapte et dont la structure se modifie en fonction des contraintes environnantes. En réponse à des médiateurs internes et des stimulations mécaniques externes, l'os a la capacité de se résorber, de se régénérer et de s'auto-réparer [5]. Ainsi, la matrice osseuse, synthétisée et régulée par les ostéoblastes, n'est pas figée et a la particularité d'être constamment régénérée au cours de la vie par un couplage résorption/formation. Cette balance hautement régulée entre formation et dégradation osseuses est assurée respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes [2]. Le remodelage permet au tissu osseux de s'adapter et de modifier sa structure en fonction des contraintes mécaniques et/ou biochimiques environnantes. La formation et le remodelage osseux ne sont pas seulement régulés par les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques. En effet, les tissus environnants et particulièrement les vaisseaux sanguins, participent activement au développement et à la stabilité du tissu osseux.

2.1.3 L'étroite relation entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins

L'os est un tissu conjonctif minéralisé possédant la particularité d'être vascularisé. La vascularisation intervient dans toutes les fonctions du tissu osseux et joue un rôle essentiel lors des mécanismes de formation, de réparation, et de remodelage de l'os [6]. Cette étroite relation existant entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins environnants est mise en exergue lors de l'apparition de pathologies. Dans le cas d'une vascularisation absente ou défectueuse le développement de pathologies osseuses telles que l'ostéoporose ou l'apparition de formations et de croissances anormales du tissu osseux (cas du rachitisme) est observé [7]. De même, un développement anarchique du tissu osseux peut entraîner des perturbations hémodynamiques graves (cas de la maladie de Paget) [8]. Cette constatation suppose qu'il existe une communication entre les cellules osseuses et endothéliales leur permettant d'agir en cohésion.

La coordination des cellules au sein d'un tissu est indispensable pour en assurer le bon fonctionnement. Elle implique l'existence de communications intercellulaires où chaque cellule est informée de l'activité des cellules adjacentes et adapte en conséquence son propre fonctionnement. Grâce à cet échange, les cellules vont se développer de façon coordonnée.

Dans le cas de la communication ostéo-endothéliale, les ostéoblastes vont être capables de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux et réciproquement, les cellules endothéliales vont pouvoir influencer le remodelage et la régénération du tissu osseux. Les deux types cellulaires agissent en synergie vers un même objectif : la création d'un tissu fonctionnel, stable et dynamique.

Cette communication cellulaire est orchestrée à plusieurs niveaux [6] :

-Par des contacts indirects de façon paracrine ou autocrine à l'aide de facteurs solubles [9]. Les principaux facteurs impliqués dans cette communication sont les facteurs de croissance VEGF, BMPs, TGF- β ou encore les prostaglandines.

-Par des contacts directs à l'aide de jonctions communicantes par le biais de connexines ou de jonctions adhérentes via l'existence de cadhérines [9]. Les jonctions communicantes, appelées jonctions « gap », permettent d'établir une continuité cytoplasmique entre deux cellules adjacentes et ainsi d'assurer une communication intercellulaire (**Figure 2**). Le cylindre transmembranaire est composé de monomères de connexine (Cx) [10]. La Cx43 (de poids moléculaire de 43 kDa) est la principale forme de connexine observée à la fois dans les cellules ostéoblastiques et endothéliales. Des études ont mis en évidence le rôle central des Cx43 dans la régulation de l'ostéogenèse par l'établissement de jonctions communicantes entre les cellules endothéliales et ostéoblastiques [11].

-Par des interactions avec la matrice extracellulaire via l'activité des intégrines [9].

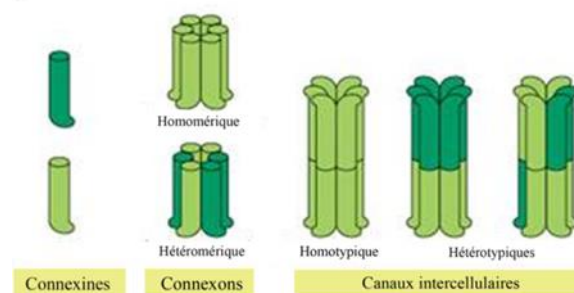


Figure 2 : Gap-jonctions – Organisation des connexines en connexons et des connexons en canal intercellulaire, d'après Alberts *et al.* [10]

Grâce à son étroite relation avec le réseau vasculaire et son environnement, le tissu osseux est capable de s'auto-réparer face à certaines lésions de petit volume [6]. Cependant, dans le cas

de pertes de substance osseuse importantes, lors de traumatismes, d'infections ou de résections de tumeurs, les chirurgiens n'ont d'autres recours que de procéder à des stratégies de reconstruction ou de comblement osseux. Ainsi, suite à une perte massive de tissu osseux, les greffes de tissu autologue, allogénique, xénogénique ou encore les stratégies de distractions restent des solutions couramment pratiquées. Cependant, malgré l'amélioration de ses techniques médicales et ses résultats encourageants, la greffe d'organe se trouve face à de nombreuses limites freinant considérablement cette médecine moderne : problèmes de disponibilité du tissu à prélever, site donneur fragilisé lors des prélèvements, pénurie du don d'organe, problèmes de compatibilité HLA, risque d'infection, obligation de suivi d'un traitement immunosuppresseur à vie, accompagné d'éventuels effets indésirables. Cette situation explique l'intérêt de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'ingénierie tissulaire osseuse permet de s'affranchir des problèmes liés aux greffes osseuses et représente ainsi un formidable espoir tant pour les praticiens que pour leurs patients.

2.2 L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

2.2.1 L'ingénierie tissulaire : concepts généraux

La médecine régénérative est une discipline en plein essor autour de laquelle s'articulent deux grandes spécialités : l'ingénierie tissulaire et la thérapie génique et cellulaire. Son but est de « réparer, remplacer ou régénérer des cellules, tissus ou organes afin de restaurer des fonctions endommagées » [12]. Elle ouvre ainsi la voie à une nouvelle ère médicale offrant l'espoir d'une alternative thérapeutique aux greffes et transplantations d'organes.

Dès 1993 Langer et Vacanti définissent le concept d'ingénierie tissulaire (IT) comme étant « un domaine interdisciplinaire où s'appliquent les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts tissulaires permettant de remplacer, maintenir ou améliorer le fonctionnement d'un tissu ou d'un organe entier » [13]. Cette nouvelle discipline a pour but la fabrication d'organes ou de tissus de remplacement utilisés *in vivo* à des fins thérapeutiques ou *in vitro* pour des modèles d'étude en 2 ou 3 dimensions. Elle vise à reproduire un tissu artificiel en mimant le microenvironnement spécifique du tissu à recréer ou à réparer [3]. Il s'agit d'un véritable défi où le scientifique doit réussir à reproduire *in vitro* la complexité des conditions environnementales de développement *in vivo*. Pour ce faire elle fait appel à

plusieurs domaines : la science des biomatériaux, la biochimie des biomolécules, la biologie cellulaire, la bioingénierie, la biomécanique, la robotique, la physique, l'informatique, ou encore la médecine et la chirurgie. Il s'agit d'une alliance entre les sciences du vivant et les sciences de l'ingénieur.

Le succès de l'ingénierie tissulaire repose sur l'interaction entre trois composants indispensables, une triade biologique constituée (**Figure 3**) [3] :

- d'une matrice ou «scaffold» supportant les cellules
- des cellules qui synthétisent le tissu
- de signaux mécaniques et chimiques qui modulent le comportement des cellules

Cette combinaison de plusieurs outils permet d'induire une régénération tissulaire optimale.

Pour la création de produits formés par ingénierie tissulaire plusieurs étapes sont nécessaires :

- La première correspond au prélèvement cellulaire chez le patient. Les cellules, mises en culture *in vitro*, sont amplifiées et éventuellement différenciées.
- Elles sont ensuiteensemencées sur une structure d'échafaudage biodégradable (ou une matrice appelée «scaffold») ayant une composition et une géométrie spécifique.
- Le biomatériau en cours de formation est alors placé dans un bioréacteur afin d'être soumis à des contraintes dynamiques. L'utilisation de bioréacteur permet d'optimiser la formation tissulaire en favorisant la pénétration des nutriments et d'oxygène au sein de la matrice [14]. Afin de favoriser la croissance du tissu, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent également être ajoutés.
- Les cellules vont proliférer, s'organiser et synthétiser de la matrice extra cellulaire (MEC) pour former un tissu fonctionnel.
- Le tissu hybride résultant peut être implanté chez le patient.

On parle d'ingénierie tissulaire « basée sur scaffold » puisque ce dernier est au cœur de la stratégie de reconstruction tissulaire [15].

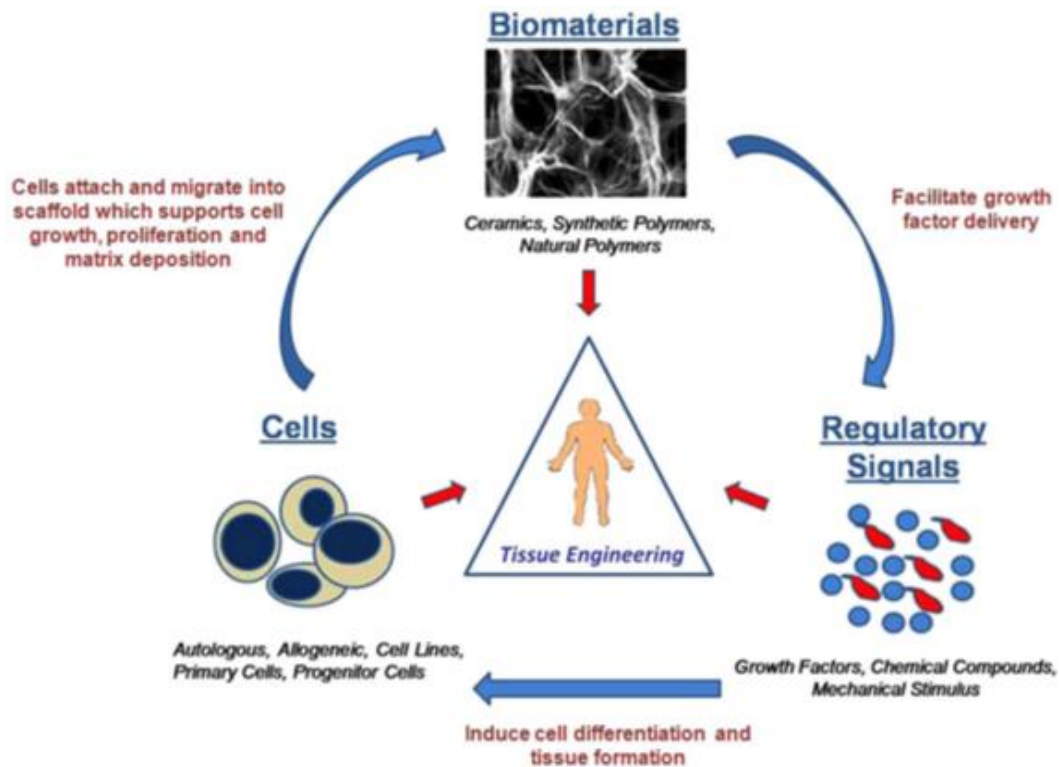


Figure 3 : Triade biologique en ingénierie tissulaire, d’après Murphy *et al.* [16]

2.2.2 Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire osseuse

Les cellules représentent un outil indispensable pour la médecine régénérative et peuvent être définies selon leur origine, leur niveau de différenciation, leur phénotype ou encore leurs fonctions. L’approvisionnement cellulaire peut se faire à partir de quatre sources différentes :

- Celle du patient : cellules autologues
- Celle d’un donneur : cellules allogéniques
- Celle d’une autre espèce : cellules xénogéniques
- Celle d’une lignée cellulaire : cellules immortalisées

En ingénierie tissulaire, le principal défi pour le chercheur repose sur le choix de la source cellulaire. Dans le cadre de l’ingénierie tissulaire osseuse, de nombreuses études se sont portées sur diverses sources de cellules souches telles que les ESCs (Embryonic Stem Cells), les iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells), les MSCs (Mesenchymal Stem Cells), les ADSCs (Adipose-Derived Stem Cells) ou encore les DSCs (Dental Stem Cells) [5, 17].

2.2.2.1 Les cellules souches : généralités

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées définies et caractérisées par deux propriétés spécifiques [18] :

- Leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération

Il s'agit de l'aptitude à se diviser à l'identique pendant de très longues périodes par division cellulaire. Cette capacité à se reproduire indéfiniment tout en maintenant un état indifférencié permet d'éviter l'épuisement du réservoir de cellules souches.

- Leur degré de plasticité important

Il s'agit de leur faculté à se différencier, sous certaines conditions physiologiques, en cellules spécialisées et fonctionnelles. Ce pouvoir de différenciation confirme l'importance de l'environnement, des signaux et des guides extérieurs dans le développement des cellules.

Selon leur degré de différenciation, on distingue les cellules souches :

- Totipotentes : capables de se différencier en tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaires.
- Pluripotentes ou embryonnaires : capables de se différencier en n'importe quelles cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme).
- Multipotentes : capables de former tous les types cellulaires de l'un des trois feuillets.
- Unipotentes : à l'origine d'un seul type cellulaire.

Le degré de plasticité cellulaire varie avec l'âge de l'individu : au fur et à mesure du développement et de l'apparition des tissus et des organes on observe une spécialisation des cellules corrélée à une déperdition de l'information. Les cellules embryonnaires pluripotentes représentent donc une source idéale de cellules tant sur le plan médical que sur celui de la recherche. Cependant, malgré leur intérêt scientifique majeur, de nombreuses questions éthiques font obstacles à leur utilisation à des fins thérapeutiques.

L'alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires est celle des cellules souches recueillies à partir de tissus adultes spécialisés : les cellules souches adultes.

2.2.2.2 Les cellules souches adultes

Déjà engagées dans une voie de différenciation, les cellules souches adultes peuvent être multipotentes ou unipotentes. Elles offrent un potentiel de développement plus restreint que les cellules souches embryonnaires mais présentent de nombreux avantages, faisant d'elles des cellules de grand intérêt en ingénierie tissulaire.

Le rôle principal d'une cellule souche somatique est le maintien de l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien de l'équilibre physiologique des tissus. Elle remplace une cellule morte, par apoptose ou suite à une lésion, et permet ainsi aux tissus de rester fonctionnels. Autrement dit, elle participe à la réparation tissulaire et au maintien de l'intégrité de l'organisme pendant toute la vie de l'individu [17].

Les cellules souches adultes sont présentes dans de nombreux tissus mais en quantités variables. Dans les tissus en constante régénération (moelle osseuse, peau, sang...) le nombre de cellules souches est important pour assurer l'homéostasie et la réparation. A l'inverse, elles se raréfient dans les tissus se renouvelant peu et avec un « turnover » cellulaire plus lent (cerveau, cœur, rein) [19]. Les cellules souches adultes sont généralement localisées dans un microenvironnement spécifique et favorable à leur survie appelé « niche » [17]. Il s'agit d'un environnement cellulaire riche en facteurs et molécules qui les protège et régule leur prolifération, leur mobilisation et leur différenciation. Les « niches » permettent de maintenir un équilibre entre le maintien d'un réservoir de cellules indifférenciées et la production de cellules progénitrices [3]. Les cellules souches adultes les plus nombreuses sont les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Elles ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse en 1966 par Friedenstein [20]. Les BMMSCs (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) représentent une petite portion de la population totale des cellules mononuclées de la moelle osseuse : $1/10^4$ à $1/10^5$ [3]. Elles peuvent ensuite être grandement amplifiées *in vitro* dans des conditions standards de culture (jusqu'à 40 doublements) [21]. Depuis la découverte des BMMSCs, diverses études ont mis en évidence la présence de CSMs dans une grande variété de tissus tels que : le sang périphérique, le sang de cordon ombilical [22], le tissu adipeux [23], le liquide synovial, le périoste, le cartilage ou encore l'organe dentaire [17, 24, 25]. Ainsi, il semblerait que ces cellules souches multipotentes adultes non-hématopoïétiques soient présentes dans tous les tissus conjonctifs mais en quantité et potentialité variables selon le tissu, l'âge et l'état de santé général du patient.

In vitro, les CSMs sont caractérisées par leur capacité à adhérer aux surfaces plastiques et à former des clones appelés CFU-F ou « Colony-Forming Unit Fibroblast » [17]. D'un point de vue morphologique, ces cellules en forme d'aiguille « spindle shaped » ont un aspect « fibroblast-like » [26]. Leur phénotype se caractérise par une combinaison de plusieurs antigènes de surface et la présence de nombreuses intégrines jouant un rôle important dans leur mobilité cellulaire. A ce jour, aucun marqueur unique n'a été mis en évidence. L'absence de spécificité rend leur caractérisation et leur isolement plus difficiles [17]. Face à cette constatation, la Société Internationale sur la Thérapie Cellulaire (ISCT) a établi un consensus en fixant les critères d'identification des CSMs *in vitro* [27] :

- Être adhérentes au plastique dans des conditions de cultures standardisées.
- Exprimer plus de 95% des marqueurs de surface des cellules conjonctives CD90, CD73 et CD105.
- Être négative (moins de 2%) aux marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 et aux molécules de surface HLA de classe II (les CSMs ont une faible immunogénicité). Le phénotype des MSCs est confirmé par l'absence d'autres marqueurs, en particulier des marqueurs de la lignée hématopoïétique.
- Avoir la capacité de se différencier *in vitro* en cellules ostéoblastiques, chondrocytaires, et adipocytaires dans des conditions de cultures standardisées.

L'intérêt des MSCs réside dans leur pouvoir de prolifération élevé, leur capacité à se différencier en un large panel de tissus et leur recrutement possible *in situ*. Dans des conditions de cultures favorables, les MSCs peuvent se différencier en cellules ostéoblastiques, chondrocytaires, adipocytaires, myoblastiques, tendineuses, mais également neurales ou encore endothéliales (CEs) [21, 26, 28]. Leur caractère multipotent, leur capacité d'auto renouvellement, leur disponibilité et leur capacité de migration en font de très bonnes candidates en ingénierie tissulaire osseuse [29]. Il est cependant nécessaire de souligner que les CSMs, du fait de leur localisation variée, ont des potentiels de différenciation ou de prolifération inégaux [25]. Cette différence est à prendre en considération lors du choix de la source de CSM qui doit être la plus judicieuse possible. Les BMMSCs ont longtemps été considérées comme le « gold standard » et restent la source cellulaire de référence en ingénierie tissulaire osseuse [5, 28]. Cependant, la découverte de cellules hautement prolifératives possédant un fort potentiel de différenciation au sein d'un organe facilement

accessible a fait de la dent une source de grand intérêt pour les chercheurs. Ainsi, si la moelle osseuse est jusqu'à présent le site de premier choix pour la collection de cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses, l'organe dentaire doit être considéré comme un site préférentiel pour la collection de MSCs.

2.2.2.3 Les cellules souches mésenchymateuses issues de l'organe dentaire

La dent est un organe complexe constituée par un ensemble de tissus d'origines et de structures différentes. Sa formation est contrôlée par des interactions épithélio-mésenchymateuses durant lesquelles l'épithélium oral s'épaissit, bourgeonne, se développe sous forme de cupule puis de cloche pour finalement aboutir à la formation de l'organe dentaire [17]. Au cours de ce processus de morphogenèse on retrouve d'une part les cellules souches épithéliales, à l'origine de la formation des améloblastes, qui disparaissent à la fin de l'amélogénèse [30, 31] et d'autre part, des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) qui interviennent à tous les stades d'évolution de la dent. Ces cellules originaires des crêtes neurales vont permettre la formation d'odontoblastes, d'ostéoblastes, de fibroblastes, de cémentoblastes et de cellules desmodontales. Contrairement aux cellules souches épithéliales, les MSCs persistent au sein des tissus dentaires adultes [32]. Ainsi, la dent et les structures qui l'entourent représentent un organe riche en MSCs appelées DSCs (Dental Stem Cells) dont la localisation et la nature varient tout au long de la vie de l'individu.

On distingue cinq types de DSCs (**Figure 4**):

- Les DPSCs (Dental Pulp Stem Cells)
- Les SHEDs (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth)
- Les PDLSCs (Periodontal Ligament Stem Cells)
- Les DFSCs (Dental Follicle Stem Cells)
- Les SCAPs (Stem Cells from Apical Papilla)

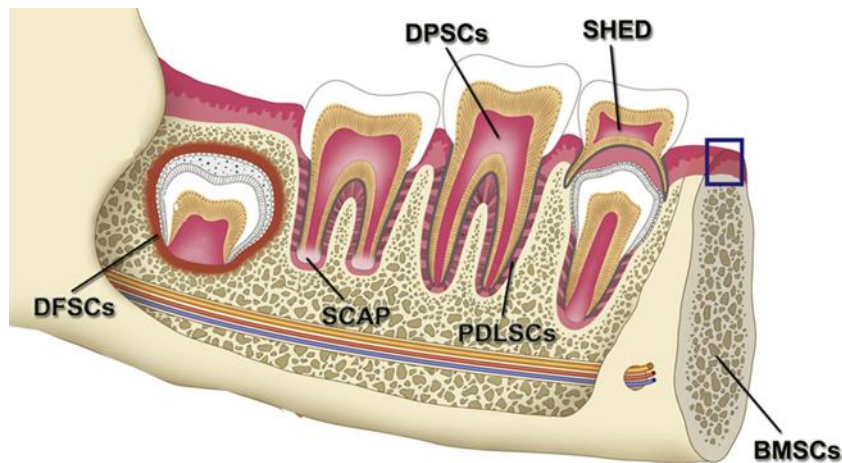


Figure 4 : Localisation des cellules souches d'origine dentaire en fonction des différents stades de développement de la dent, d'après Egusa *et al.* [17]

Ces cellules possèdent les caractéristiques communes à toutes les MSCs [31]. *In vitro*, elles présentent une morphologie « fibroblaste-like », une capacité d'adhérence au plastique et forment des amas de colonies cellulaires CFU-F. Leur phénotype révèle la présence de marqueurs de surface propres aux MSCs et l'absence de marqueurs de surface de la lignée hématopoïétique (**Tableau 1**). L'expression de ces antigènes de surface n'est cependant pas uniforme et ne présente pas de marqueurs de surface uniques. Cette caractéristique commune avec les MSCs, principalement due à leur origine embryologique similaire, rend leur identification difficile [17]. Cette hétérogénéité est un véritable obstacle qui entraîne des variabilités entre les expériences et compromet le bon fonctionnement expérimental. Face à ce constat, divers procédés ont été mis en place pour isoler et purifier des sous-populations cellulaires tels que le tri par billes magnétiques, le tri par immunofluorescence ou encore l'isolement d'une « side population ».

Pour cette raison, il est important de souligner que le terme DPSCs, SHED ou SCAPs ne se réfère pas à une population pure de cellules souches. Il s'agit d'un mélange hétérogène de cellules pouvant contenir à la fois des progéniteurs et des cellules « fibroblastes-like ».

Marqueurs de surface	BMMSCs	DPSCs	SCAPs	SHED	PLSCs	DFPCs	Références
CD13	+	+	+	+	+	+	
CD24	-	-	+	-	-	-	[17]
CD29	-	+	+	+	+	+	[17, 33]
CD34	-	-	-	-	-	-	[17, 31]
CD44	+	+	+	+	+	+	[34]
CD73	+	+	+	+	+	+	[17, 31, 33]
CD90	+	+	+	+	+	+	[17, 31, 33, 34]
CD105	+	+	+	+	+	+	[17, 31, 33]
CD106	+	+	+	+	+	+	[17]
CD146	+	+	+	+	+	+	[17, 34, 35]
CD166	+	+	+	+	+	+	[17, 34]
<i>STRO-1</i>	+	+	+	+	+	+	[17, 34, 35]

Tableau 1: Principaux marqueurs de surface présents chez les BMMSCs et les DSCs.

Dans le cadre de cette thèse, nous développerons les DPSCs et les SHED sur lesquelles reposent les principales données de la littérature. Puis, nous présenterons les SCAPs, cellules utilisées lors de notre étude expérimentale.

a- Les DPSCs et les SHED

La pulpe dentaire est un tissu hautement spécialisé, envahi par un réseau vasculaire et nerveux depuis la région apicale et entouré d'un tissu dur minéralisé : la dentine [36]. La pulpe et la dentine communiquent et collaborent entre elles pour assurer leur protection et leur réparation. Dans le cas d'agressions externes (mécaniques, chimiques, microbienne) entraînant la mort des odontoblastes, la pulpe a la capacité de régénérer une dentine cicatricielle de défense [32]. Ce processus de réparation laisse supposer l'existence de cellules souches mésenchymateuses capables de proliférer, de migrer vers le site atteint et de se différencier en « odontoblastes-like » afin de créer une barrière de protection [17, 24, 36].

S.Gronthos *et al.* ont isolé et identifié pour la première fois en 2000 une population de cellules stromales issue de la pulpe dentaire capable de régénérer leur microenvironnement avec une

fidélité remarquable [24]. Ces cellules souches d'origine dentaire obtenues par digestion enzymatique de la pulpe de dents de sagesse sont appelées DPSCs (Dental Pulp Stem Cells). Elles jouent un rôle essentiel dans le processus de régénération du complexe dentino-pulpaire mis en place après une agression ou une lésion [24, 31]. Cultivées *in vitro*, les DPSCs induisent la formation de colonies cellulaires qui, sous l'influence du milieu de culture peuvent produire des nodules calcifiés [24]. Une fois transplantées *in vivo*, elles sont capables de se différencier en cellules semblables aux odontoblastes et de créer un tissu dentaire fonctionnel proche du complexe dentino-pulpaire [24, 35]. La découverte de cette population cellulaire a été rapidement suivie par celle de cellules souches pulpaire issues de dents déciduales appelées SHED (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) [37].

Les DPSCs et les SHED sont des cellules souches multipotentes, auto-renouvelables, hautement prolifératives et possédant de grandes capacités de différenciation [24, 37, 38]. Ainsi, dans de bonnes conditions *in vivo* et *in vitro* peut-on observer une différenciation en cellules odontoblastiques, ostéoblastiques [37, 39-41], en cellules musculaires [31], en chondrocytes, en adipocytes [24], en cellules neurales et en cellules endothéliales [24, 33, 42, 43].

Laino et son équipe ont isolé et cultivé une sous-population de DPSCs CD117+/CD34+/CD45- (sélectionnée par cytométrie en flux) appelée SBP-DPSC (Stromal Bone Producing – Dental Pulp Stem Cells) [41]. *In vitro*, dans des conditions de culture ostéogénique, cette population de cellules a la capacité de se différencier en précurseurs ostéoblastiques CD44+/Runx2+ puis en ostéoblastes et de produire un tissu proche du tissu osseux composé d'une matrice minéralisée. Implantées *in vivo* chez le rat immunodéprimé, les DPSCs forment un tissu osseux fibreux contenant des ostéocytes. La différenciation des DPSCs vers la lignée ostéogénique et non vers la lignée odontoblastique a été confirmée par la présence, *in vitro* et *in vivo*, d'une forte concentration de phosphatase alcaline, par l'expression de marqueurs spécifiques au tissu osseux nouvellement formé (Ostéocalcine, Runx2, collagène 1) et par l'absence de DSPP (Dentin Sialo Phospho Protein), protéine spécifique de la dentine [40, 44, 45]. Au cours de la différenciation, les DPSCs perdent progressivement les antigènes de surfaces spécifiques aux cellules souches (CD117+/Flk-1+/STRO-1+/CD44+) laissant place à deux cytotypes :

-70% de la population cellulaire possèdent les marqueurs de surfaces de progéniteurs ostéoblastiques (Flk-1+/STRO-1-/CD44+/Runx-2+).

-30% de la population cellulaire possèdent des antigènes de surfaces propres aux progéniteurs endothéliaux Flk-1+/STRO-1+/CD44+/CD54+, facteur de von Willebrand, CD31 (PECAM-1)[40, 44].

Cette observation met en évidence la capacité des DPSCs à se différencier *in vitro* en précurseurs ostéoblastiques d'une part, mais également en progéniteurs endothéliaux permettant le développement de vaisseaux à l'intérieur de l'os en cours de formation.

Iohara et son équipe isolent à leur tour une sous-population de DPSCs porcines CD31-/CD146- présentant un phénotype proche de celui des progéniteurs endothéliaux (CD34+/VEGFR2+) et capable de promouvoir, en conditions de culture endothéliale, une néovascularisation *in vitro* et *in vivo* [46]. Ainsi, cultivées sur Matrigel, forment-elles des réseaux « capillaires-like » et expriment les principaux marqueurs des cellules endothéliales (le facteur de von Willebrand, le CD31 et la VE-cadhérine). Après leur implantation *in vivo* chez la souris ayant subi une ischémie de membres inférieurs, les DPSCs CD31-/CD146- induisent une augmentation du flux sanguin et de la densité des capillaires. Les DPSCs représentent une population très hétérogène de cellules dont une sous-population, proche des progéniteurs endothéliaux, possède des capacités de vascularisation. Cette découverte est renforcée par les études de Ishizaka *et al.* qui isolent une « side population » de DPSCs chez le porc (SP CD31-) capable de promouvoir, dans de bonnes conditions de culture *in vitro*, une néovascularisation supérieure aux BMMSCs et cellules souches adipeuses (CSA) [33]. Les DPSCs, placées dans un fragment de canal radiculaire puis implantées *in vivo* chez la souris immunodéprimée, ont le potentiel de régénérer un tissu proche de la pulpe avec une meilleure densité de vascularisation que les BMMSCs et les CSA. Ces cellules ont la capacité de migrer vers un site ischémique, de sécréter des facteurs angiogéniques et permettre une néovascularisation.

Il est intéressant de souligner que, *in vitro*, le taux de prolifération des DPSCs est supérieur à celui des BMMSCs [38]. Ceci peut s'expliquer par la différence du stade de développement des tissus prélevés : les DPSCs, collectées dans la pulpe de dents de sagesse, proviennent d'un tissu en cours de développement contrairement aux BMMSCs issues de la moelle osseuse adulte [24].

La découverte de ces populations de cellules souches ouvre de nouvelles perspectives en ingénierie tissulaire [30, 38, 43]. Elles suscitent un grand intérêt dans deux domaines d'application :

- En endodontie par la régénération du complexe dentino-pulpaire [31, 33].
- En médecine régénérative et notamment en ingénierie tissulaire osseuse par leur grande plasticité et leur capacité à promouvoir la néovascularisation [47].

b- Les SCAPs: Stem Cells from Apical Papilla

La formation de la racine dentaire, appelée radiculogenèse, commence lorsque les dimensions définitives de la couronne sont acquises et que les couches d'émail et de dentine ont atteint une épaisseur suffisamment importante. Elle est liée à la présence d'un organe épithélial radicaire particulier, la gaine épithéliale de Hertwig. Le développement radicaire s'établit au fur et à mesure que la gaine de Hertwig s'accroît en direction apicale. Tout au long de sa progression, cette gaine enrobe partiellement la papille apicale et induit progressivement la différenciation des cellules souches locales. Ainsi, la papille apicale, tissu conjonctif localisé au niveau de l'apex ouvert des racines immatures, représente-t-elle une zone essentielle au développement du canal et constitue-t-elle un précieux réservoir de cellules souches stromales toujours en activité chez l'enfant puis le jeune adulte. Au niveau histologique, on remarque une zone riche en cellules entre la pulpe dentaire et la papille apicale proprement dite. Cette zone est appelée « apical cell rich zone » [17].

Sonomaya *et al.* ont isolé et identifié pour la première fois en 2006 une population de cellules souches présentant des marqueurs de surfaces spécifiques des MSCs (**Tableau 1**) et des caractéristiques différentes des DPSCs [17, 35, 48]. Cette nouvelle population de cellules souches issue de la papille apicale de dents permanentes en cours de développement est appelée Stem Cells from Apical Papilla : SCAPs.

Les SCAPs semblent jouer un rôle central dans la formation des structures dentaires [31], en particulier dans le développement, la maturation et l'apexogenèse des racines.

Des études récentes menées par Huang *et al.* mettent en évidence la capacité des DPSCs et des SCAPs à régénérer à l'intérieur d'un canal radicaire vide un complexe semblable au complexe dentino-pulpaire. Les cellules souches,ensemencées sur un «scaffold» poly-D, L-lactique/glycide sont insérées dans le fragment dentaire puis transplantées dans une souris immunodéficiente. Les résultats révèlent la présence d'un canal entièrement rempli par un tissu vascularisé similaire à la pulpe dentaire [31].

Malgré leur origine commune et leurs caractéristiques proches des autres cellules souches d'origine dentaire, les SCAPs se distinguent par certaines propriétés. Contrairement aux MSCs connues pour ne posséder aucun marqueur unique, Sonomaya *et al.* supposent que les SCAPs détiennent un marqueur spécifique : le CD24 [48]. Ce marqueur semble disparaître lorsque les cellules entrent dans des voies de différenciation. Cette caractéristique n'est pas encore clairement établie mais permettrait d'envisager une sélection plus spécifique des SCAPs. De plus, les SCAPs ont la particularité d'appartenir à un tissu en cours de développement. Ainsi, contrairement aux DPSCs présents dans la pulpe mature, les SCAPs sont les précurseurs de la pulpe radiculaire. Du fait de leur plus grande immaturité, on peut supposer qu'elles possèdent de plus grandes capacités de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement faisant d'elles une source de progéniteurs précoces de plus grand intérêt en ingénierie tissulaire [31]. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence leurs capacités de prolifération et d'auto-renouvellement supérieures aux DPSCs [35, 48], aux SHED et aux PDLSCs. Ceci se traduit par une augmentation de l'activité de la télomérase, un taux de brdU et une expression de survivine plus importants. Il s'agit d'un véritable atout en ingénierie tissulaire d'autant plus que, dans le cas des cellules souches d'origine dentaire, la source et la quantité de cellules prélevées se limitent aux dents en cours de formation à extraire (quatre germes de dents de sagesse). Autrement dit, il s'agit d'une source cellulaire limitée et éphémère.

Les cellules souches de la papille apicale semblent posséder un fort potentiel de différenciation. En effet, des études ont mis en évidence leur capacité à se différencier en plusieurs lignées cellulaires *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, dans de bonnes conditions on peut observer une différenciation en cellules odontoblastiques, en cellules ostéoblastiques, en cellules neurales, en cellules musculaires et en cellules adipeuses [31]. De surcroît, les SCAPs présentent de meilleures capacités de minéralisation que les DPSCs.

Enfin, la collecte des germes dentaires est une pratique courante et non invasive qui peut être réalisée chez l'adulte comme chez l'enfant. La collecte des SCAPS implique un très faible sacrifice tissulaire. De plus, ces cellules ne résident pas dans la chambre pulpaire mais bien au niveau de la papille apicale, tissu conjonctif facilement détachable de la racine en cours de formation.

Ainsi, les nombreux avantages que représente cette source de cellules souches en font une population de grand intérêt en ingénierie tissulaire. C'est pourquoi, malgré le peu de données

de la littérature existant à leur sujet, notre étude a porté sur les SCAPs. Il est important de souligner cependant qu'il s'agit d'une source éphémère, principal inconvénient des cellules souches issues d'un tissu en cours de formation.

- Exemple d'application de l'ingénierie à l'organe dentaire

L'expérience de Sonomaya a pour but de former de novo une racine fonctionnelle *in vivo* à partir de cellules souches dentaires [48]. La racine ainsi créée doit être capable à la fois de supporter une couronne en porcelaine mais aussi de se connecter avec le parodonte environnant. Pour ce faire, Sonomaya et son équipe tentent de mimer les conditions physiologiques en utilisant deux populations de cellules souches dentaires : les SCAPs et les PDLSCs et ainsi permettre la régénération radiculaire d'une part et la formation de son parodonte d'autre part. Les SCAPs sontensemencées sur un support d'HA/TCP (Hydroxyapatite/ Tricalcium Phosphate) recouvert d'un gel contenant des PDLSCs. L'incisive mandibulaire d'une souris immunodéprimée est ensuite extraite puis remplacée par le tissu hybride. Trois mois après l'implantation dans l'alvéole, un examen histologique ainsi qu'un CT scan mettent en évidence le développement d'un tissu minéralisé semblable à la racine dentaire et la présence d'un espace desmodontal autour de celle-ci. Une couronne en porcelaine est ensuite posée afin de tester la capacité de la racine néoformée à supporter les contraintes à la compression. Au bout de six mois, l'étude révèle que la racine possède une meilleure résistance à la compression que le support d'HA/TCP initialement utilisé mais reste cependant moins résistante qu'une racine naturelle. Cette expérience suppose l'existence de cellules souches dentaires capables, une foisensemencées sur un «scaffold» adapté, de régénérer *in vivo* une racine dentaire fonctionnelle capable de se connecter à son parodonte et de supporter une couronne.

Après avoir choisi la source cellulaire idéale, le chercheur doit sélectionner une matrice adéquate, support indispensable à la réalisation d'un produit d'ingénierie tissulaire.

2.2.3 «scaffolds» ou échafaudages

Le «scaffold», d'origine naturelle ou synthétique, est un élément clé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Dévolu au soutien des cellules, il définit les microenvironnements tridimensionnel et fonctionnel du tissu à régénérer. Cette structure temporaire doit être

capable de mimer les fonctions physiologiques de la matrice extracellulaire (MEC) c'est-à-dire sa composition chimique, sa structure physique et sa fonction biologique [3]. La MEC joue un rôle essentiel dans l'architecture tissulaire et dans la régulation des fonctions cellulaires. Ainsi, par le jeu d'interactions avec les cellules, la matrice extra-cellulaire assure-t-elle l'équilibre et la cohésion tissulaire [3]. Les propriétés physico-chimiques de la matrice artificielle doivent être spécifiques au tissu/organe à reconstruire et mimer au mieux la MEC afin de promouvoir les interactions cellulaires, favoriser leur colonisation, guider leur différenciation et permettre la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire [49]. Dans l'optique d'élaborer la structure tridimensionnelle la mieux adaptée à la régénération osseuse, les biomatériaux utilisés dans la substitution du tissu osseux doivent répondre à divers critères et prendre en compte les caractéristiques biologiques et physicochimiques de l'os [50-52] :

- Biocompatible: différente de la tolérance à un matériau, elle suppose une réponse appropriée de l'hôte [53]. Le «scaffold» ne doit pas provoquer de réactions inflammatoires importantes, ni de toxicité au niveau des tissus receveurs. Il doit être non carcinogène, non immunogène, et entièrement résorbable dans le cas de biomatériaux résorbables.

- Bioréactif: les substituts osseux doivent permettre la néoformation osseuse et créer une véritable liaison chimique avec l'os. Pour cela ils doivent être :

- Ostéoconducteurs : autoriser l'adhésion, l'invasion des cellules, le développement d'un réseau vasculaire et le dépôt de tissu osseux en contact direct avec le matériau sans aucune interposition fibreuse [53, 54].

- Ostéoinducteurs : capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable. Les facteurs d'ostéoinduction favorisent la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques [53]. De nombreux facteurs conditionnent la qualité de l'ostéoinduction et de l'ostéoconduction : la nature du biomatériau mais également sa composition chimique et ses propriétés de surface (micro/ nano-topographie) [5].

- Ostéogéniques en possédant en leur sein des précurseurs ostéoblastiques pouvant se différencier en cellules osseuses matures.

- Biodégradable : la dégradation du «scaffold» doit se faire en tandem avec la régénération tissulaire et le remodelage de la MEC [3]. Il s'agit d'un juste équilibre entre la stabilité du biomatériau dans le temps et sa résorption rythmée par la néo-formation tissulaire. La vitesse

de résorption du «scaffold» doit pouvoir être contrôlée, prévisible et reproductible [53]. Enfin, les substances libérées lors de la dégradation ne doivent pas être toxiques ni interférer avec les tissus environnants.

- Résistant : propriétés mécaniques suffisantes pour supporter les contraintes de la fonction de l'os (contrainte à la rupture en compression, module d'élasticité) [3]. Celles-ci dépendent du site osseux à régénérer. En effet, il est important de souligner que les propriétés mécaniques de l'os humain varient selon leur fonction et leur localisation [5].

- Malléable : la forme et la taille des matrices doivent permettre leur intégration parfaite dans le défaut et assurer une bonne stabilité primaire. Le support doit être malléable, c'est-à-dire facilement manipulable lors de la chirurgie. Les biomatériaux injectables sont de plus en plus privilégiés pour rendre les interventions chirurgicales les moins invasives possibles.

- Mimétisme architectural : l'architecture tridimensionnelle des matrices doivent mimer au mieux l'architecture de l'os. Les propriétés de surface (chimiques et physiques), la macrostructure et microstructure (porosité, interconnectivité...) sont des paramètres cruciaux à combiner au mieux lors de l'élaboration des matériaux [55]. Ainsi, les propriétés de surface chimiques (hydrophobicité, polarité, ligand, molécules bioactives) et physiques (micro/nanotopographie, rugosité, cristallinité) doivent-elles être compatibles avec l'attachement, la colonisation et la prolifération des cellules [56]. Elles doivent également favoriser les interactions entre le support et les cellules, permettre la différenciation cellulaire et la production d'une nouvelle matrice extra-cellulaire. De même, la porosité (macroporosité et microporosité) et l'interconnectivité des pores sont deux paramètres essentiels ayant un impact direct sur l'ostéoconductivité, la qualité de la vascularisation, la diffusion des nutriments, la capacité de prolifération et de migration des cellules [51, 56]. La taille des pores est également un facteur important [57]. Dans le cas de matrices construites avec des pores de petites tailles (< 200 μm) la formation osseuse et la survie cellulaire sont limitées à leur périphérie. Ceci est principalement dû à la difficulté de diffusion des nutriments et de l'oxygène au cœur de la matrice [5, 56]. La taille optimale des pores semble se situer entre 300 et 900 μm .

- Normalisé : le « scaffold » doit être fabriqué avec des matériaux agréés par les organismes nationaux et internationaux de normalisation.

Dans le cadre de l'ingénierie du tissu osseux, les principaux biomatériaux utilisés sont les céramiques, les polymères synthétiques ou les polymères naturels (**Tableau 2**). Malgré les avancées faites ces dernières années, les exigences du cahier des charges rendent difficiles l'élaboration d'un «scaffold idéal» ; en effet, la création d'un substitut osseux réunissant à la fois la biocompatibilité, les propriétés mécaniques et la bioréactivité, reste un défi difficile à relever. Face à cette constatation, de nombreux chercheurs proposent le développement de «scaffold» biomimétiques associant polymères et céramiques [5, 39, 58]. Ces matrices hybrides permettent de combiner les qualités des différents matériaux tout en s'affranchissant de leurs limites [16].

FAMILLES	MATERIAUX		AVANTAGES	INCONVENIENTS
CERAMIQUES [16, 53]	<u>Origine synthétique</u> Biocéramiques Phosphocalciques - CP - HA - HA-TCP - TCP	<u>Origine naturelle</u> - Verre bioactive - Corail	- Composition voisine à la phase minérale de l'os - Biocompatible - Ostéoinducteur - Bonne adhérence	- Biodégradation longue et imprévisible - Propriétés mécaniques insuffisantes (matériau fragile/faible résistance à la rupture)
HYDROGELS/ POLYMERES NATURELS [16]	<u>Protéines</u> - Collagène - Soie - Fibrine	<u>Polysaccharides</u> - Alginate - Cellulose - GAG - HA - Chitosan	- Biocompatible - Biodégradable/ Non toxique - Faible coût - Mimer propriétés MEC - Bonne différenciation et prolifération cellulaire	- Propriétés mécaniques faibles - Faible stabilité dans le temps
POLYMERES SYNTHETIQUES	- PLA - PGA - PLGA		- Propriétés physiques - Taux de dégradation contrôlé	- Toxicité des produits de dégradation

Tableau 2: Les trois grandes familles de matériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.

CP (Calcium Phosphate), HA (Hydroxyapatite), TCP (Tri Calcium Phosphate), GAG (Glycosaminoglycane), PLA (Acide Poly-Lactique), PGA (Acide Poly-Glycolique), PLGA (Acide Poly-Lactique-Glycolique).

2.2.4 Les signaux

Au sein de l'organisme, les cellules communiquent par le biais de molécules de signalisation extracellulaires. Ainsi, sont-elles capables de proliférer, de se différencier, d'interagir, d'adapter leur comportement et leur activité en fonction de leur environnement. Le devenir d'une cellule dans l'organisme n'est pas figé, il dépend des différents signaux qu'elle reçoit.

Les signaux spatio-temporels sont utilisés en ingénierie tissulaire afin d'optimiser le développement d'un tissu/organe artificiel. Ils représentent le troisième élément de la triade. La connaissance et le choix judicieux de ces signaux vont permettre de contrôler le comportement cellulaire *in vitro*, de guider leur différenciation et optimiser la régénération tissulaire. On distingue deux types de signaux : biochimiques et biomécaniques.

2.2.3.1 Les signaux biochimiques

Dans le souci d'améliorer la bioactivité des matériaux, l'application de stratégies de fonctionnalisation des matrices est de plus en plus pratiquée. Ces techniques permettent, par la maîtrise de la chimie de surface de créer des motifs d'adhésion (RGD, YIGSR), des molécules ostéogéniques et angiogéniques (BMP, TGF, VEGF) ou des séquences d'ADN codant ces facteurs, de contrôler l'agencement et les répartitions des cellules sur le support, d'augmenter leur adhésion et influencer leur devenir *in vitro*.

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO), les matrices peuvent être fonctionnalisées par la manipulation de séquences peptidiques impliquées dans l'adhésion cellulaire [49, 53]. Il s'agit de modifier le support, de l'enrichir en peptides d'adhésions plus ou moins spécifiques aux cellules d'intérêt, et d'augmenter l'adhésion des cellules. L'utilisation de molécules bioactives peut également améliorer l'activité des matériaux. Les plus fréquemment utilisées en ITO sont les facteurs de croissance TGF- β , les BMP, FGF, PDGF, IGF et VEGF. Ces facteurs ont un rôle crucial dans le recrutement, la prolifération et/ou la différenciation des cellules. Il s'agit, grâce à l'utilisation de ces molécules bioactives, de favoriser l'angiogenèse et l'ostéogenèse, de contrôler et de moduler dans le temps la réponse biologique [53].

2.2.4.2 Les signaux biomécaniques

In vivo, tous les tissus sont soumis, à différents degrés, à des contraintes biomécaniques. Afin de garantir leur stabilité, tester leur résistance et améliorer leurs propriétés, il est donc nécessaire de pouvoir assurer *in vitro* la production de produits d'ingénierie tissulaire en mimant les conditions biomécaniques présentes *in vivo*.

Le bioréacteur présente un intérêt considérable en ingénierie tissulaire par sa capacité à cultiver des cellules en trois dimensions dans des conditions se rapprochant au plus près de celles observées *in vivo*. Son rôle est donc d'assurer le développement *in vitro* d'un tissu artificiel sous l'action de forces mécaniques auxquelles ils seront confrontés après implantation (pulsatile, tension, compression, contraintes de cisaillement) [53]. Le bioréacteur va permettre de s'affranchir des inconvénients de la culture cellulaire statique en augmentant la distribution cellulaire à l'intérieur du «scaffold», leur activité et la sécrétion de matrice osseuse [59, 60]. La culture sous contraintes va pouvoir assurer le développement du biomatériau dans un environnement où l'apport en oxygène et en nutriments, le pH, la température mais aussi l'évacuation des déchets sont assurés et contrôlés [14]. Dans le cas de l'os, tissu en remaniement permanent, les contraintes mécaniques entraînent la sécrétion de différents facteurs stimulateurs de la formation osseuse. Ainsi, les forces de compressions *in vivo* (« fluid shear stress ») favorisent-elles la production de phosphatase alcaline, prostaglandine, le collagène de type 1 ainsi que la prolifération et différenciation des ostéoblastes [60]. Au contraire, l'absence de stimulations biomécaniques peut entraîner une résorption/perte osseuse.

Réussir à appliquer des conditions biomécaniques au sein d'un biomatériau permet de promouvoir le développement du tissu osseux artificiel et représente un avantage considérable en ingénierie tissulaire [5].

2.2.5 L'ingénierie tissulaire osseuse : Exemples d'applications cliniques dans la sphère orale et maxillo-faciale

Les applications de l'ingénierie tissulaire osseuse chez l'homme dans la sphère orale et maxillo-faciale restent aujourd'hui limitées et représentent deux indications principales :

- La régénération de petits défauts osseux post-extractionnel ou pré-implantaire.

La perte osseuse observée suite à une maladie parodontale ou après une extraction dentaire entraîne des changements structuraux fréquemment irréversibles et pour lesquels la pose d'implants dentaires devient compromise. L'ingénierie tissulaire, dont l'objectif est de recréer, restaurer la fonction d'un tissu lésé, a déjà montré des résultats très prometteurs dans la régénération de petits défauts osseux. Cette technique, dont les résultats semblent similaires aux méthodes de référence, présente le précieux avantage de ne nécessiter d'aucun prélèvement autologue, source fréquente de douleurs et de morbidité.

L'expérience de d'Aquino et son équipe a mis en évidence la capacité des DPSCs à régénérer *in vivo* de l'os alvéolaire au niveau d'un défaut osseux de 1,5cm, apparu suite à l'extraction d'une dent de sagesse mandibulaire et ne permettant pas une réparation spontanée de l'os [47]. Les cellules autologues de la pulpe dentaire sontensemencées sur un «scaffold» de collagène puis implantées *in vivo*. Au bout de quelques mois, une néoformation osseuse est observée au niveau de l'os alvéolaire (**Figure 5**). L'étude histologique d'échantillons osseux prélevés au niveau du site implanté met en évidence la présence d'un tissu osseux vascularisé et bien organisé avec une architecture lamellaire. La différenciation des DPSCs en ostéoblastes et la régénération osseuse est confirmée par l'expression de protéines osseuses (Ostéonectine, Ostéocalcine, Phosphatase alcaline) et la présence de facteurs de croissance impliqués dans la formation du tissu osseux (BMP-2 et VEGF).

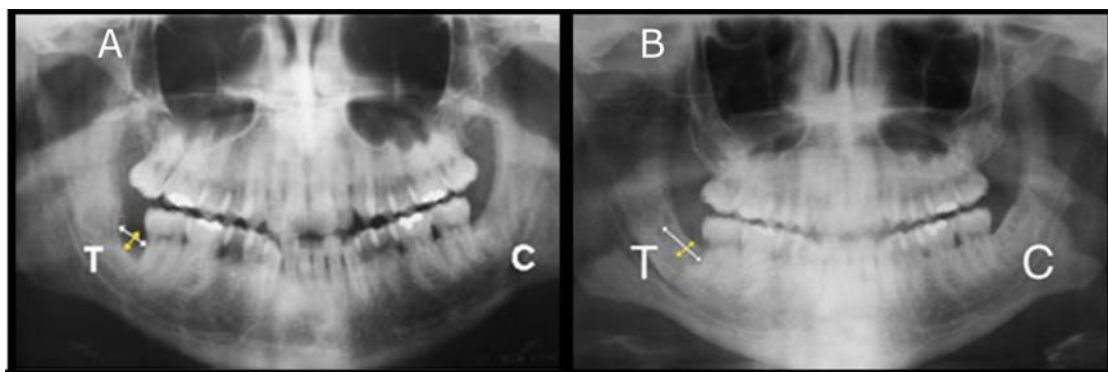


Figure 5 : Régénération d'un défaut osseux mandibulaire par implantation d'un produit d'ingénierie tissulaire composé de DPSCs et de collagène, d'après d'Aquino *et al.* [47]

A: Radiographie panoramique de contrôle à 7 jours post-opération. B: Radiographie panoramique de contrôle à 1 an post-opération (T: site Test. C : site Contrôle).

L'avantage de l'ingénierie tissulaire osseuse réside dans l'élaboration de protocoles chirurgicaux moins invasifs qui éliminent la morbidité due aux prélèvements d'autogreffe. Cependant, la principale limite est liée à l'ensemencement cellulaire qui reste approximative et aléatoire. Les méthodes actuelles ne permettent pas de contrôler la densité ni l'organisation cellulaire au sein des biomatériaux.

- La reconstruction de grands défauts osseux mandibulaire et maxillaire.

Les premières séries de cas dans la reconstruction mandibulaire ont montré des résultats encourageants. L'équipe de Warnke a rapporté la reconstruction d'un grand défaut osseux chez un patient ayant subi 8 ans plus tôt une mandibulectomie (plus de 7 cm) suite à l'exérèse d'une tumeur [61, 62]. Les objectifs principaux étaient la vascularisation du greffon, sa stabilité primaire et sa résistance mécanique. Un grillage de titane a été confectionné à l'aide d'un CT scan afin de respecter au mieux la morphologie de la mandibule du patient. Une matrice d'hydroxyapatite préalablement recouverte de BMP-7 et ensemencée par des cellules stromales autologues de moelle osseuse a ensuite été insérée dans la cage. Afin d'initier une prévascularisation *in vivo*, la cage a été placée au niveau du muscle dorsal du patient. Au bout de 7 semaines, le greffon mandibulaire a été prélevé avec le pédicule vasculaire puis implanté au niveau du site à régénérer. Cette opération a permis d'améliorer les conditions de vie du patient, tant sur un plan esthétique que fonctionnel.

Plus récemment, l'expérience de Mesimäki *et al.* a permis la reconstruction d'un grand défaut maxillaire après hémimaxillectomie chez un patient présentant un kyste épidermoïde maxillaire récidivant, traité sans radiothérapie [63]. Le protocole reposait sur l'utilisation de cellules souches adipeuses autologues prélevées au niveau du tissu adipeux abdominal. Après amplification *in vitro*, ces cellules ont été ensemencées sur une matrice phosphate tricalcique fonctionnalisée à l'aide de BMP-2. Deux semaines après, la matrice cellularisée a été introduite dans une cage de titane puis insérée au niveau du muscle droit de l'abdomen afin de créer une prévascularisation *in vivo* du produit d'ingénierie tissulaire. Le greffon prévascularisé a ensuite été implanté sur le site lésé. La régénération osseuse et la vascularisation ont été objectivées huit mois après à l'aide d'une biopsie et des examens complémentaires (**Figure 6**). Un an après l'opération, quatre implants ont pu être posés au niveau du site osseux néoformé avec une bonne stabilité primaire et une bonne intégration (**Figure 6-C**).

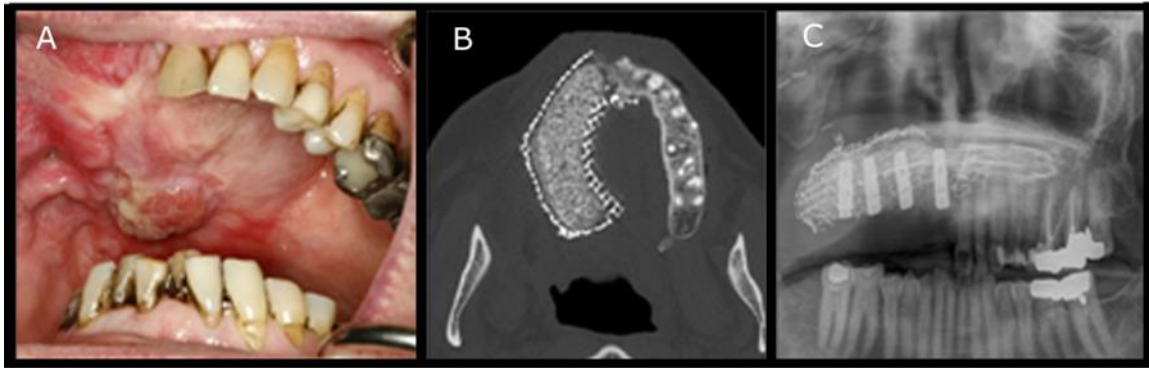


Figure 6: Implantation *in vivo* d'un tissu osseux artificiel issue d'une stratégie d'ingénierie tissulaire, d'après Mesimäki *et al.* [63]

A/ vue intrabuccale après implantation du greffon *in vivo*. B/ Scanner mettant en évidence une bonne intégration et une bonne régénération osseuse. C/ Radiographie panoramique de contrôle après pose de quatre implants sur le site osseux néoformé.

Ces expériences mettent en évidence les avancées considérables de l'ingénierie tissulaire osseuse dans la reconstruction de grands défauts osseux. Elles mettent également en lumière les limites des méthodes actuelles, freinant considérablement l'application clinique chez l'homme. Les échecs thérapeutiques peuvent être liés à plusieurs facteurs :

- Un défaut d'ajustage des greffons
- Une mauvaise résistance mécanique des implants [62]
- Un ensemencement cellulaire fait «à l'aveugle» : l'organisation et la répartition des cellules au sein d'une matrice 3D de grand volume sont impossible à contrôler.
- Un manque de vascularisation des implants, en particulier sur un terrain fragilisé par les traitements antérieurs (radiothérapie). Bien que la technique de prévascularisation *in vivo* soit une solution encourageante, elle reste une technique très invasive nécessitant plusieurs sites chirurgicaux.

2.2.6 Limites de l'ingénierie tissulaire «basée sur scaffold»

Les principaux travaux d'ingénierie tissulaire actuels sont basés sur l'utilisation d'un «scaffold» biodégradable mimant la matrice extra-cellulaire,ensemencé avec des cellules et potentialisé par l'apport de signaux biochimiques et biomécaniques. Cette technique a permis d'effectuer des avancées considérables avec la construction de tissus artificiels déjà implantés chez l'homme (comme la peau, les vaisseaux ou la vessie). Cependant, les applications cliniques restent limitées face à des tissus/organes plus complexes comme le tissu osseux :

- La distribution des cellules *in vivo* au sein du «scaffold» n'est pas totalement maîtrisée. Malgré les nombreux procédés existants pour tenter de pallier les problèmes d'ensemencement cellulaire (architecture des «scaffolds», utilisation de bioréacteurs, maturation *in vivo*), on observe bien souvent une concentration élevée de cellules à la surface du «scaffold» uniquement. La partie interne de la matrice quant à elle, est faiblement colonisée ce qui limite la reconstruction tissulaire. Pour répondre à ces limites, des stratégies et technologies récentes orientées vers le prototypage rapide des «scaffolds» et la micromanipulation d'éléments biologiques (Bioprinting) se sont développées [4, 64]. Ainsi, la stratégie de microimpression d'éléments assistée par laser (LAB = Laser Assisted Bioprinting) semble-t-elle être une approche prometteuse pour maîtriser l'organisation des cellules dans des tissus en 2D ou 3D. Dans nos travaux de recherche, nous avons utilisé cette technique d'écriture directe qui offre la possibilité d'imprimer des motifs avec une haute résolution spatiale et ainsi de s'affranchir des limites inhérentes aux «scaffolds». Assurer la pénétration des cellules, maîtriser leur distribution spatiale et contrôler leur densité au sein du biomatériau tridimensionnel restent un véritable challenge pour le chercheur.

- Force est de constater que la vascularisation, au cœur de la néo-formation osseuse, de sa maturation et de son intégration dans l'organisme, reste insuffisante au cours des premières phases d'implantation *in vivo* [1]. En effet, l'angiogenèse naturelle se met en place trop lentement pour assurer à elle seule la vascularisation complète de l'implant. La diffusion des nutriments et de l'oxygène à partir des capillaires ne dépassant pas quelques μm , il est indispensable de trouver une solution et d'intégrer au sein de l'implant une vascularisation de supplément afin d'éviter une nécrose des tissus formés par ingénierie tissulaire [2, 3] (**Figure 7**). Indispensable au développement de l'os et à sa survie *in vivo*, la vascularisation représente aujourd'hui un réel défi en ingénierie tissulaire.

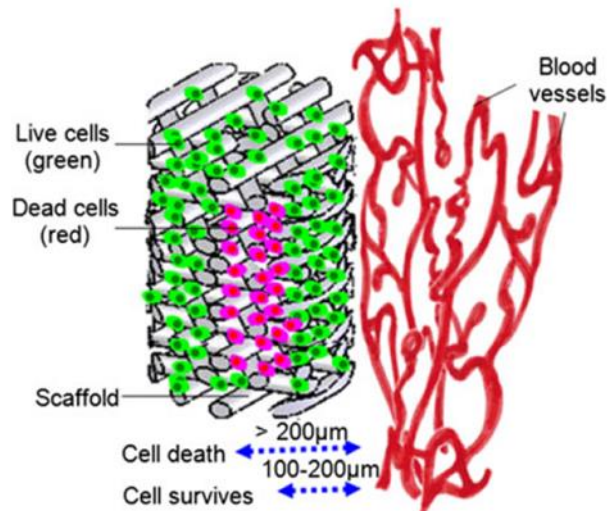


Figure 7 : Illustration reflétant l'étroite relation entre la vascularisation et la survie cellulaire liée à une distance critique, d'après Liu *et al.* [2]

2.2.7 Les solutions pour pallier les limites d'un produit d'ingénierie tissulaire osseux «basé sur scaffold»

2.2.7.1 Les stratégies de vascularisation existantes en ingénierie tissulaire osseuse

Après implantation *in vivo* du produit d'ingénierie tissulaire, une vascularisation spontanée se met en place, principalement due à la réponse inflammatoire locale. Cette angiogenèse naturelle et spontanée se développe progressivement et permet l'intégration de produits d'ingénierie tissulaire fins tels que la peau ou la vessie. Cependant, dans le cas de tissus plus complexes ou plus volumineux tel que l'os, la croissance et la progression de cette angiogenèse restent trop lentes pour assurer à elles seules la distribution de nutriments et d'oxygène jusqu'au centre de la matrice transplantée [3]. Ainsi, malgré les nombreuses avancées réalisées au cours de ces dernières années, l'évolution de l'ingénierie tissulaire osseuse a fortement été altérée par l'insuffisance de vascularisation des tissus formés par ingénierie tissulaire après implantation *in vivo*, principalement lors de reconstruction de défauts osseux épais et volumineux [2]. Le manque de vascularisation représente un véritable obstacle au développement tissulaire entraînant une mauvaise intégration et une faible survie de l'implant [5]. Face à ce constat, des stratégies se sont développées afin de promouvoir l'intégration d'une néo vascularisation.

Parmi ces stratégies on retrouve principalement (**Figure 8**) [1, 3, 6] :

- La fonctionnalisation du matériau par l'apport des facteurs angiogènes
- L'architecture du matériau/ « scaffold »
- La fonctionnalisation du matériau par stimulations mécaniques
- La prévascularisation *in vivo*
- La prévascularisation *in vitro* par des cocultures cellulaires

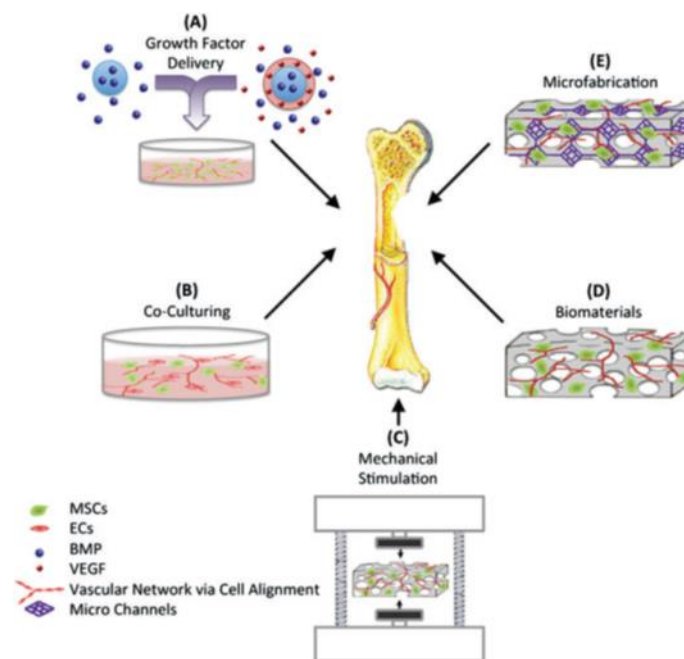


Figure 8 : Différentes stratégies de vascularisation, d'après Nguyen *et al.* [1]

A : Apport de facteurs de croissance. B : Système de Coculture. C : Stimulations mécaniques. D : Architecture du matériau. E : Techniques de microfabrication.

Dans le cadre de cette thèse, sera développée la stratégie de prévascularisation *in vitro*, stratégie utilisée lors de notre étude expérimentale.

2.2.7.2 La prévascularisation *in vitro* : principes

La prévascularisation *in vitro* représente une des grandes stratégies permettant de favoriser la vascularisation d'un tissu issu de l'ingénierie tissulaire. Il ne s'agit pas d'une perfusion instantanée d'un produit d'ingénierie tissulaire mais bien de la création d'une vascularisation *in vitro* grâce à l'élaboration de cocultures cellulaires [3]. La prévascularisation *in vitro* repose sur l'utilisation de cellules endothéliales connues pour leur capacité à former des structures pré-vascularisées quand elles sont cultivées dans de bonnes conditions. Ces cellules vont par le jeu de communications étroites avec l'autre composante cellulaire de la coculture, permettre la formation d'un réseau pré-vasculaire parallèlement à la reconstruction tissulaire. Les vaisseaux vont croître à l'intérieur du matériau en construction jusqu'à la formation d'un réseau vasculaire *in vitro*. Après implantation *in vivo*, le réseau va s'anastomoser spontanément avec les réseaux vasculaires environnant et ainsi alimenter la construction. Avec cette approche, les vaisseaux de l'hôte n'ont pas besoin de croître dans l'ensemble de la construction mais seulement dans les régions périphériques. Cette stratégie permet ainsi de réduire considérablement le temps durant lequel l'implant a besoin d'être vascularisé [3].

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, les chercheurs utilisent l'intime coopération cellulaire qui existe entre les cellules ostéogéniques et les cellules du lignage endothélial pour assurer le développement d'un tissu osseux vascularisé [28]. Pour ce faire, la connaissance et la compréhension des mécanismes intervenant au cours de la communication ostéo-endothéliale sont indispensables [6]. Plusieurs travaux ont donc étudié le comportement des cellules ostéoblastiques et des cellules de la lignée endothéliale en coculture afin de mieux comprendre les principaux mécanismes intervenant. Les cellules ont la faculté d'interagir avec leur environnement et de modifier leur comportement grâce aux signaux biochimiques produits par des cellules adjacentes [6]. Elles communiquent entre elles, s'adaptent et collaborent pour créer un environnement physico-chimique favorable à leur développement. La coculture ostéo-endothéliale conduit les ostéoblastes à sécréter du VEGF en plus grande quantité que lorsqu'ils sont en monoculture et à promouvoir l'angiogenèse [65]. De même, les cellules endothéliales stimulent la différenciation des ostéoprogéniteurs *via* la production de facteurs de croissance tels que les BMPs ou les FGFs [1, 66]. On observe alors une régulation du phénotype ostéoblastique par une augmentation de l'expression de la phosphatase alcaline et du collagène de type I et une diminution du Cbfa1/Runx2 et de l'ostéocalcine [66]. Suite à l'élaboration d'une coculture entre des HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des CSMs humaines, Rouwkema et son équipe observent la formation de structures

capillaires-like *in vitro*. Ces structures prévasculaires restent stables après implantation *in vivo* chez la souris et s'anastomosent spontanément avec le réseau vasculaire de l'hôte [3]. Ainsi, les facteurs solubles libérés au sein de la coculture, induisent-ils une réorganisation spécifique des CEs conduisant à la formation de réseaux « capillaires-like » [65, 67] (**Figure 9**). Cette migration cellulaire, absente en monoculture, est également orchestrée via un contact direct « cellule-cellule » assuré par des canaux de connexons [9, 11].

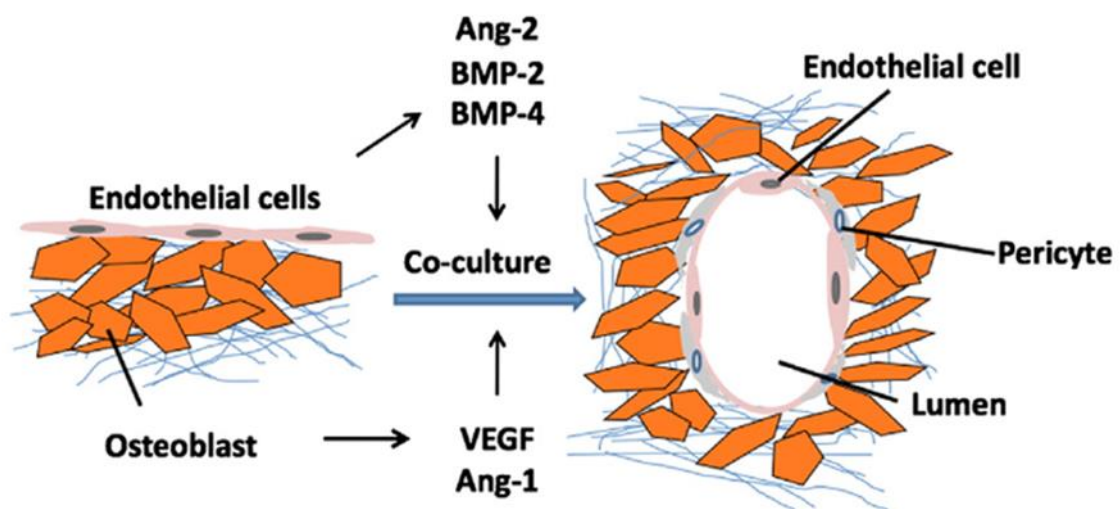


Figure 9: Schéma illustrant la réorganisation des cellules endothéliales en structure « capillaires-like » au sein d'une coculture ostéo-endothéliale, d'après Kirkpatrick *et al.* [65]

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux chercheurs ont étudié la communication complexe existant entre les cellules ostéoblastiques et endothéliales en élaborant des cocultures de cellules endothéliales et ostéoblastiques d'origines (BMMSCs, HUVEC...) et de degrés de plasticité différents (cellules matures, progéniteurs...). Si généralement l'origine des CEs et ostéoblastiques diffère, il serait cependant plus intéressant d'utiliser des cellules provenant d'une même source tissulaire [28, 68]. Ceci suppose de choisir une source cellulaire capable de se différencier vers le lignage ostéoblastique et endothélial. Le choix se porte majoritairement sur les cellules souches mésenchymateuses et en particulier les BMMSCs, très utilisées en ITO. Ces cellules, dont le degré de plasticité important est désormais bien établi, sont capables d'être orientées à la fois vers une voie de

différenciation ostéoblastique et endothéliale, et représentent donc une source de cellules idéale [28]. Cependant la technique de prélèvement des BMMSCs reste invasive et douloureuse (ponction de la moelle osseuse sous anesthésie générale) et présente un risque de morbidité du site donneur. De plus, elle ne permet de récupérer qu'un faible taux de cellules (1-2% des cellules totales de la moelle osseuse) souvent trop insuffisant pour entreprendre une stratégie thérapeutique [2]. Face à ce constat, nous avons orienté nos recherches vers une autre source de cellules souches mésenchymateuses facilement récupérable, possédant des caractéristiques de prolifération et de différenciation proches des BMMSCs et plus à-même d'être utilisée lors de traitement des affections de la sphère orale : les cellules souches d'origine dentaire.

Ainsi, dans le cadre de notre étude expérimentale, notre approche vise à appliquer une stratégie de prévascularisation *in vitro* par l'élaboration de cocultures. Celles-ci associent l'utilisation de précurseurs ostéoblastiques et endothéliaux obtenus à partir de cellules souches issues de la papille apicale (SCAPs) afin de faciliter les prélèvements, les manipulations mais également de favoriser une synergie dans la différenciation ostéoblastique et la création de structures de type capillaires.

III. ETUDE EXPERIMENTALE

3.1 LE PROJET IFRO

Le projet financé par l'IFRO et développé au sein de l'unité INSERM 1026, se définit comme « l'étude des interactions entre cellules endothéliales et ostéogéniques issues de cellules souches de la papille apicale dans des modèles de coculture obtenue par bioimpression laser ». Il vise à s'affranchir des deux principales limites rencontrées en ITO (l'ensemencement cellulaire et la vascularisation) en développant une stratégie de prévascularisation *in vitro* tout en contrôlant l'organisation spatiale des cellules via la bioimpression laser. Dans ce but, le projet s'articule autour de trois objectifs principaux :

- L'utilisation d'une même source de cellules souches : les SCAPs. Pour ce faire, l'objectif du projet est d'orienter les SCAPs dans une voie de différenciation endothéliale (=SCAPs-E) et ostéoblastique (=SCAPs-O).
- L'élaboration de systèmes de cocultures entre des SCAPs-O et SCAPs-E par bioimpression assistée par laser (LAB = Laser Assisted Bioprinting) permettant de contrôler l'organisation des cellules avec précision au sein du matériau. Le but étant de bioimprimer des cellules vivantes sur une matrice de collagène afin de maîtriser leur répartition spatiale en jouant sur les motifs d'impression et les distances intercellulaires.
- L'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la communication ostéo-endothéliale. A l'aide des modèles de coculture bioimprimés par laser, le projet vise à mettre en évidence les paramètres physiques et biologiques favorables à l'émergence de structures vascularisées (réorganisation cellulaire et création de réseaux de type capillaire) et le rôle des SCAPs-E dans la différenciation ostéoblastique. Ceci passe par l'observation de l'expression des marqueurs endothéliaux et ostéoblastiques en coculture en comparaison avec la monoculture (expression de la phosphatase alcaline, du facteur *cbfa1*, du collagène de type 1, ostocalcine, osteopontine, von Kossa) et l'étude des interactions entre cellules SCAPs-E et SCAPs-O en particulier le marquage des connexines 43.

Ainsi le projet IFRO présente-t-il un double intérêt :

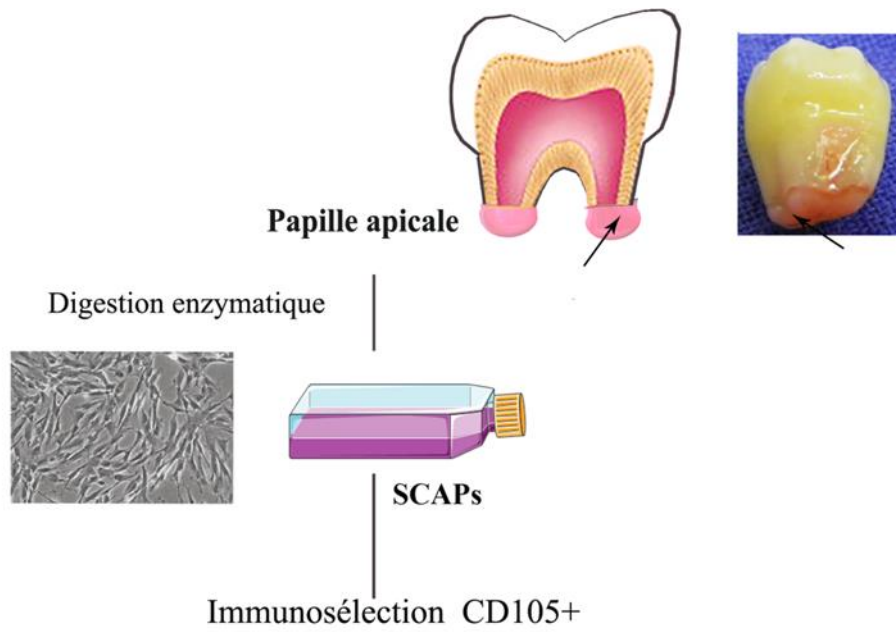
- Un intérêt cognitif : il participe à la compréhension des communications et des synergies intercellulaires.
- Un intérêt thérapeutique : il vise, dans un but lointain, à permettre la création de structures osseuses pré-vascularisées *in vitro* et implantables *in vivo* afin de régénérer de grands défauts osseux.

3.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

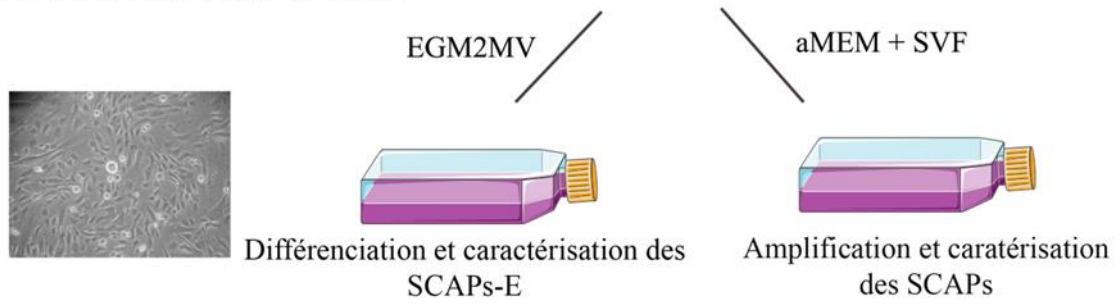
Notre travail de recherche a été réalisé au sein de l'unité 1026 INSERM sous la direction du Docteur Noëlie-Bruneilde Thébaud. Entrant dans le cadre de ce projet financé par l'IFRO, il visait à mettre en évidence l'intérêt des SCAPs en ingénierie tissulaire osseuse et plus précisément dans l'élaboration d'une coculture de progéniteurs ostéoblastiques/endothéliaux issus d'une même origine. Déjà utilisées dans le laboratoire comme précurseurs ostéoblastiques (SCAPs-O), nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle les SCAPs pouvaient également être orientées vers une voie endothéliale (SCAPs-E). Ces cellules présentaient l'avantage d'être issues d'un tissu en cours de développement et donc de posséder des progéniteurs précoces et immatures [17]. De plus, l'extraction de dents de sagesse étant un acte non invasif réalisé fréquemment, il s'agissait d'une source cellulaire facilement disponible sans risque de morbidité ni de douleurs pour le patient. Notre travail reposait également sur l'utilisation du LAB, outil de haute résolution permettant d'organiser et de distribuer des cellules selon un motif très précis afin de favoriser une synergie dans la différenciation et la réorganisation cellulaire.

Pour ce faire, notre étude expérimentale s'est articulée en trois parties (**Figure 10**) :

(1) Isolement SCAPs



(2) Différenciation endothéliale



(3) Bioimpression des SCAPS et PDECs assistée par laser

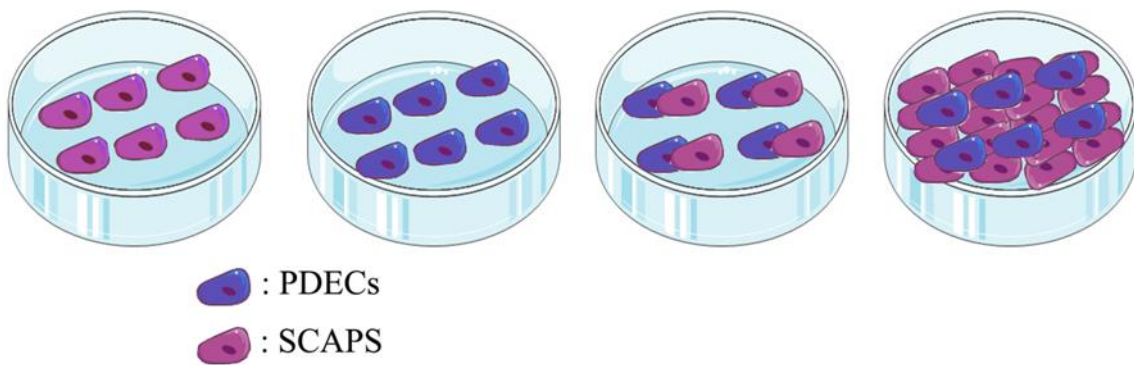


Figure 10: Objectifs de l'étude expérimentale

(1) Isolement et caractérisation des SCAPs à partir de germes de dents de sagesse

Nous avons isolé puis caractérisé des SCAPs à partir de germes de dents de sagesse selon le protocole décrit par Gronthos [69]. A partir de cette population cellulaire hétérogène, nous avons immuno-sélectionné une sous-population cellulaire à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD105. Le marqueur CD105 est une glycoprotéine membranaire également appelée endogline [70].

(2) Différenciation des SCAPs en SCAPs-E et caractérisation

Nous avons orienté les SCAPs CD105+ dans une voie endothéliale (SCAPs-E). Le suivi du phénotype endothélial a été réalisé à travers l'expression de marqueurs spécifiques CD31 (récepteur membranaire) et vWF (constituant intracellulaire). Le CD31 ou PECAM-1 (Platelet Endothelial Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine transmembranaire participant aux interactions intercellulaires. Sa localisation préférentielle au niveau des jonctions des cellules endothéliales fait d'elle un marqueur spécifique des cellules endothéliales. Le facteur de Von Willebrand (vWF) est une protéine intracytoplasmique située au niveau des corps de Weibel-Palade. Il s'agit d'un marqueur spécifique des cellules endothéliales qui joue un rôle indispensable dans la coagulation.

(3) Bioimpression des cellules assistée par laser

Nous avons utilisé le LAB (Laser Assisted Bioprinting) pour imprimer les cellules selon un motif précis. L'objectif de cette partie a été de préparer et d'imprimer des encres de cellules sur un substrat receveur, d'évaluer leur viabilité post-impression, la conservation de leur phénotype et de leurs capacités de prolifération. Au cours de cette expérience, deux types de cellules humaines ont été utilisés: les SCAPs et les PDECs (cellules endothéliales issues du sang de cordon ombilical). Le LAB utilisé au sein de l'unité 1026 INSERM est une station de travail dédiée à l'impression laser d'éléments biologiques. Cette station, appelée station LASIT (Laser pour l'Assemblage en Ingénierie Tissulaire) de NovaLase utilise la technique du Laser-Induced Forward Transfert modifiée (LIFT-modifié) [71].

Ce dispositif expérimental du LAB est composé de trois parties [64, 72] (**Figure 11**) :

-une source laser pulsée

-une lame donneuse : cible à partir de laquelle sont éjectées des cellules vivantes.

-une lame réceptrice ou biopaper : substrat receveur qui collecte les cellules. Le biopaper peut être composé de matériaux naturels comme le collagène ou la fibrine. Il est utilisé comme substrat pour améliorer la cohésion et les propriétés de structure du produit final. Ce receveur fait face à la lame donneuse avec une distance préétablie appelée entrefer.

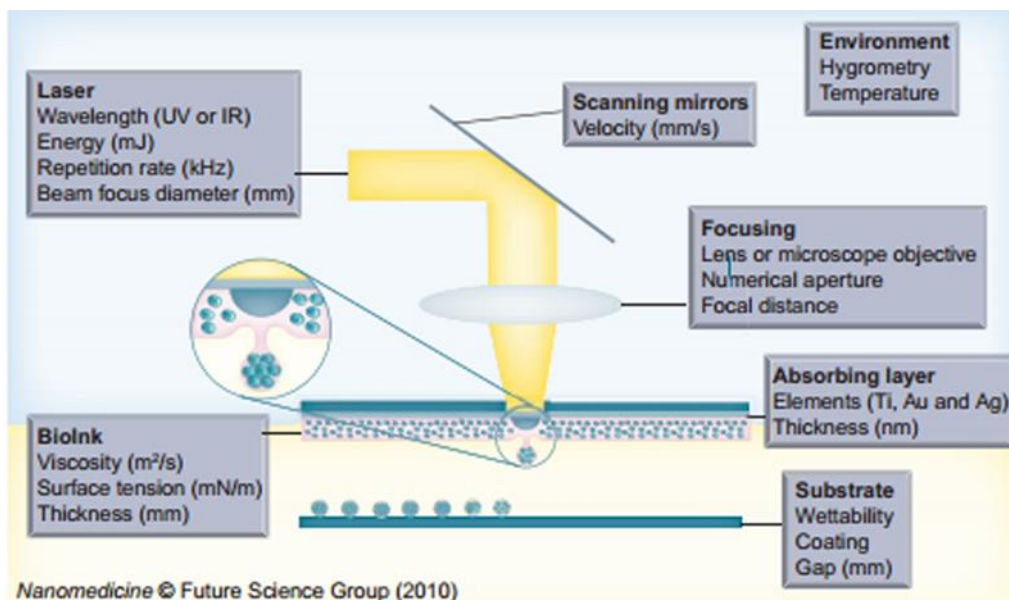


Figure 11 : Dispositif expérimental du LAB et les paramètres impliqués, d'après Guillemot *et al.* [64]

Cette technique permet de transférer de façon reproductible la bioencres sur le receveur sous la forme de gouttelettes. Pour ce faire, un faisceau laser focalisé à travers la lame donneuse transfère de l'énergie. L'énergie déposée génère un échauffement et la formation d'une poche de gaz au sein de la bioencres. Un jet de matière est alors éjecté vers la lame receveuse [64].

Trois régimes d'éjection peuvent être observés [64] (**Figure 12**) :

-Un régime sous-seuil ou « sub-threshold regime »: l'énergie apportée par le laser n'est pas suffisante pour séparer la bioencres du support. La bulle s'effondre et aucune matière ne se détache.

-Un régime de jet ou « jetting regime »: une poche de gaz est créée à l'interface support/bioencres. La bioencres se déforme, s'allonge et s'amincit puis, se fragmente en gouttelettes. C'est cet effet qui est recherché pour produire un bon transfert de matière.

-Un régime de panache ou « plume regime » : la poche de gaz formée à l'interface support/bioencres est plus importante et finit par rompre. Cette rupture conduit à l'éjection de multiples gouttelettes satellites qui vont se déposer sous forme de « spray » sur la lame réceptrice.

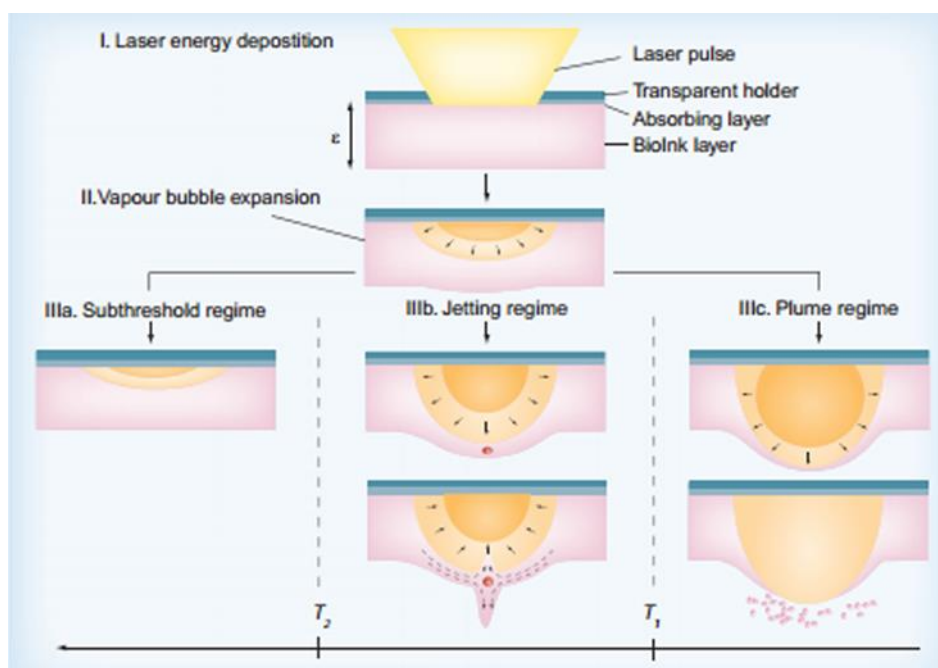


Figure 12 : Mécanismes et Régimes d'éjection induit par le laser, d'après Guillemot *et al.* [64]

La source est un laser solide Nd:YAG situé dans l'infrarouge (IR : longueur d'onde $\lambda=1064$ nm) et non dans l'ultra-violet dont le rayonnement présente un risque de dénaturation de l'ADN. La durée d'impulsion τ est de 30 ns et la fréquence de tirs laser f varie de 1 à 100 kHz. La divergence q ($q= 3:4$ mrad), le mode spatial TEM (TEM00), et la stabilité des impulsions ptp ($ptp < 1,5\%$ rms) représentent les qualités du faisceau. Ils doivent être pris en compte pour assurer la reproductibilité, la stabilité et la haute résolution du système.

3.3 MATERIELS ET METHODES

3.3.1 Isolement et culture des SCAPS

Les SCAPs ont été isolées à partir de la papille apicale de dents de sagesse collectées chez des adolescents ou de jeunes adultes après avoir récolté leur consentement éclairé ou celui de leurs parents (n=2). Les germes de dents de sagesse, extraits suite à une indication orthodontique, ont été placés dans un milieu de culture contenant du milieu α -Modification of Eagle's Medium (α -MEM, Gibco, Live Technologies SAS, Saint-Aubin, France) 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco, Live Technologies Karlsruhe, Allemagne), de la Pénicilline (100U/ml)/Streptomycine (100 μ g/ml) (Live Technology SAS) puis conservés à 4°C. Les dents ont ensuite été traitées au laboratoire selon les protocoles décrit par Gronthos [69] et Sonomaya [48], dans un délai inférieur à 48h afin d'éviter toutes contaminations bactériennes et dégénérescence cellulaire. Les papilles de chaque dent (**Figure 13**), préalablement nettoyées dans du HFF (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 5% SVF) ont été découpées en petits morceaux afin de faciliter la digestion enzymatique. Les petits morceaux de papilles apicales ont été incubés à 37°C dans une solution de collagénase-dispase, 3mg/ml de collagénase de type I (Worthington) et 4mg/ml de dispase 2 (Roche diagnostic), pendant une heure sous une agitation à 260 RPM et vortexés tous les quarts d'heure. Après une heure de digestion, la suspension cellulaire a été filtrée avec un filtre de 70 μ m afin de retirer les derniers débris non digérés. Les cellules ainsi obtenues ont étéensemencées dans une boîte de culture de 25 cm² contenant 5ml de milieu d'amplification (α -MEM, 20% de SVF et des antibiotiques (streptomycine/pénicilline) au 100ème) puis placées à l'étuve (5% CO₂ à 37°). Les milieux de culture ont été changés tous les deux à trois jours. Une fois arrivée à confluence (au bout de 12 à 15 jours), la population hétérogène de cellules issues des papilles apicales dentaires récoltée en utilisant de la trypsine (0,25% trypsin-EDTA, Gibco) puisensemencée dans une boîte de 75 cm² contenant 10 ml de milieu d'amplification.

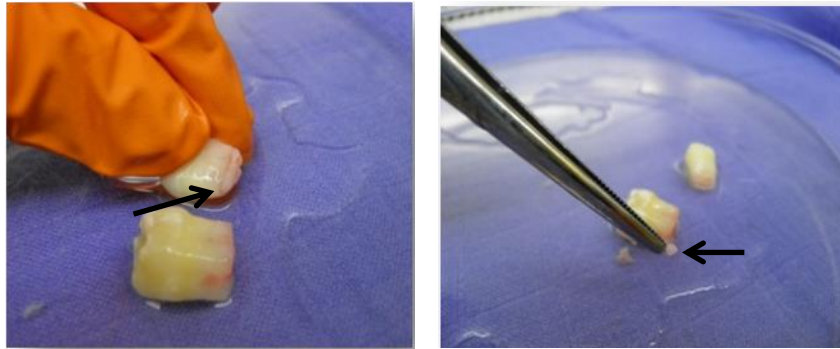


Figure 13 : Dents de sagesse immatures avec leurs papilles apicales

(Flèches noires)

3.3.2 Immuno-sélection des SCAPs par billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD105

L'immuno-sélection des SCAPs par billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD105 repose sur l'utilisation du système MACS® Cell Separation – Miltenyi Biotec (Paris, France). Les cellules arrivées à confluence ont été détachées à la trypsine puis mises en suspension dans 80µL de solution tampon (Phosphate Buffered Saline 1X (PBS), 0,5 % Bovine Serum Albumin (BSA), 2mM d'Ethylenediaminetetraacetic acide (EDTA)) et 20 µL de microbilles couplées à un anticorps anti-CD105 (valeurs pour une concentration inférieure ou égale à 1.10^7 cellules). Une fois homogénéisée, la solution cellulaire a été incubée 15 min à 4°C. Après ce délai, 1-2mL de solution tampon (pour 1.10^7 cellules) ont été ajoutés. Après avoir été centrifugées, les cellules ont ensuite été reprises dans 500µL de solution tampon puis introduites progressivement dans une colonne aimantée (MACS separator). Les cellules CD105+, retenues dans la colonne, ont ainsi été isolées. Une partie de la sous-population de SCAPs-CD105+ a ensuite été mise en culture dans une boîte de 25cm² en milieu d'amplification (α -MEM, 10% SVF). L'autre partie a étéensemencée sur des plaques recouvertes de collagène de type 1 dans des conditions de différenciation endothéliale.

3.3.3 Cytométrie en Flux – caractérisation des SCAPs

Les SCAPs, immuno-sélectionnées au CD105+ et cultivées en milieu d'amplification, ont été immunomarquées lors de leur sixième passage pour la cytométrie en flux. Sept tubes à essais de 5 ml ont été préalablement préparés : CD34, CD105, CD146, CD90-FITC (Fluorescein

Isothiocyanate), CD73-APC (Allophycocyanin), un tube témoin non marqué, un tube témoin avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 647 seul. Les SCAPs ont été fixées à l'aide de Paraformaldéhyde à 1% (PFA 1% : 1 ml pour 10^6 cellules) et laissées 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été réparties dans les différents tubes à essais ($5 \cdot 10^5$ cellules/tube) contenant 1 mL de PBS/BSA 1% puis centrifugées 5 minutes à 1200 rpm. Les cellules décantées ont été reprises dans 1 mL de PBS/BSA et laissées 30 minutes à température ambiante. Les trois tubes utilisés pour le marquage indirect (CD34, CD105, CD146) ont été décantés en veillant à laisser l'équivalent de 100 μ l de liquide. Après avoir ajouté 1 μ l d'anticorps primaire pur dans chaque tube, ils ont été laissés 1h dans l'obscurité à température ambiante. 1 à 2 ml de PBS/BSA 1% ont ensuite été ajoutés dans les trois tubes avant de les centrifuger. Les tubes marqués avec un anticorps primaire ont été décantés. Après avoir ajouté 100 μ l d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa 647 (rouge lointain) préalablement dilué au $1/400^{\text{ème}}$ de PBS/BSA 1%, ils ont été homogénéisés et laissés 1 h dans l'obscurité à température ambiante. Le tube témoin contenant seulement l'anticorps secondaire a été préparé selon le même protocole. Les deux tubes utilisés pour le marquage direct (CD90-FITC, CD73-APC) ont été décantés en veillant à laisser l'équivalent de 100 μ l de liquide. Après avoir ajouté 1 μ l d'anticorps pur dans chaque tube, ils ont été laissés 1h dans l'obscurité à température ambiante. 1 à 2 ml de PBS/BSA 1% ont été ajoutés dans tous les tubes avant de les centrifuger une dernière fois. Les culots ont ensuite été repris dans 500 μ l de PBS avant d'être analysés par cytométrie en flux (FACS).

3.3.4 Induction de la différenciation des SCAPs en SCAPs-E

Culture des SCAPs dans des conditions endothéliales

Des plaques de culture, 6 puits (puits de 10 cm^2), 12 puits (puits de 4 cm^2) préalablement enduites de collagène (collagène de type I, Rat tail, BD Biosciences) ont étéensemencées à différentes densités cellulaires (50.000cells/ cm^2 ; 10.000cells/ cm^2 ; 5.000cells/ cm^2 ; 1.000cells/ cm^2 ; 500cells/ cm^2 ; 50cells/ cm^2) dans un milieu de différenciation endothélial EGM-2 MV (Endothelial Cell Growth Media-2 MicroVascular, Lonza-Verviers, France). Ces conditions de cultures ont été utilisées pour obtenir des EPCs (Endothelial Progenitor Cells) à partir de CMN (Cellules Mononuclées) de sang de cordon [73]. Ce milieu de culture a été réalisé à partir du milieu Endothelial cell basal media-2 (EBM-2) SingleQuots (Lonza) supplémenté avec 5 % de SVF (25ml), des facteurs de croissances (0,5 ml hEGF, 0,2 ml

Hydrocortisone, 0,5 ml Gengtamyin/Amphotericin-1000, 0,5 ml VEGF, 2 ml hFGF-B, 0,5 ml R³-IGF-1, 0,5 ml Ascorbic Acide) ainsi que des antibiotiques à 0,1% (penicilline/streptomycine). Le milieu ainsi préparé a été filtré à l'aide d'un filtre 0,22 µl. Les milieux de culture sont changés tous les trois jours.

3.3.5 Caractérisation des SCAPs-E

3.3.5.1 Immunofluorescence

Le marquage des SCAP-E en passage 6 a été réalisé sur des plaques 4 puits de 2cm² avec une densité d'ensemencement de 500 cellules/cm². Des témoins positifs et négatifs ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales. Les témoins positifs étaient des progéniteurs endothéliaux issus de sang de cordon. Les témoins négatifs étaient des SCAPs en passage 6 cultivées dans des conditions de non induction endothéliales.

- Immunohistochimie pour le marqueur CD31

Les cellules préalablement fixées au PFA 4% ont été incubées 30 min à température ambiante dans une solution de PBS 1X – 1% de BSA afin de saturer les sites non spécifiques. Les cellules ont ensuite été incubées pendant deux heures à 37°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le CD31 (Ebioscience 14-0319-82 de Souris) dilués au 1/300^{ème} dans du PBS 1X -0.5% BSA. Les échantillons ont été rincés trois fois au PBS 1X puis incubés pendant 1 heure à 37°C avec un anticorps secondaire anti souris Alexa 488 dilué au 1/300^{ème} dans du PBS 1X - 0.5% BSA, à l'abri de la lumière. Après trois rinçages au PBS 1X, les noyaux cellulaires ont été marqués à l'aide du marqueur Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®, France, 25 µg/ml) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS 1X.

-Immunohistochimie pour le vWF

Les cellules, préalablement fixées au PFA 4%, ont été perméabilisées avec du méthanol (500 µl par puits de 2 cm²) pendant 10 minutes sur de la glace. Elles ont ensuite été incubées 30 min à température ambiante dans une solution de PBS – 1% de BSA. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 heures à 37°C avec un anticorps primaire dirigé contre le vWF (DAKO A0082 de lapin) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS-0.5% BSA. La couche cellulaire a été rincée trois fois au PBS 1X puis incubée pendant 1 heure à 37°C avec un anticorps secondaire

anti lapin Alexa 488 dilué au 1/300^{ème} à l'abri de la lumière. Les noyaux cellulaires ont été marqués au Hoechst 33342.

3.3.5.2 Polymérase Chain Reaction – PCR

L'extraction de l'ARN des deux types cellulaires (SCAPs et SCAPs-E en passage 6) a été réalisée à l'aide du RNeasy miniKit. Chaque culot cellulaire (entre 1.10^6 et 3.10^6 cellules par culot) a été transféré dans des Eppendorfs contenant 600 μ L de tampon de lyse et 10 μ L/ml de β mercaptoéthanol. Après avoir été « flushé », chaque échantillon reçoit 600 μ L d'éthanol à 70%. La suspension ainsi obtenue a ensuite été introduite progressivement dans une colonne de centrifugation. Les ARNs ont été retenus dans la colonne tandis que le reste, élué à travers le filtre, a été jeté.

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) a été réalisée à partir des fragments d'ARN, d'eau stérile et d'un Mix de transcription inverse (1 μ L oligoDT, 1 μ L de reverse transcriptase (RT), 1 μ L dNTP (nucléotides), 2 μ L DTT, 2 μ L MgCl₂ 50mM, 4 μ L de Tampon 5X). La préparation, réalisée sur glace pour éviter l'activation de la transcription inverse et la dégradation des ARN et ADN en contact, a ensuite été placée 50 minutes à 42°C sur une plaque chauffante afin d'activer la synthèse de l'ADNc.

La polymérisation en chaîne (PCR), réalisée dans un thermocycleur, nécessite l'utilisation d'une enzyme, appelée Taq Polymérase et d'une séquence amorce appelée « primer ». Chaque mix préparé pour la PCR était composé de 7.5 μ l Dream Taq Buffer 10X, 1.5 μ l dNTPs 10 mM, 0.75 μ l Dream Taq, 0.75 μ l de Primer Sens 10 μ M (P1) et 0.75 μ l de Primer Anti-Sens 10 μ M (P2). Les « primer » utilisés étaient : P0-sens 5'-ATG CCC AGG GAA GAC AGG GC-3' ; P0 anti-sens 5'-CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC -3', le primer pour le facteur de von Willebrand (vWf) sens 5'-CCC CTG AAG CCC CTC CTC CTA-3' ; anti-sens 5'- ACG AAC GCC ACA TCC AGA ACC-3' et le primer pour le CD31 sens 5'-CCT GCT GAC CCT TCT GCT CTG-3' ; anti-sens 5'- TAC AGT CGT GGT GGA GAG TGC-3'. Le P0, gène de ménage, a été utilisé comme témoin positif. Le cycle de chauffage a été répété un grand nombre de fois pendant environ deux heures (programme P0 humain), afin d'amplifier les séquences cibles. Il s'est décomposé en trois étapes : tout d'abord l'élévation de la température à 94°C afin de séparer les brins complémentaires, puis la diminution de la température à 55°C pour permettre une hybridation entre le primer et les brins, enfin une

augmentation de la température à 72°C (température d'activation de la Taq polymérase) pendant 1 minute.

Les produits de la PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel composé de 1,5% d'agarose dilué au Tris Acetate EDTA (TAE) 0,5X et de 5µl de Bromure d'Ethidium (BET) pour 100ml de TAE.

3.3.6 Bio-impression d'éléments biologiques assistée par Laser (LAB)

Les lames donneuses ont été nettoyées puis recouvertes d'une fine pellicule d'or. Cette couche d'or de 50 nm d'épaisseur a été déposée à l'aide d'un évaporateur Emscope SC500. Les SCAPs et les PDECs ont été « trypsinées » et comptées. Après centrifugation, les cellules ont été reprises dans leur milieu de culture de façon à obtenir 100 millions de cellules / ml. Trois types d'encre ont ensuite été préparés :

- Une encre de SCAPs seules
- Une encre de PDECs seules
- Une encre de SCAPs/PDECs

Une quantité de 33 µl d'encre a été étalée manuellement de façon la plus homogène possible sur la lame donneuse à l'aide de l'embout de la micro-pipette. Pour éviter toute contamination, les manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire.

Le biopaper ou lame réceptrice est une lame en verre stérile de 1,5 cm d'épaisseur et 3 cm de diamètre sur laquelle a été déposé 141µl de collagène de type I (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis). Le collagène conditionné à 9,67mg/ml a été dilué avec du milieu DMEM (Delbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) afin d'obtenir une solution finale concentrée à 2mg/ml. Après un étalement homogène de la solution sur la lame, celle-ci a été placée à l'étuve à 37°C dans une cassette humidifiée pour permettre la gélification du collagène tout en évitant son assèchement.

Dans le cadre de cette expérience, deux types de biopaper ont été réalisés:

- Un biopaper recouvert de collagène seul

-Un biopaper recouvert de collagène sur lequel des SCAPs ont été mises en culture à une densité d'ensemencement de 50.000 cellules/cm² 24h avant impression. Les cellules forment ainsi un véritable « lit » de SCAPs.

Quatre conditions de bioimpression ont ainsi été appliquées (**Figure 14**):

- 1- Bioimpression des SCAPs sur du collagène de type I (monoculture)
- 2- Bioimpression des PDECs sur du collagène de type I (monoculture)
- 3- Bioimpression d'un mélange SCAPs/PDECs sur du collagène de type I (coculture)
- 4- Bioimpression des PDECs sur un « lit » de SCAPs (coculture)

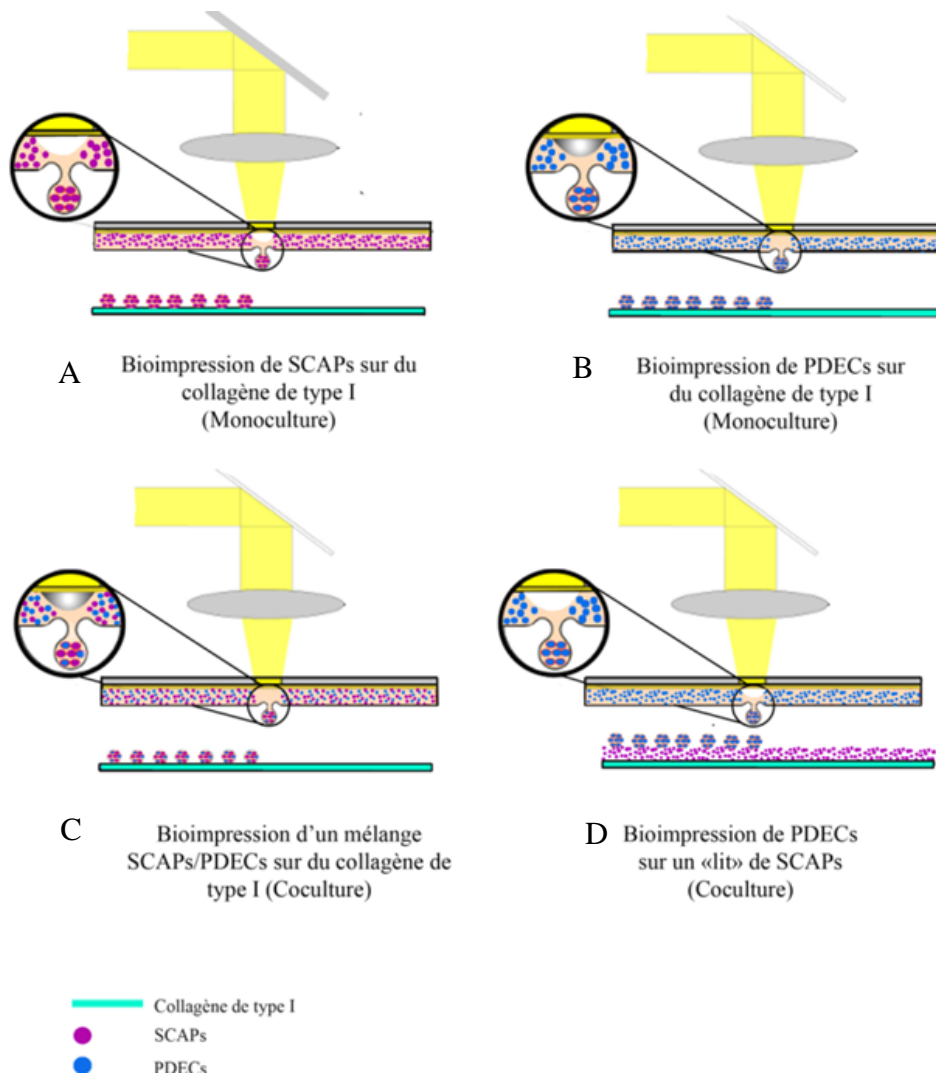


Figure 14 : Les quatre conditions de bioimpression.

A- Bioimpression des SCAPs sur du collagène de type I (monoculture). B- Bioimpression des PDECs sur du collagène de type I (monoculture). C- Bioimpression d'un mélange SCAPs/PDECs sur du collagène de type I (coculture). D- Bioimpression des PDECs sur un « lit » de SCAPs et sur du collagène de type I (coculture).

La lame réceptrice a été positionnée dans le carrousel face à la lame donneuse avec une distance idéale de 1000 μm . Puis les trois encres préalablement préparées (PDECs seuls, SCAPs seuls, coculture PDECs/SCAPs) ont été bioimprimées en faisant varier la puissance P du laser. En fonction de la nature de l'encre, de sa viscosité et de la température de la pièce, la puissance P pouvait varier de P29 mW à P33 mW. Les PDECs ont été bioimprimées sur deux types de biopaper : un biopaper de collagène de type I et un biopaper de collagène de type I recouvert d'un « lit de SCAPs ».

Le motif d'impression choisi correspondait à des lignes de 250 μm (distance intercellulaire) x 1000 μm (distance interlignes). Il a été appliqué grâce à l'utilisation du logiciel de pilotage développé à partir des logiciels Delphi® et Solidworks® dont la programmation est le résultat d'un long travail de recherche établi depuis 2007 au sein du laboratoire [64].

Après bioimpression, les échantillons (SCAPs seules imprimées sur collagène, PDECs seules imprimées sur collagène, coculture PDECs seules imprimées sur lit de SCAPs et coculture de SCAPs/PDECs imprimées sur collagène) ont été mis en culture dans des boîtes six puits avec leur milieu respectif auquel ont été ajoutés des antibiotiques au centième. Des SCAPs et des PDECs non imprimées ont été déposées à l'aide d'une pipette sur du collagène et sur du plastique afin de servir de témoins positifs. Les cellules ont été observées aux temps zéro, 24h, 48h et 72h en microscopie optique et au microscope confocal.

Coloration au Live/Dead

La coloration au Live/Dead a été réalisée à l'aide du kit Live/Dead Assay (Molecular Probes, Invitrogen, France). Les cellules ont été incubées 20 minutes, 5% CO₂, à 37°C dans une solution contenant 2 ml de IMDM, 10% SVF complétés de 2 μl de Calceïne (Calcein-AM) et 4 μl d'ethidium homodimer (EthD-1).

Immunofluorescence

-Immunohistochimie pour le facteur de von Willebrand (vWf)

Les cellules préalablement fixées au PFA 4% à 48h et 72h, ont été perméabilisées à l'aide d'une solution de PBS 1X/ Triton X100 0.1%. Elles ont ensuite été incubées 30 min à température ambiante dans une solution de PBS 1X/ BSA 1% afin de saturer les sites non spécifiques. Les cellules ont ensuite été incubées une heure à 37°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le vWf (DAKO A0082 Polyclonal Rabbit Anti-human) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS 1X /1%BSA. Après trois rinçages au PBS 1X, les échantillons ont été incubés une heure

à 37°C à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire anti-lapin Alexa 488 dilué au 1/400^{ème} dans du PBS 1X/1% BSA.

-Immunohistochimie pour le marqueur CD31

Les cellules préalablement fixées au PFA 4% à 48h et 72h, ont été incubées 30 min à température ambiante dans une solution de PBS 1X/ BSA 1%. Les cellules ont ensuite été incubées une heure à 37°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le CD31 (Ebioscience 14-0319-82 de Souris) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS 1X /1%BSA. Après trois rinçages au PBS 1X, les échantillons ont été incubées une heure à 37°C à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire anti-souris Alexa 568 dilué au 1/400^{ème} dans du PBS 1X/1% BSA. Les lamelles ainsi marquées ont ensuite été rincées, égouttées puis déposées sur du Parafilm. Après ajout du liquide de montage (molecular probes – Prolong® Gold antifade reagent with DAPI), les échantillons ont été analysés au microscope confocal.

3.4 RESULTATS

3.4.1 Isolement et caractérisation des SCAPs *in vitro*

Isolées par digestion enzymatique, les SCAPs ont ensuite été sélectionnées par des billes magnétiques CD105+ afin d'obtenir une sous-population cellulaire plus homogène. Après six passages, les propriétés des SCAPs mises en cultures dans un milieu d'amplification ont été étudiées. L'analyse de leur phénotype a été réalisée par cytométrie en flux et révèle la présence d'une combinaison de plusieurs antigènes de surfaces (**Figure 15**). Les cellules expriment fortement les principaux marqueurs des MSCs : CD90 (98,4%), CD73 (98,1%) et CD105 (98,1%). Le CD146 (MUC18), marqueur endothélial et le CD34, marqueur des cellules hématopoïétiques, sont présents dans de plus faibles proportions (34,1% et 46,2% respectivement).

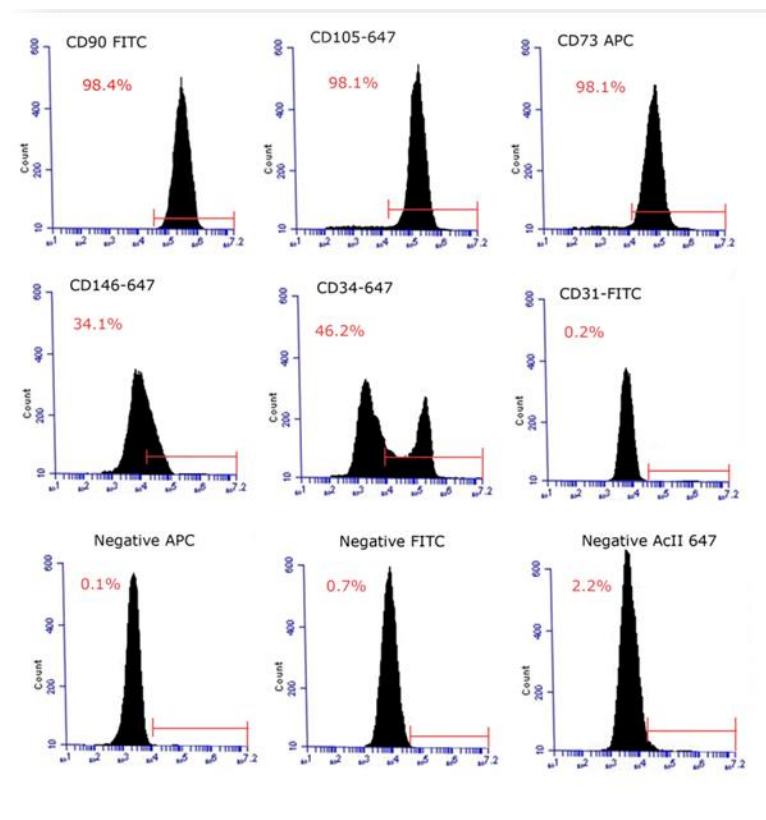


Figure 15 : Caractérisation des SCAPs par cytométrie en flux.

Au microscope optique, les SCAPs présentent une morphologie fusiforme d'aspect fibroblastique et ont tendance à former des unités de culture (CFU-F), propriétés propres aux cellules souches mésenchymateuses MSCs.

3.4.2 Différenciation endothéliale des SCAPs

Les études portant sur la différenciation endothéliale des cellules souches issues de sang de cordon ombilical ont permis de mettre en évidence l'importance de certaines conditions de culture, telles que la densité d'ensemencement des cellules, la dimension des puits ou le type de revêtement [73]. Ainsi, ces études ont montré que seul un ensemencement de $2 \cdot 10^7$ cellules souches par cm^2 dans une plaque 12 puits (puits de 4cm^2) revêtues de collagène de type I permet d'aboutir à une différenciation endothéliale. Au cours de notre étude, différentes conditions de cultures ont été testées afin de mettre en évidence les conditions idéales de différenciation endothéliale des SCAPs. Les SCAPs CD105+, ont été mises en cultures *in vitro* dans des plaques 6 puits et dans des plaques 12 puits à différentes densités d'ensemencement ($50.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $10.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $5.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $1.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $500\text{cells}/\text{cm}^2$). Les puits ont tous été revêtus au collagène de type I. L'analyse au microscope optique révèle un développement différent des SCAPS-E en fonction des conditions dans lesquelles elles ont été mises en culture (**Figure 16**). Ainsi, les cellules ensemencées à une forte densité ($50.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $10.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $5.000\text{cells}/\text{cm}^2$; $1.000\text{cells}/\text{cm}^2$) présentent rapidement une morphologie d'aspect fibroblastique formant à confluence un courant de cellules étirées en faisceaux (**Figure 16.B**). A l'inverse, les cellules ensemencées dans de plus faibles densités présentent une morphologie pavimenteuse (**Figure 16.A**). Il semble donc que les SCAPS-E se développent mieux dans des puits de 10cm^2 à de faibles densités d'ensemencements.

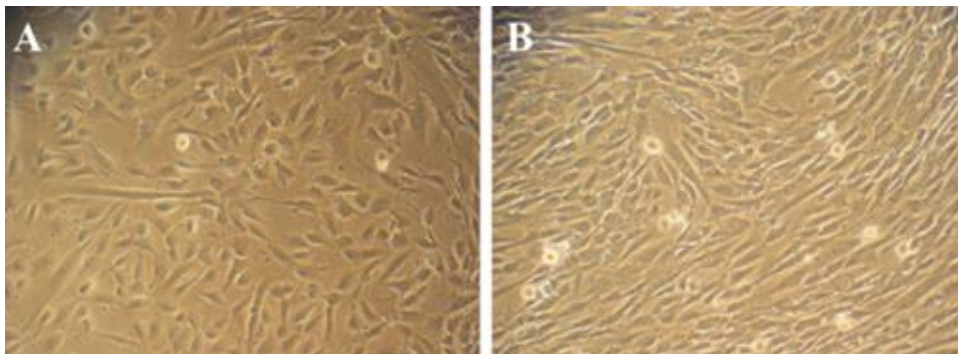


Figure 16 : Observation des SCAPs-E au microscope optique.

A : SCAPs-E à J3 ensemencées à $1.000\text{ cellules}/\text{cm}^2$. B : SCAPs-E à J3 ensemencées à $10.000\text{ cellules}/\text{cm}^2$.

La différenciation endothéliale a été appréciée à l'aide de marqueurs spécifiques des cellules endothéliales : le CD31/PECAM-1 et le vWF.

Les immunofluorescences révélèrent une absence de CD31 mais la présence d'un léger signal pour le vWF (**Figures 17 et 18**).

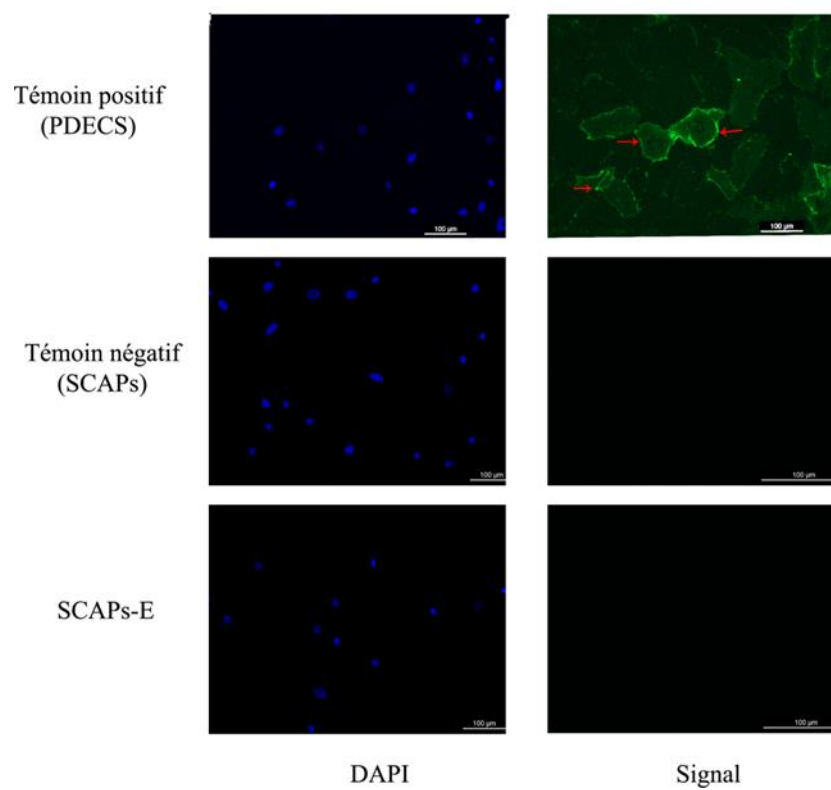


Figure 17 : Immunofluorescence des SCAPs-E pour le marqueur CD31.

(Flèche rouge → : signal de CD31+)

X 10

X 20

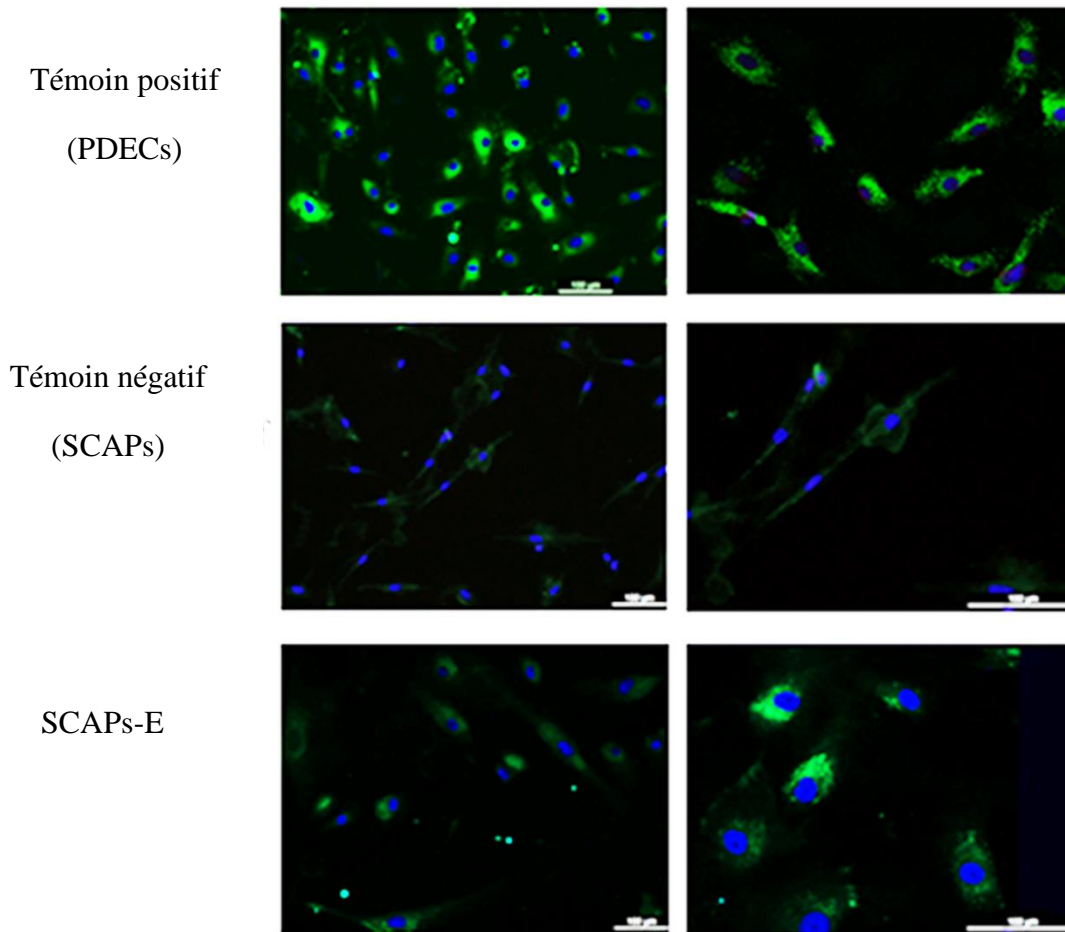


Figure 18 : Immunofluorescence des SCAPs-E pour le marqueur vWf.

(Grossissement x10 et x20)

Cette observation a été confirmée par la RT-PCR mettant en exergue l'absence de CD31 mais l'existence d'un signal positif pour le vWf (**Figure 19**).

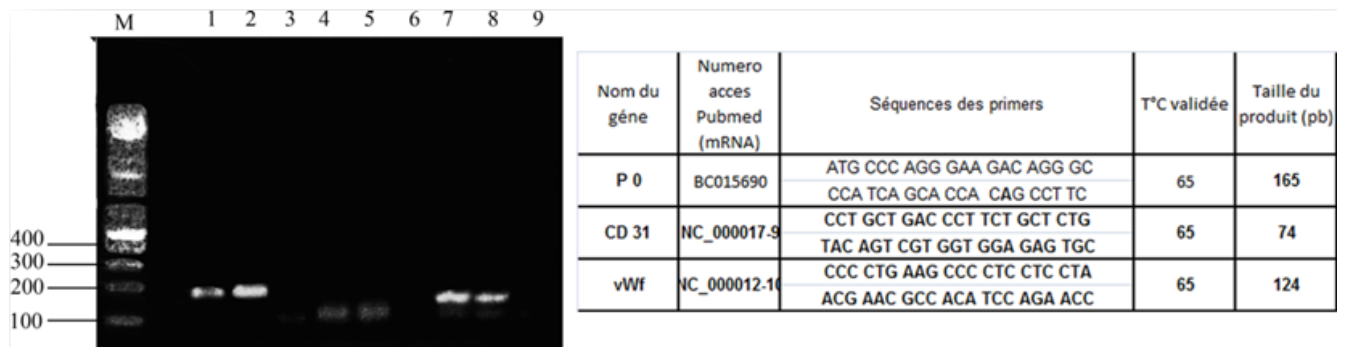


Figure 19 :RT-PCR des SCAPs-E.

1-2 : P0, 4-5 : CD31, 7-8 : vWf, 3-6-9 : eau

L'analyse du phénotype des SCAPs-E par cytométrie en flux confirme l'absence de CD31 objectivée par RT-PCR et immunofluorescence mais révèle également une persistance des marqueurs CD105, CD90 et CD73. Cela suppose l'existence d'une autre population cellulaire en compétition avec les SCAPs-E.

3.4.3 La bioimpression assistée par laser

Le LAB est une technique d'écriture directe qui offre la possibilité d'imprimer des motifs avec une haute résolution spatiale. Au cours de cette expérience les cellules ont été bioimprimées selon un motif précis correspondant à des gouttes de cellules déposées tous les 250 μm et formant des lignes espacées de 1000 μm (**Figure 20**).

Les bioimpressions cellulaires ont été réalisées avec des SCAPs et, dans l'attente d'une obtention plus fiable de SCAPs-E, des cellules dérivées de progéniteurs endothéliaux de sang de cordon (PDECs). Elles ont été effectuées sur deux types de biopaper, laissant apparaître quatre conditions de bioimpression (Figure 14):

- 1- Bioimpression des SCAPs sur du collagène de type I (monoculture)
- 2- Bioimpression des PDECs sur du collagène de type I (monoculture)
- 3- Bioimpression d'un mélange SCAPs/PDECs sur du collagène de type I (coculture)
- 4- Bioimpression des PDECs sur un « lit » de SCAPs (coculture)

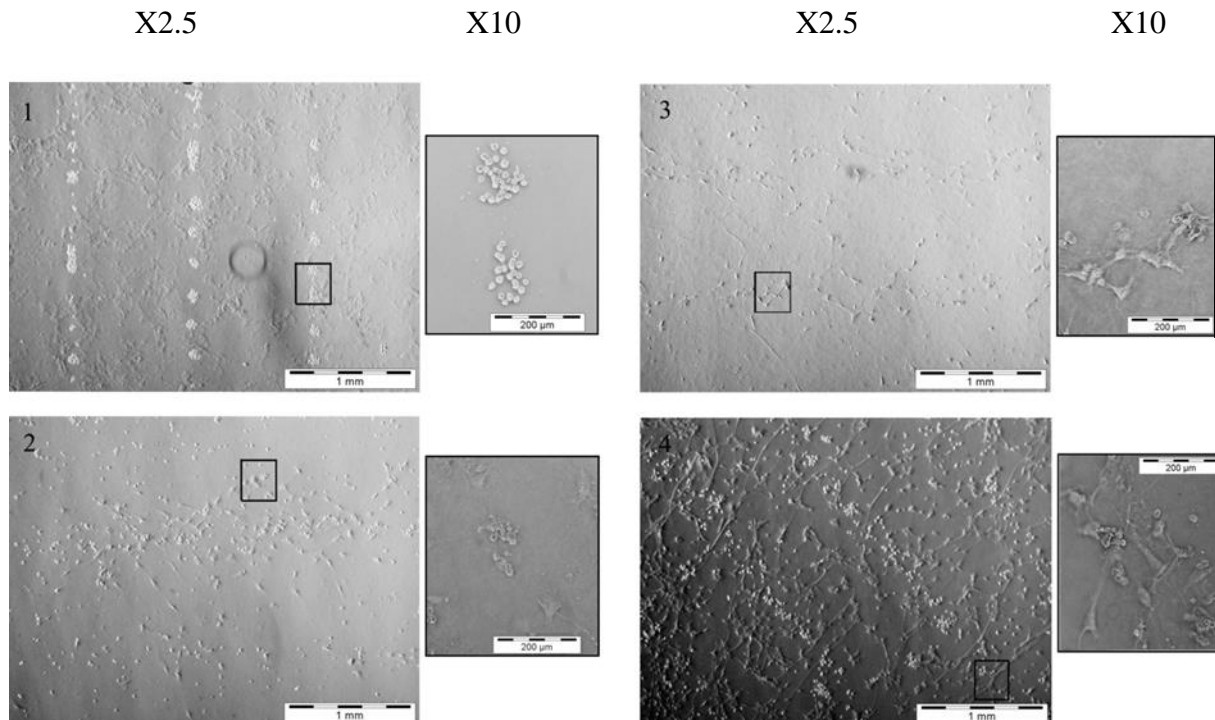


Figure 20 : Bioimpression cellulaire à 24h des quatre échantillons.

1-SCAPs bioimprimées sur du collagène de type I. 2-PDECs bioimprimées sur du collagène de type I. 3-
Coculture SCAPs/PDECs bioimprimées sur du collagène de type I. 4- PDECs bioimprimées sur un « lit » de
SCAPs (Grossissement x2,5 et x10).

Une fois imprimées, les SCAPs ont formé des lignes composées de spots d'une quinzaine de cellules chacun (**Figure 20.1**). La qualité de ces spots cellulaires était directement liée à la puissance d'impression mais également à la qualité de l'encre, de sa viscosité. Le suivi des SCAPs post-impression a révélé que les cellules adhéraient progressivement au collagène et maintenaient dans le temps leur capacité de prolifération. La puissance du laser était comprise entre P28 et P30.

L'impression des trois autres échantillons (**Figures 20.2, 20.3, 20.4**) a donné lieu à un régime de panache, c'est-à-dire à la formation d'un spray incontrôlé de gouttelettes.

A 24h post-impression, l'analyse des échantillons a révélé la présence d'une double population de PDECs : des cellules adhérentes, étalées et des cellules rondes. Une coloration au live/dead a alors été réalisée afin de mettre en évidence le taux de viabilité cellulaire. Cette technique, permettant de distinguer les cellules vivantes (coloration verte) des cellules mortes (coloration rouge), a permis de confirmer la présence d'un grand nombre de cellules vivantes post-impression (**Figure 21**).

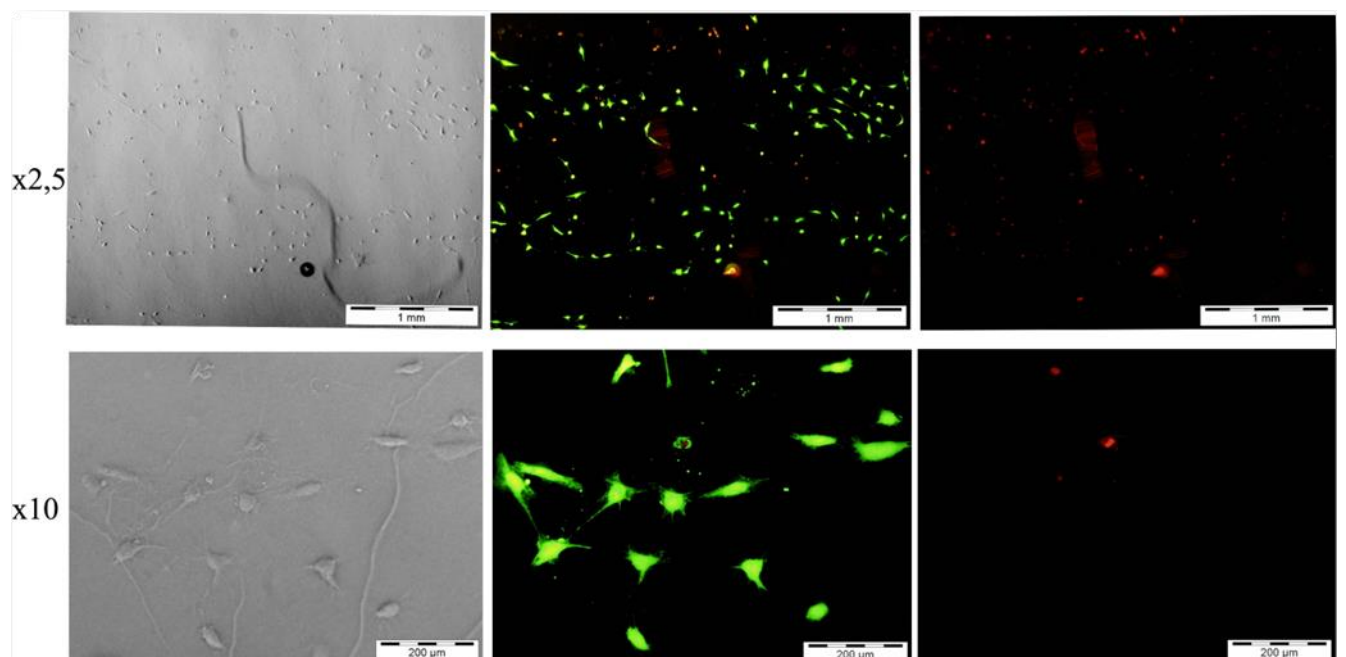


Figure 21 : Observation des PDECs à 24h post-impression après un Live/Dead.

(Grossissement x2,5 et x10).

A 48h post-impression, on observait un meilleur étalement des cellules ainsi qu'une augmentation de la population. Un immunomarquage au CD31 et vWf a été réalisé 48h et 72h post-impression. Il révélait la persistance des principaux marqueurs des cellules endothéliales confirmant la survie cellulaire (**Figure 22**).

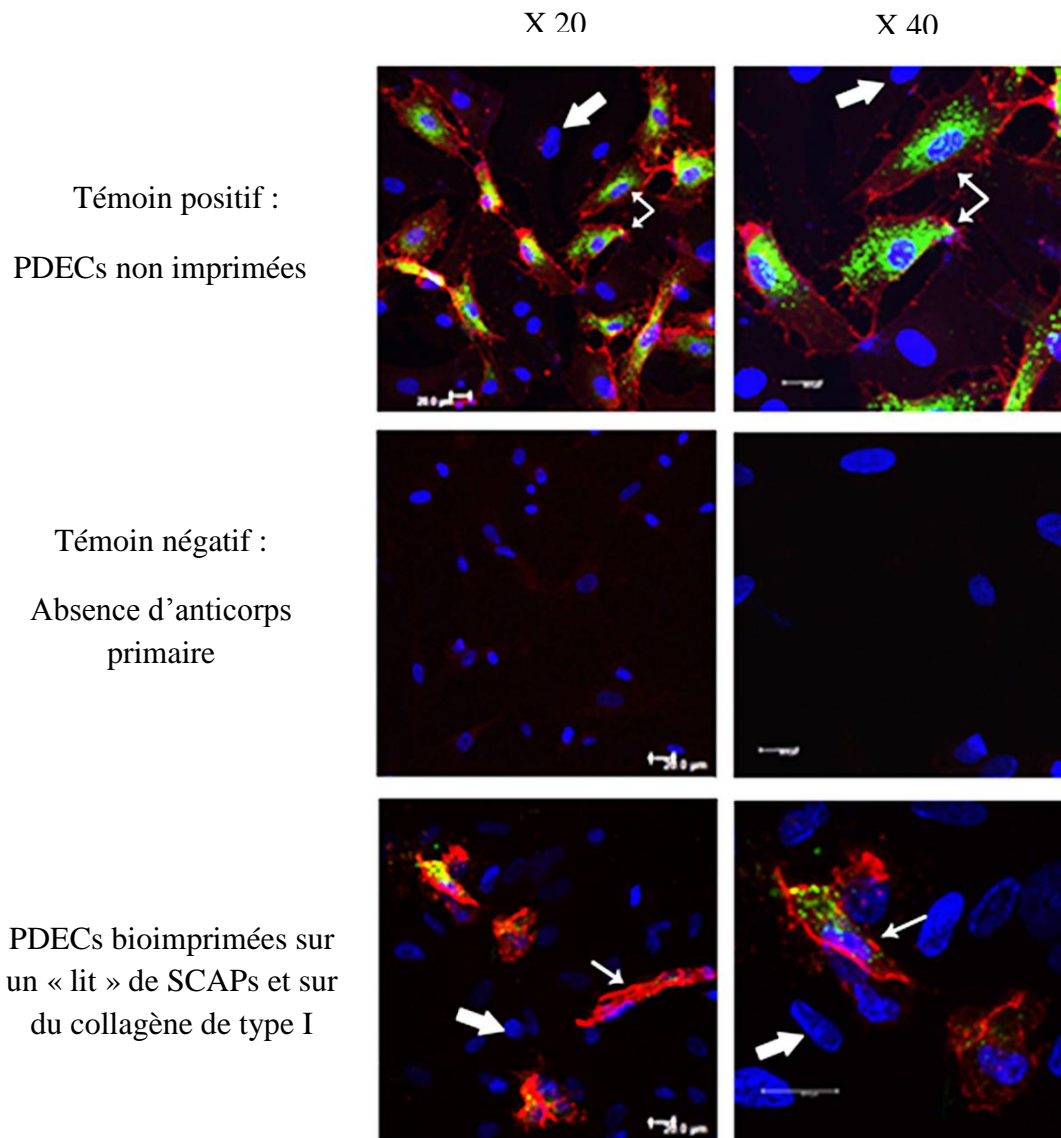


Figure 22: Observation au microscope confocal des PDECs imprimées sur un « lit » de SCAPs et sur du collagène de type I à 48h post-impression.

vWf (vert), CD31 (rouge), DAPI (bleu). Flèches blanches épaisses : SCAPs – Flèches blanches fines : PDECs.
(Grossissement x20 et x40).

Le LAB ne semble donc pas altérer l'intégrité des cellules ni affecter leur potentiel de prolifération, qu'elles soient imprimées sur du collagène ou sur des SCAPs.

3.5 DISCUSSION

Au cours de notre travail, nous sommes parvenus à isoler les SCAPs à partir de germes de dents de sagesse extraites le jour même. Leur phénotype, étudié grâce aux marqueurs de surface, révélait bien la présence de cellules souches mésenchymateuses, adhérentes au plastique et capable de former des CFU-F. Le protocole d'isolement des SCAPs, fortement inspiré des études réalisées par S. Gronthos [69] et W. Sonomaya [48], a été réalisé avec succès et peut désormais être considéré comme fiable et reproductible. Il est cependant nécessaire de souligner l'importance de manipuler des germes frais et de les traiter dans un délai court de 24 à 48h. En effet, chaque tentative d'isolement des SCAPS à partir de papilles apicales congelées (n=5) basée sur le protocole de cryo-préservation de Ding G [74] fut un échec.

Les SCAPs ont ensuite été cultivées dans des conditions endothéliales afin d'évaluer leur capacité de différenciation. Les différentes conditions étudiées ont permis de mettre en évidence un meilleur développement cellulaire pour des ensemencements sur des puits de 10 cm² et à de faibles densités. Cependant, les résultats obtenus au cours de ces expérimentations ne nous ont pas permis de conclure de façon nette et reproductible à une différenciation endothéliale et soulèvent plusieurs interrogations. Plusieurs questions se posent alors sur l'efficacité des conditions de culture utilisées. En effet, les SCAPs ont été cultivées en normoxie (21% pO₂) dans des puits contenant un milieu endothélial EGM-2-MV. Or, de nombreuses études rapportent que les cellules souches résident dans des niches dont la pression en O₂ (pO₂) est inférieure à la normale, soit moins de 5% pO₂ contre 12-15 % pO₂ dans le sang artériel [75]. Cette hypoxie semble protéger les cellules souches du stress oxydatif et favoriser leur caractère multipotent. Des chercheurs ont ainsi mis en évidence que les DPSCs et les PDLCS, cultivées dans des conditions proches de leurs conditions physiologiques, semblent posséder de meilleures capacités de différenciation vers les lignées ostéoblastiques, chondrocytaires et adipogéniques et présentent un meilleur potentiel angiogénique [76]. Cette observation est renforcée par Vanacker et son équipe qui mettent en exergue l'effet des conditions de culture hypoxiques sur le comportement des SCAPs [77]. L'hypoxie semble stimuler le potentiel de différenciation des cellules souches et augmenter la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A, VEGF-B). Mimer les conditions physiologiques observées *in vivo* semble améliorer *in vitro* les capacités de différenciation des

SCAPs et stimuler leur pouvoir de revascularisation. On peut alors supposer que l'hypoxie ait un impact sur la différenciation endothéliale.

Malgré l'absence de CD31 au sein de notre population de SCAPs-E, la présence de vWf laisse supposer l'existence d'une différenciation endothéliale pour certaines cellules. La question se pose alors sur la raison pour laquelle seul le marqueur intracellulaire des cellules endothéliales (vWf) est présent et ce dans de faibles proportions (présent sur certaines cellules uniquement). Au cours de nos recherches, le principal obstacle fut la présence d'une autre population cellulaire : des cellules d'aspect fibroblastique. Les SCAPs sont connues pour être des populations hétérogènes [35]. Cette hétérogénéité est un véritable obstacle qui entraîne des variabilités entre les expériences et compromet le bon fonctionnement expérimental. Face à ce constat, une sélection spécifique a été réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées au CD105 [70]. Cependant, malgré une immunosélection cellulaire à l'aide de billes couplées au CD105, une population de cellules de morphologie fusiforme a rapidement pris le dessus au sein de la culture cellulaire au détriment des SCAPs-E. La présence de cette population a pu être objectivée grâce à la cytométrie en flux et la persistance d'antigènes de surface : CD105, CD73, CD90. Selon Alt *et al*, ces marqueurs ne sont pas spécifiques des cellules souches mésenchymateuses mais sont également présents chez les fibroblastes [78]. Cette persistance de cellules CD105+, CD90+ et CD73+ au sein de la culture cellulaire limite le développement et la communication des SCAPs-E entre elles pouvant expliquer la non-détection du CD31, marqueur membranaire impliqué dans la communication intercellulaire et la présence de vWf dans de faibles proportions.

Notre expérience a permis de mettre en exergue la nécessité d'appliquer des stratégies de purification cellulaire. Afin de s'affranchir des cellules indésirables et d'augmenter la pureté de la population, il serait intéressant d'utiliser une combinaison de plusieurs marqueurs présents à des stades précoces chez les progéniteurs endothéliaux tel que les marqueurs d'immaturité cellulaire CD34 et CD133. Il serait également judicieux de réaliser la sélection d'une « side population » (SP). La SP se définit comme une population de cellules souches précoces identifiées grâce à leur haute capacité d'efflux pour le colorant vital de l'ADN Hoechst 33342 [79, 80]. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de cette population aux forts potentiels de prolifération et de différenciation au sein de l'organe dentaire : des études chez le porc ont permis de mettre en évidence la capacité d'une sous-population de cellules souches CD31-/CD146- issues de la pulpe dentaire à se différencier en progéniteurs endothéliaux et former des structures « tubulaires-like » sur Matrigel [46, 81]. La SP semble,

dans des conditions endothéliales, présenter *in vitro* les principaux marqueurs des cellules endothéliales (vWf, CD31, VE-cadhérine) et stimuler *in vivo* la néovascularisation de sites ischémiques [33, 80, 82]. Ainsi, la sélection d'une SP au sein d'une population hétérogène permettrait de recueillir des cellules souches à des stades « précoces » tout en s'affranchissant des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation [79]. Il s'agirait d'une stratégie de purification cellulaire de grand intérêt ayant déjà fait l'objet de recherches prometteuses.

Dans notre dernière expérimentation, nous avons utilisé le LAB afin de contrôler l'agencement des cellules sur une lame receveuse. Dans l'attente de l'obtention des SCAPs-E, ces travaux ont été réalisés avec des SCAPs et des progéniteurs endothéliaux de sang de cordon (PDECs). Les cellules étaient bioimprimées par laser selon un motif précis correspondant à des lignes espacées de 1000 µm. Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence la possibilité de bioimprimer des PDECs et des SCAPs par LAB sans altérer l'intégrité des cellules. La survie cellulaire a été validée par un Live/Dead à 24h, 48h et 72h. La prolifération des cellules et la présence de marqueurs spécifiques des cellules endothéliales (vWf, CD31) venaient confirmer la viabilité des PDECs post-impression, qu'elle soit faite sur collagène ou sur un lit de SCAPs. Cette étude a permis de montrer la capacité du LAB à imprimer plusieurs types cellulaires tout en contrôlant leur agencement respectif. Cette technique d'impression permettant un ensemencement rapide, contrôlé et reproductible des cellules sur la matrice, représente un outil de grand intérêt en ingénierie tissulaire.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude expérimentale a permis de mettre en évidence l'intérêt des SCAPs en ingénierie tissulaire osseuse. Au cours de ces travaux de recherche, nous avons démontré la possibilité d'isoler et de cultiver des cellules souches mésenchymateuses à partir de la papille apicale selon un protocole fiable et reproductible. Nous avons également constaté que, dans des conditions endothéliales, les SCAPs-E présentaient le marqueur spécifique des cellules endothéliales : le vWf. Enfin, nous avons démontré que les cellules pouvaient être bioimprimées par LAB sur du collagène ou sur des SCAPs tout en conservant leur viabilité et leur intégrité.

La prochaine étape de cette étude expérimentale serait d'élaborer une stratégie de purification cellulaire à l'aide de la « side population » afin d'optimiser la différenciation endothéliale.

Après obtention des SCAPs-E, le travail consisterait à mettre en place des systèmes de cocultures entre des SCAPs-O et SCAPs-E par LAB et d'étudier les interactions entre les deux types cellulaires. L'objectif de l'étude serait de vérifier si l'organisation des cellules selon un motif précis favorise une synergie dans la différenciation, le réarrangement cellulaire et la création de réseaux de type capillaire. Ce travail permettrait de mettre en évidence les paramètres favorables à l'émergence de structures vascularisées dans le cadre de la biofabrication du tissu osseux vascularisé.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. Nguyen LH, et al., *Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement*. Tissue Eng Part B Rev., 2012. **18**(5): p. 363-82.
2. Liu Y, Chan JK, and T. SH., *Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems*. J Tissue Eng Regen Med, 2012. **9**(2): p. 85-105.
3. Rouwkema J, Rivron NC, and v.B. CA., *Vascularization in tissue engineering*. Trends Biotechnol., 2008. **26**(8): p. 434-41.
4. Koch L, Gruene M, and U. C., *Laser assisted cell printing*. Curr Pharm Biotechnol., 2012. **14**(1): p. 91-7.
5. Amini AR, Laurencin CT, and N. SP., *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. Crit Rev Biomed Eng., 2012. **40**(5): p. 363-408.
6. Santos MI and R. RL., *Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges*. Macromol Biosci., 2010. **10**(1): p. 12-27.
7. Childs, S., *Osteonecrosis: death of bone cells*. Orthop Nurs., 2005. **24**(4): p. 295-301.
8. Tarquini R, Perfetto F, and T. B., *Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link?* Calcif Tissue Int., 1998. **63**(2): p. 118-20.
9. Grellier M, Bordenave L, and A. J., *Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering*. Trends Biotechnol., 2009. **27**(10): p. 562-71.
10. Alberts B, Johnson A, and e. al., *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion ed. 2004.
11. Villars F, et al., *Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication*. Am J Physiol Cell Physiol., 2002. **282**(4): p. C775-85.
12. Daar AS and G. HL., *A proposed definition of regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(3): p. 179-84.
13. Langer R and V. JP., *Tissue engineering*. Science., 1993. **260**(5110): p. 920-6.
14. Martin I, Wendt D, and H. M., *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends Biotechnol., 2004. **22**(2): p. 80-6.
15. Hutmacher DW, Sittinger M, and R. MV., *Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems*. Trends Biotechnol., 2004. **22**(7): p. 354-62.
16. Murphy CM, et al., *Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad*. Eur Cell Mater., 2013. **26**: p. 120-132.
17. Egusa H, et al., *Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources*. J Prosthodont Res., 2012. **56**(3): p. 151-65.
18. Sedgley CM and B. TM., *Dental stem cells and their sources*. Dent Clin North Am., 2012. **56**(3): p. 549-61.
19. Rando, T., *Stem cells, ageing and the quest for immortality*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1080-6.
20. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, and P. KV., *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol., 1966. **16**(3): p. 381-90.
21. Pittenger MF, et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science., 1999. **284**(5411): p. 143-7.
22. Rosada C, et al., *The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells*. Calcif Tissue Int., 2003. **72**(2): p. 135-42.

23. Miyazaki M, et al., *Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model*. Spine, 2008. **33**(8): p. 863-9.
24. Gronthos S, et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA., 2000. **97**(25): p. 13625-30.
25. Stanko P, et al., *Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub., 2014. **158**(3): p. 373-7.
26. Delorme B and C. P., *Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Methods Mol Med., 2007. **140**: p. 67-81.
27. Dominici M, et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
28. Yu H, et al., *Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells*. J Orthop Res., 2008. **26**(8): p. 1147-52.
29. Griffin M, Iqbal SA, and B. A., *Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration*. J Bone Joint Surg Br., 2011. **93**(4): p. 427-34.
30. Abdullah MF and P. KT., *DPSCs and SHED in tissue engineering and regenerative medicine*. The Open Stem Cell Journal., 2013. **4**: p. 1-6.
31. Huang GT, et al., *Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model*. Tissue Eng Part A., 2010. **16**(2): p. 605-15.
32. Fitzgerald M, Chiego DJ, and H. DR., *Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth*. Arch Oral Biol., 1990. **35**(9): p. 707-15.
33. Ishizaka R, et al., *Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp*. Biomaterials., 2013. **34**(8): p. 1888-97.
34. Kawashima, N., *Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?* Arch Oral Biol., 2012. **57**(11): p. 1439-58.
35. Bakopoulou A, et al., *Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAPs)*. Arch Oral Biol., 2011. **56**(7): p. 709-21.
36. Simon S, Cooper P, and e. al., *Biologie pulpaire : comprendre pour appliquer au quotidien*. Revue d'Odontologie Stomatologie., 2008. **37**: p. 209-235.
37. Miura M, et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci USA., 2003. **100**(10): p. 5807-12.
38. Yang M, Zhang H, and G. R., *Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering*. Curr Stem Cell Res Ther., 2014. **9**(3): p. 150-61.
39. Akkouch A, Zhang Z, and R. M., *Engineering bone tissue using dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly(L-lactide-co-e-caprolactone) scaffold*. J Biomater Appl., 2014. **28**(6): p. 922-36.
40. d'Aquino R, et al., *Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation*. Cell Death Differ., 2007. **14**(6): p. 1162-71.
41. Laino G, et al., *A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB)*. J Bone Miner Res., 2005. **20**(8): p. 1394-402.

42. Karaöz E, et al., *Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* . Histochem Cell Biol., 2011. **136**(4): p. 455-73.
43. Sakai VT, et al., *SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium.* J Dent Res., 2010. **89**(8): p. 791-6.
44. d'Aquino R, et al., *Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications.* J Exp Zool B Mol Dev Evol., 2008. **312B**(5): p. 408-15.
45. Lindros B, Mäenpää K, and Y. T., *Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts.* Biochem Biophys Res Commun., 2008. **368**(2): p. 329-35.
46. Iohara K, Zheng L, and W. H., *A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp.* Stem Cells., 2008. **26**(9): p. 2408-18.
47. d'Aquino R, et al., *Human mandible bone defect repair by grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes.* Eur Cell Mater., 2009. **18**: p. 75-83.
48. Sonoyama W, et al., *Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine.* PLoS One, 2006. **1**(1): p. e79.
49. Scheller EL, Krebsbach PH, and K. DH., *Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation.* J Oral Rehabil., 2009. **36**(5): p. 368-89.
50. Salgado AJ, Coutinho OP, and R. RL., *Bone tissue engineering: state of the art and future trends.* Macromol Biosci., 2004. **4**(8): p. 743-65.
51. Logeart-Avramoglou D, et al., *Engineering bone: challenges and obstacles.* J Cell Mol Med., 2005. **9**(1): p. 72-84.
52. Kneser U, Schaefer DJ, and P. E., *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view.* J Cell Mol Med., 2006. **10**(1): p. 7-19.
53. Vinatier C, et al., *Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering.* Med Sci (Paris). 2011. **27**(3): p. 289-96.
54. Sundelacruz S and K. DL., *Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine.* Semin Cell Dev Biol., 2009. **20**(6): p. 646-55.
55. Mastrogiacomo M, et al., *Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics.* Biomaterials., 2006. **27**(17): p. 3230-7.
56. Karageorgiou V and K. D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.* Biomaterials., 2005. **26**(27): p. 5474-91.
57. Cipitria A, et al., *Porous scaffold architecture guides tissue formation.* J Bone Miner Res., 2010. **27**(6): p. 1275-88.
58. Swetha M, et al., *Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering.* Int J Biol Macromol., 2010. **47**(1): p. 1-4.
59. Gaspar DA, Gomide V, and M. FJ., *The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering.* Biomatter., 2012. **2**(4): p. 167-75.
60. Yeatts AB and F. JP., *Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress.* Bone., 2011. **48**(2): p. 171-81.
61. Warnke PH, et al., *Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man.* Lancet., 2004. **364**(9436): p. 766-70.
62. Warnke PH, et al., *Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible.* Biomaterials., 2006. **27**(17): p. 3162-7.
63. Mesimäki K, et al., *Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells.* Int J Oral Maxillofac Surg., 2009. **38**(3): p. 201-9.

64. Guillemot F, et al., *Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus fate and perspectives in tissue engineering*. *Nanomedicine.*, 2010. **5**(3): p. 507-15.
65. Kirkpatrick CJ, Fuchs S, and U. RE., *Co-culture systems for vascularization - learning from nature*. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2011. **63**(4-5): p. 291-9.
66. Dissanayaka WL, et al., *Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro*. *J Endod.*, 2012. **38**(4): p. 454-63.
67. Unger RE, et al., *Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials*. *Biomaterials.*, 2007. **28**(27): p. 3965-76.
68. Guerrero J, et al., *The use of total human bone marrow fraction in a direct 3D expansion approach for bone tissue engineering applications: focus on angiogenesis and osteogenesis*. *Tissue Eng Part A.*, 2014.
69. Gronthos S, et al., *A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells.*, in *Methods Mol Biol.* 2011. p. 107-121.
70. Lv XJ, et al., *In vitro proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells isolated using anti-CD105 magnetic beads*. *Int J Mol Med.*, 2012. **30**(4): p. 826-34.
71. Souquet, A., *Etude des processus physiques mis en jeu lors de la microimpression d'éléments biologiques assistée par laser*. 2011, University Bordeaux 1: Thèse de doctorat. p. 227.
72. Guillotin B, et al., *Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization*. *Biomaterials.*, 2010. **31**(28): p. 7250-7256.
73. Thébaud N.B, 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**(10): p. e51-60.
74. Ding G, et al., *Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla*. *J Cell Physiol.*, 2010. **223**(2): p. 415-22.
75. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, and Q.-H. A., *Oxygen in stem cell biology: a Critical component of the stem cell niche*. *Cell Stem Cell.*, 2010. **7**(2): p. 150-61.
76. Zhou Y, Fan W, and X. Y., *The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLC and DPC*. *Biomed Res Int.*, 2014. **2014**: p. 890675.
77. Vanacker J, Viswanath A, and D.B. P., *Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla*. *J Endod.*, 2014. **40**(9): p. 1410-8.
78. Alt E, et al., *Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential*. *Biol Cell.*, 2011. **103**(4): p. 197-208.
79. Honda MJ, et al., *Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue*. *Int Endod J.*, 2007. **40**(12): p. 949-58.
80. Wang J, et al., *Identification and characterization of side population cells from adult human dental pulp after ischemic culture*. *J Endod.*, 2012. **38**(11): p. 1489-97.
81. Iohara K, et al., *Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth*. *Regen Med.*, 2009. **4**(3): p. 377-85.
82. Wang J, et al., *Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell*. *J Endod.*, 2010. **36**(3): p. 453-8.

VI. ANNEXES

Mails envoyés aux maisons d'éditions

Le mail ci-dessous a été envoyé à chaque maison d'édition dont les schémas ont permis d'illustrer ce travail.

“Objet: Authorization to reproduce a diagram.

Dear Sir/Madam

I am currently in my last year of a doctorate in dental surgery at the University of Bordeaux, France.

My thesis work focuses on Bone Tissue Engineering and stem cells from apical papilla. Some of my bibliographic and document searches belong to your publishing house. I am contacting you regarding the permission to reproduce one diagram in order to include it in my thesis. Please find attached to this letter the reference of the image. The reproduction of this thesis will be restricted to the University of Bordeaux. Please do not hesitate to contact me if you require further information.

Yours faithfully,

Sarah SANDRIN”

-Figure 1 et 8 : Mail envoyé à la maison d'édition Mary Ann Liebert Inc., Publishers.

“Dear Sarah,

Copyright permission is granted for use of the requested figure from TISSUE ENGINEERING, Part B, in your thesis.

Kind regards,

Karen Ballen

Manager, Reprints, Permissions, and Open Access”

-Figure 4 et 5 : Mail envoyé à la maison d'édition Elsevier

« Nous vous remercions de votre message. Votre demande sera examinée et nous vous répondrons dans un délai de quinze jours ouvrables, à moins que vous n'ayez spécifié une échéance plus proche.

Cordialement,

ELSEVIER MASSON, Département Juridique. »

La réponse est toujours en attente

-Figure 7 : Mail envoyé à la maison d'édition Wiley Online Library

La réponse est toujours en attente

-Figure 10 et 11 : Autorisation de reproduction des figures dans une thèse selon le texte ci-dessous issu de leur page web : <http://www.futuremedecine.com/page/Permissions>

Are you planning on using our material in a Thesis/dissertation?

If you are using figure(s)/table(s), permission is granted for use in print and electronic versions of your thesis/dissertation

A full text article may be used only in print versions of a dissertation/thesis. Future Medicine Ltd does not permit the reproduction of full text articles in electronic versions of theses or dissertations.

Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :