HAL
open science

L'utilisation du corail dans une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse

Samir Raddi

To cite this version:

Samir Raddi. L'utilisation du corail dans une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02095409

HAL Id: dumas-02095409

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02095409

Submitted on 10 Apr 2019

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

MEMBRE DE
USPC
Université Sorbonne Paris Cité

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'État de docteur en chirurgie dentaire. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2 - L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2018 **N° 109**

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement le : 10 décembre 2018

Par

Samir RADDI

L'utilisation du corail dans une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse

Dirigée par M. le Docteur Charles-Daniel Arreto

JURY

Mme le Professeur Catherine Chaussain	Président
Mme le Professeur Sibylle Vital	Assesseur
M. le Professeur Benjamin Salmon	Assesseur
M. Docteur Charles-Daniel Arreto	Assesseur
M. le Docteur Martin Biosse-Duplan	Invité

Tableau des enseignants de la Faculté

DÉPARTEMENTS	DISCIPLINES	PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS	MAÎTRES DE CONFÉRENCES
1. DÉVELOPPEMENT, CROISSANCE ET PRÉVENTION	ODONTOLOGIE PÉDIATRIQUE	Mme DAVIT-BÉAL Mme DURSUN Mme VITAL	M. COURSON Mme JEGAT Mme SMAIL-FAUGERON Mme VANDERZWALM
	ORTHOPÉDIE DENTO-FACIALE		Mme BENAHMED M. DUNGLAS Mme KAMOUN-GOLDRAT Mme LE NORCY
	PRÉVENTION, ÉPIDEMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ ET ODONTOLOGIE LÉGALE	Mme FOLLIGUET M. PIRNAY	Mme GERMA M. TAVERNIER
2. CHIRURGIE ORALE, PARODONTOLOGIE, BIOLOGIE ORALE	PARODONTOLOGIE	Mme COLOMBIER Mme GOSSET	M. BIOSSE DUPLAN M. GUEZ
	CHIRURGIE ORALE	M. MAMAN Mme RADOI	Mme EJEIL M. GAULTIER M. HADIDA M. MOREAU M. NGUYEN
	BIOLOGIE ORALE	Mme CHAUSSAIN M. GOGLY Mme SÉGUIER Mme POLIARD	M. ARRETO Mme BARDET (MCF) Mme CHARDIN M. FERRE M. LE MAY
3. RÉHABILITATION ORALE	DENTISTERIE RESTAURATRICE ENDODONTIE	Mme BOUKPESSI Mme CHEMLA	Mme BERÈS Mme BESNAULT M. BONTE Mme COLLIGNON M. DECUP Mme GAUCHER
	PROTHÈSES		M. CHEYLAN M. DAAS M. DOT M. EID Mme FOUILLOUX-PATEY Mme GORIN M. RENAULT M. RIGNON-BRET M. TIRLET M. TRAMBA Mme WULFMAN
	FONCTION-DYSFONCTION, IMAGERIE, BIOMATÉRIAUX	M. SALMON	M. ATTAL Mme BENBELAID Mme BENOÎT A LA GUILLAUME (MCF) M. BOUTER M. CHARRIER M. CHERRUAU M. FLEITER Mme FRON CHABOUIS Mme MANGIONE Mme TILOTTA
	PROFESSEURS ÉMÉRITES	M. BÉRENHOLC Mme BRION M. LASFARGUES M. LAUTROU M. LEVY	M. PELLAT M. PIERRISNARD M. SAFFAR Mme WOLIKOW

Mise à jour le 04 septembre 2018

Remerciements

À M. le Docteur Charles-Daniel Arreto

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'Université Paris Descartes

Maître de Conférences des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Vous avez accepté de me soutenir et de m'accompagner tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre patience et vos conseils. Cela a été un plaisir de travailler avec vous. Aussi j'aimerais vous témoigner ma sincère gratitude pour votre soutien durant ces années de formation, votre érudition, votre sagesse m'ont guidé et je ne saurais trop vous remercier.

« L'érudition galante est la provision des honnêtes gens. La connaissance de toutes les affaires du temps, les bons mots dits à propos, les façons de faire agréables, font l'homme à la mode, et, plus il a de tout cela, moins il tient du vulgaire. Quelquefois un signe, ou un geste, fait plus d'impression que toutes les leçons d'un maître sévère. L'art de converser a plus servi à quelques-uns que les sept arts libéraux ensemble » L'homme de cour, Baltasar Gracián,1684.

À Mme le Professeur Catherine Chaussain

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'Université Paris Descartes

Habilitée à Diriger des Recherches

Professeur des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail.
Merci pour le temps que vous passez à la promotion de la recherche en chirurgie dentaire, pour nous apporter une formation de qualité.
Je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.

À Mme le Professeur Sibylle Vital

Docteur en Chirurgie dentaire

Ancien Interne des Hôpitaux

Docteur de l'Université Paris Descartes

Habilitée à Diriger des Recherches

Professeur des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Vice-Doyen de la Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail en siégeant dans mon jury de thèse. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

À M. le Professeur Benjamin Salmon

Docteur en Chirurgie dentaire

Spécialiste qualifié en Chirurgie orale

Docteur de l'Université Paris Descartes

Habilité à Diriger des Recherches

Professeur des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Chef de service de l'hôpital Bretonneau

Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail en siégeant dans mon jury de thèse. Je vous remercie pour votre pédagogie clinique, mes premiers pas en implantologie et votre implication dans la recherche. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

À M. le Docteur Martin Biosse-Duplan

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'Université Paris Descartes

Maître de Conférences des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger mon travail. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

Table des matières

Liste des abréviations **3**

Introduction **5**

1. Biologie osseuse **7**

1.1 Structure et développement du squelette : **7**

1.1.1. Les cellules osseuses : 7

1.1.2. Développement du squelette et maturation : une coordination cellulaire : 8

1.2. Les cellules de l'os : **11**

1.2.1 Ostéoblastes : 11

1.2.2 Ostéocytes : 14

1.2.3. Ostéoclastes : 16

1.3. Protéine de la matrice extra cellulaire : **20**

1.3.1 Collagénique : 20

1.3.2 Non collagénique : 20

1.4 L'os alvéolaire : **21**

2. Ingénierie Tissulaire et Médecine Régénératrice **23**

2.1. Introduction : **23**

2.1.1. Généralités : 23

2.1.2. Principe : 23

2.2. Matériau support (*scaffold*) : **25**

2.2.1 Biomatériau issu de greffe osseuse : 28

2.2.2 Biomatériau polymérique : 29

2.2.3 Biomatériau céramique : 29

2.2.4 Biomatériau composite (hybride) : 30

2.3. Les cellules en culture : **30**

2.3.1 Cellules souches : 31

2.3.2 Ostéoblastes : 35

2.3.3 Cellules autologues issu de prélèvement : 35

2.4. Molécules régénératrices : **36**

2.4.1 PDGF : 37

2.4.2 BMP : 38
2.4.3 FGF-2 : 38
2.4.4 GDF-5 (growth differentiation factor 5) : 39
2.4.5 Tériparatide : 39
2.5 Application préclinique et clinique de l'IT osseuse : 39
3. Le corail 45
3.1. Caractéristiques biologiques : 45
3.1.1 Origine : 45
3.1.2 Processus de résorption et néoformation : 47
3.1.3 Biocompatibilité et étude *in vitro* : 48
3.2. Caractéristiques physico- chimiques et mécaniques : 50
3.2.1 Composition chimique : 50
3.2.2 Caractéristique mécanique : 51
3.3. Application en Ingénierie Tissulaire clinique et préclinique : 52
3.3.1. Étude préclinique : 52
3.3.2. Étude clinique : 54
3.3.3 Production du corail : 57
3.4 Directions futures : 59
4. Aspect réglementaire et commercial 60
4.1. Marché : 60
4.2. Régulation des produits issus de l'IT : 63
Conclusion 67
Bibliographie 68
Table des figures 72
Table des tableaux 73
Annexes 74

Liste des abréviations

A

ALP ..... : phosphatases alcalines

AP-1 ..... : activator protein-1

ATMP ..... : Advanced Therapy Medicinal Products

B

BCP.....: céramiques biphasées

BMP ..... : bone morphogenetic proteins

BSP .... : bone sialoproteine, : sialoprotéine osseuse

C

CAO ..... V: conception assistée par ordinateur

CAPC ..... : cellules ostéogéniques

CAT..... : Committee for Advanced Therapies

CD ..... : cluster of differentiation

CE : règlement européen

CFU-ALP .....: CFU phosphatases alcaline positif

CFU-F ..... : Colonies Forming Units-Fibrolasts

CFU-O..... : CFU ostéogéniques

CHMP ...: comité des médicaments à usage humain

CSDA ..... : Cellules souches dérivées d'adipocytes

CSDPD .....: Cellules souches dérivées de la pulpe dentaire

CSE ..... : Cellule souche embryonnaire

CSM..... : Cellules souches mésenchymateuses, : cellule souche mésenchymateuse

D

DHCC..... : dihydroxycholécalciférol

DM ..... : Dispositifs Médicaux

DMP-1 ..... : dentin matrix protein 1

DSPP.....: dentin sialophosphoprotein

E

EMA..... : European Medecines Agency

F

FAK ..... : focal adhesion kinase

FAO..... : fabrication assistée par ordinateur

FDA..... : Food and Drug Administration

FGF ..... : fibroblast growth

G

GAG ..... : glycoaminoglycanne

GDF-5 .....: growth differentiation factor 5

GM-CSF ..... : granulocyte macrophage stimulating factor

H

HA.....: : hydroxyapatite

hTERT ....: human telomerase reverse transcriptase

I

IGF ..... : Insulin-like growth factors, : insulin growth factor

IL-1 .....: l'interleukine 1

IL-3 .....: l'interleukine 3

IPSC: Cellule souche pluripotente induite, : induced pluripotent stem cells

IT : Ingénierie Tissulaire

L

LAD ..... : ligament alvéolo-dentaire

LIF ..... : leukaemia inhibitory factor

M

MAPKs.....: mitogene activated protein kinases

M-CSF..... : macrophage colony stimulating factor

MEF..... : murine embryonic fibroblast

MEPE....: matrix extracellular phosphoglycoprotein

MSC.....: cellules souches mésenchymateuses non différenciées

MTI.....: médicaments de thérapie innovante

MTI-PP .....médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement

N

NF-κB ..... : nuclear factor-B

O

OCN..... : ostéocalcine

OPG..... : ostéoprotégérine

OPN.....: ostéopontine

ORP150 .....: oxygen regulate protein 150

P

PCL ..... : polycaprolactone

PDGF ..... : platelet derived growth factors

PEEK.....: polyether ether ketone

PGA .....: acide polyglycolique

PGE_2 ..... : prostaglandine E2

PHEX .....: Phosphate-regulating neutral endopeptidase, X-linked

PLA.....: acide poltylactique

PLGA .....: poly-(lactide-co-glycolide)

PPARγ2.....: peroxisome proliferator activated receptor γ2

PRF .....: plasma riche en fibrine

PRP ..... : plasma riche en plaquettes

PTH.....: parathormone

R

RANK-L ..... : receptor activator of nuclear factor B ligand

rh : recombinant humain

rhPDGF-BB ..: plaquettes humaines recombinantes

RO.....: récepteurs d'œstrogène

S

SDF-1 .....: stromal derived factor-1

SIBLING..... : small integrin biding ligand N-linked glycoprotein

SPARC..... : secreted protein acidic, rich in cysteine

SPTI ..... : - Séparation de phase thermo-induite

SSEA-4 ..... : stage specific emrbyonic antigen-4

T

TCAC.....: taux de croissance annuel composé

TCP ..... : phosphate tri calcique, : phosphate tricalcique

TNFR..... : Tumor necrosis factor receptors

TRA.....: tumor rejection antigens

TRAFs..... : TNFR-associated factors

TRAP.....: tartrate resistant acid phosphatase

V

VEGF..... : vascular endothelium growth factor

Introduction

L'os est un tissu dur biologique hétérogène relativement résilient qui possède de hautes capacités régénératives comparé à d'autres tissus. Dans des conditions physiologiques, l'os est capable de se régénérer quand surviennent de petits défauts de structure. La destruction osseuse résultant de maladies, de résections tumorales, d'infections ou de traumas nécessite une intervention chirurgicale impliquant le remplacement d'un volume osseux cliniquement viable, qui peut être d'origine autogène, allo génique, xéno génique ou synthétique. Le handicap lié à la résection du tissu osseux est donc une préoccupation majeure tant en orthopédie qu'en chirurgie orale/maxillo-faciale.

En chirurgie dentaire depuis l'essor de l'implantologie et de la parodontologie, le chirurgien-dentiste fait aussi face à un nombre de cas cliniques non négligeable d'insuffisance osseuse. A ce jour, la greffe autologue est considérée comme le modèle d'excellence pour les procédures de comblement et de régénération osseuse. Mais il s'agit d'une procédure limitée par la quantité de tissu osseux prélevée et par la création d'un double site opératoire.

Avec le vaste objectif d'améliorer voire de remplacer les greffes autologues, des cliniciens, des biologistes, des chimistes, des physiciens et d'autres se sont non seulement regroupés au sein de la discipline d'ingénierie tissulaire mais aussi ils ont travaillé autour du concept de bio-mimétisme pour développer des solutions alternatives aux greffes autologues à travers le recours à des substituts osseux biologiques.

Parmi ces substituts, le corail est revenu sur le devant de la scène comme une piste de nouveau prometteuse. C'est en effet un substitut osseux qui a été utilisé depuis les années 1970 et qui possède d'excellentes propriétés biologiques. L'essor de nouvelles techniques de production et de conception a permis de remettre ce matériau au centre des techniques de régénération osseuse.

L'objectif de cette thèse est de faire l'état de l'art de l'ingénierie tissulaire osseuse à travers d'une part, les potentielles applications cliniques utilisant le corail comme matrice et d'autre part de comparer cette technique à celles déjà utilisées. Nous présenterons dans un premier temps les données acquises de la science concernant la biologie osseuse, puis dans un deuxième temps les objectifs de l'ingénierie tissulaire et ses applications cliniques. Dans un troisième temps, nous décrirons ensuite le corail comme matériau de reconstitution osseuse et enfin dans un quatrième temps, nous préciserons les conditions réglementaires et commerciales de l'utilisation d'une telle technologie.

1. Biologie osseuse

1.1 Structure et développement du squelette :

L'os est un tissu hautement spécialisé qui a une fonction de support interne chez tous les vertébrés. C'est un tissu complexe dans lequel la matrice extra cellulaire est minéralisée, ce qui lui confère rigidité et dureté tout en lui permettant d'avoir un certain degré d'élasticité. En plus de ses fonctions protectrices et de support, l'os est une Source majeure d'ions inorganiques participants de manière active à l'homéostasie calcique du corps. L'os est composé d'une matrice organique renforcée par des dépôts de sel calciques. Le collagène de type I constitue approximativement 95 % de la matrice organique, les 5 % restant étant composé de protéoglycannes et différentes protéines non collagéniques. Les cristaux formés dans la matrice organique de l'os sous le contrôle cellulaire sont composés de calcium et de phosphate sous la forme d'hydroxyapatite.

Sur le plan morphologique, il existe deux formes d'os : l'os cortical (compact) et l'os trabéculaire (spongieux). L'os cortical comprend un dense réseau de fibres de collagène qui forment des lamelles concentriques et les fibres des lamelles adjacentes se croisent perpendiculairement dans un plan. L'os spongieux contient une matrice poreuse. Ces différences de structure sont liées à des différences de fonction : l'os cortical a un rôle protecteur et de soutien tandis que l'os spongieux a une fonction métabolique.

1.1.1. Les cellules osseuses :

L'os est composé de quatre types différents de cellules : ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et les cellules bordantes de l'os. Les ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes de l'os ont pour origine des cellules ostéoprogénitrices locales, tandis que les ostéoclastes sont issus de la fusion de mononucléaires précurseurs originaires de différents tissus hématopoïétiques. Les surfaces apicale et basale de l'os sont définies de manière opposée au tissu épithélial, la surface apicale est liée à la matrice extracellulaire alors que la surface basale est en dehors.

Les ostéoblastes sont des cellules différenciées produisant la matrice extracellulaire osseuse. Ces cellules sont caractérisées par un appareil de Golgi proéminent et un système endoplasmique développé typique des cellules excrétrices. Elles sécrètent le collagène de type I et les protéines non collagéniques de la matrice.

Les ostéoblastes régulent la minéralisation de la matrice osseuse, bien qu'on ne connaisse pas de

manière exhaustive le mécanisme moléculaire. On décrit deux mécanismes différents de minéralisation de l'os en fonction du type osseux (lamellaire ou lacunaire). Dans les deux cas, le collagène sert de trame pour l'initiation et la propagation de la minéralisation. A l'opposé, on retrouve une couche de matrice non minéralisée dite ostéoïde sous les ostéoblastes. La synthèse de la matrice extracellulaire est polarisée à travers l'os, puis se généralise pour entourer les ostéoblastes et former une couche d'ostéocytes. La minéralisation de la matrice rend cette dernière imperméable, pour assurer leurs apports, les ostéocytes établissent donc des prolongements cytoplasmiques à travers cette matrice pour établir des connexions avec les cellules adjacentes et former un réseau. Au final, l'ostéocyte est un ostéoblaste arrivé à maturité entouré de matrice minéralisée. Ces cellules ont pour fonction le maintien de la matrice par synthèse [1] mais aussi le renouvellement en résorbant la matrice de manière très localisée. Les ostéocytes siègent dans des logettes (ostéoplastes) d'où partent des canalicules anastomosés contenant leurs prolongements cytoplasmiques, fins, nombreux, plus ou moins longs, reliés entre eux par des jonctions communicantes.

Les cellules bordantes de l'os sont des cellules plates, allongées et inactives qui couvrent la surface l'os. Elles ne participent ni à la formation ni à la résorption de l'os. Leur rôle n'est pas totalement défini mais il semblerait que ce soient des cellules progénitrices des ostéoblastes.

Les ostéoclastes sont des cellules larges et multinuclées qui ont pour fonction la résorption osseuse. Quand elles sont activées, les ostéoclastes reposent directement sur l'os et se polarisent, leurs membranes plasmiques se différencient en deux domaines séparés par un anneau étanche de jonction cellule-matrice extracellulaire : un domaine apical qui forme une bordure en brosse au contact de l'os et un domaine basolatéral situé à l'opposé. Les noyaux sont situés dans la partie basale et sont interconnectés par un cytosquelette de protéines[2]. Les ostéoclastes contiennent de nombreux appareils de Golgi, des mitochondries et des lysosomes.

1.1.2. Développement du squelette et maturation : une coordination cellulaire :

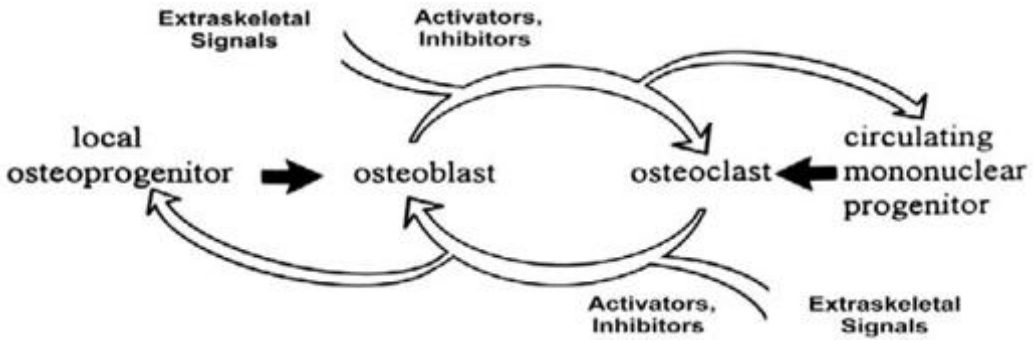
L'activité des cellules osseuses varient au cours de la vie humaine. Durant les deux premières décennies, le squelette est dans une phase de développement qu'on appelle modelage. Pendant cette période, la formation osseuse excède sa résorption. Durant les trois décennies suivantes et au-delà, le squelette adulte se maintient par un remodelage constant du tissu osseux. Ce remodelage débute par une résorption suivie de la néo formation osseuse au même site et de même quantité. Parfois après la cinquième décennie, les phases de formation ne sont plus équivalentes aux phases de

[1] Buckwalter et al., « Bone biology. II : formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. »
[2] Watanabe, Yanagisawa, et Sasaki, « Cytoskeletal architecture of rat calvarial osteoclasts : microfilaments, intermediate filaments, and nuclear matrix as demonstrated by detergent perfusion ».

résorption entrainant une diminution de la masse du squelette. Ce phénomène réduit la résistance du squelette et augmente le risque de fracture.

La figure 1 présente les résultats de divers travaux qui ont montré l'influence mutuelle qu'ont les ostéoblastes vis à vis des ostéoclastes. Les ostéoblastes, dérivés d'ostéoprogéniteurs locaux, produisent des facteurs qui influencent la différenciation et la fonction des ostéoclastes[3]. Parmi ces facteurs certains sont compris dans la matrice tandis que d'autre sont sécrétés localement sous l'influence de d'hormones ou de facteurs locaux. Ces affirmations sont démontrées par le fait que les récepteurs de la plupart des facteurs ostéolytiques sont situés sur les ostéoblastes et que les ostéoclastes résorbent l'os en réponse à des facteurs relargués par les ostéoblastes dans un milieu de culture et que certains composants de la matrice peuvent attirés/activés les ostéoclastes[4]. En outre les ostéoclastes sont dérivés de cellules souches hématopoïétiques (monocytes) qui utilisent la vascularisation pour migrer à des endroits spécifiques de l'os. Après migration, ces précurseurs mononucléaires fusionnent entre eux pour devenir multi nucléaires et ainsi se transformer en ostéoclastes.

Figure 1 : Coordination cellulaire ostéoblastes/ostéoclastes



Source : Marks, « Structure and development of skeleton », 2002

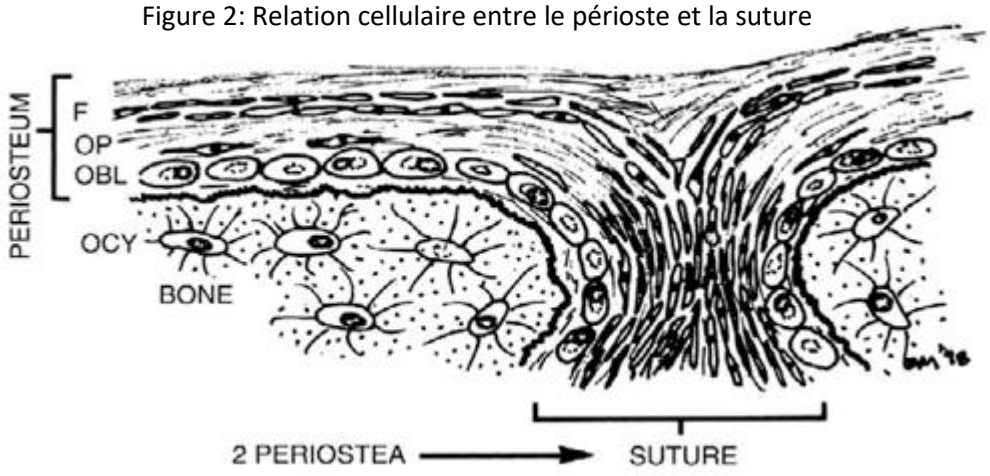
La formation du squelette, c'est à dire le processus d'ossification, s'opère soit de manière directe (intramembraneuse), soit de manière indirecte (endochondrale). Ces deux types d'ossification ont besoin d'une base solide et d'une vascularisation abondante pour l'élaboration et la minéralisation de la matrice extra-cellulaire. L'ossification intramembraneuse a lieu pendant l'embryogenèse par la transformation des cellules issues du mésenchyme en ostéoblastes. Ce type d'ossification est caractéristique des os du crâne, de certains os de la face, d'une partie de la mandibule et de la

[3] Martin et Ng, « Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity ».
[4] Rodan et Martin, « Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption : hypothesis ».

clavicule. Les os plats du crâne se forment dans les centres d'ossifications primaires, pour croître, se rencontrer et former des sutures.

Les sutures sont des zones fibro-élastiques composées du périoste des os adjacents. Au sein de ces sutures se trouvent une population de cellules prolifératives qui migrent vers les surfaces des os adjacents et se différencient en ostéoblastes.

Figure 2: Relation cellulaire entre le périoste et la suture

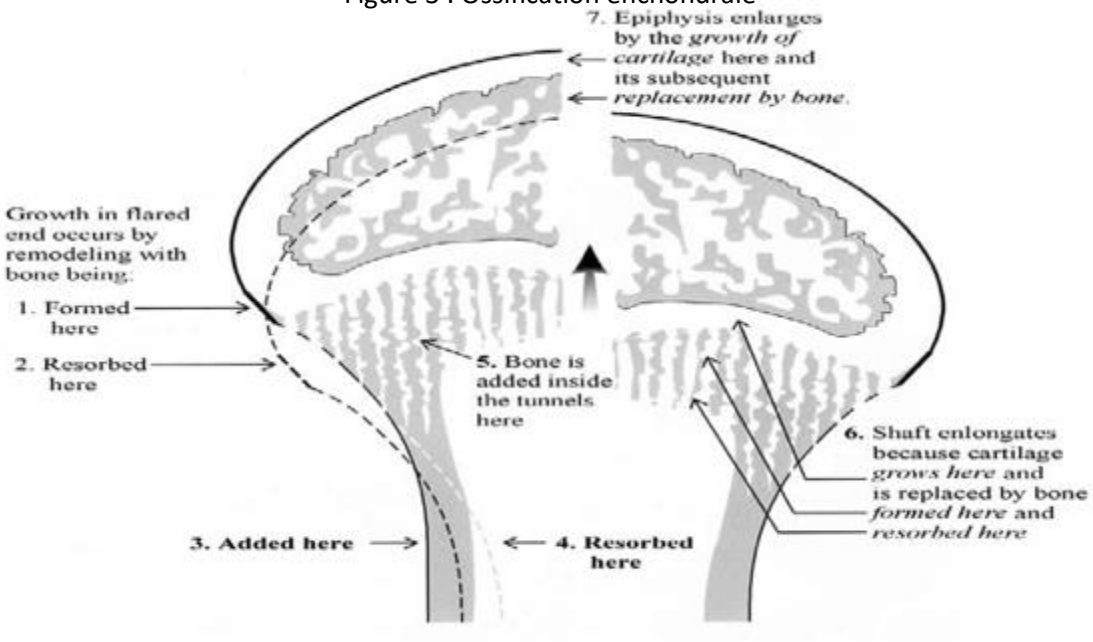


Source : Marks et al, *Bone Biology* , 1999

Les os participants aux articulations et au support du poids sont formés par ossification endochondrale. Il s'agit d'un mécanisme par lequel les propriétés du cartilage et de l'os sont exploitées pour l'édification et la croissance du squelette. Dans ce type d'os le mésenchyme embryonnaire est transformé en cartilage. Les chondrocytes (rangées en colonne) présents vont progressivement devenir hypertrophique. La minéralisation du cartilage entre les colonnes cellulaires et la persistance du cartilage minéralisé après la disparition de ces cellules agissent comme un support d'élongation pour la déposition d'os subchondral (métaphyse). Cette ossification à la différence de l'ossification membraneuse, se fait de manière centripète. Les ostéoblastes, présents dans le périoste, sont accompagnés de vaisseaux qui pénètrent le centre du cartilage minéralisé hypertrophique et apportent les progéniteurs pour la formation et le renouvellement de l'os. Ce processus est illustré dans la figure 3 ci-dessous. La dernière étape de la formation des os longs est la résorption de la partie centrale qui donnera la cavité médullaire. La croissance des os longs est donc un équilibre entre différents processus : une prolifération des chondrocytes, une sécrétion de matrice cartilagineuse, la minéralisation et la pénétration vasculaire apportant des mononucléaires pour la résorption osseuse et des cellules progénitrices pour la formation osseuse.

La prolifération cartilagineuse est sous le contrôle de différentes hormones (hormone de croissance, hormones thyroïdiennes, hormones corticostéroidienne et parathyroidienne) et de facteurs de croissance locaux comme l'*insulin growth factor* (IGF) ou le *fibroblast growth factor* (FGF). La croissance osseuse implique donc de nombreuses activités cellulaires à des sites spécifiques. Ces activités varient au cours du temps en intensité et en séquence pour contribuer à un développement harmonieux.

Figure 3 : Ossification enchondrale



Source : Marks et al , *Bone biology* , 1998

1.2. Les cellules de l'os :

1.2.1 Ostéoblastes :

En dépit de leur interaction physiologique proche, il réside deux types cellulaires dans l'os qui se distinguent par leur origine. Un consensus semble émergé sur l'origine des ostéoblastes, qui dériveraient de cellules souches non-circulantes[5].

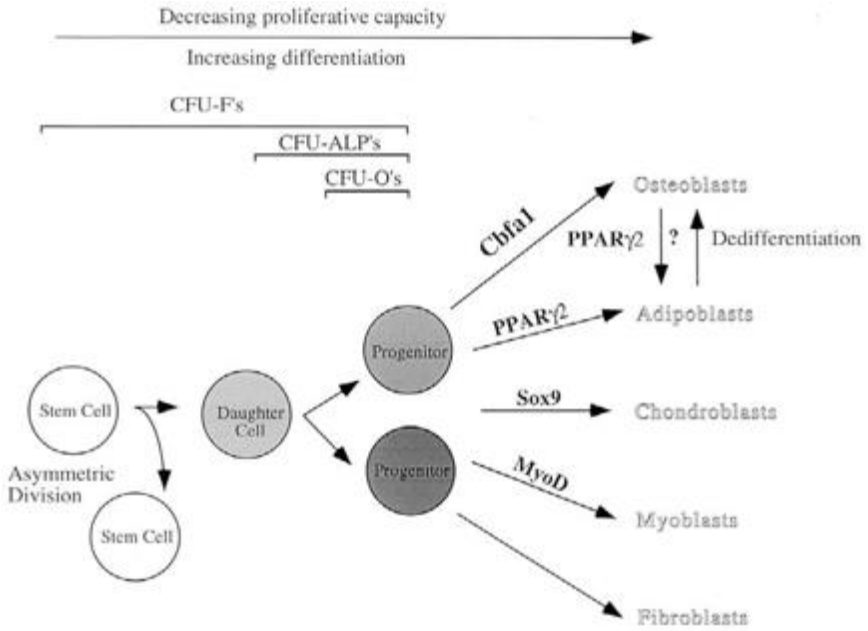
Ces cellules souches qui ont été dénommées auparavant cellules souches de soutien, cellules souches stromales ou cellules souches stromales fibroblastiques sont aujourd'hui appelées cellule souche mésenchymateuse (CSM). Ce terme est un terme d'usage simplificateur car les CSM ne peuvent se

[5] Friedenstein, « Precursor cells of mechanocytes ».

différencier en toutes les cellules du mésenchyme. Le terme le plus approprié serait celui de cellules souches dérivées du mésenchyme. Les cellules ayant pour potentiel de donner des cellules de l'os et du cartilage serait des cellules ostéogéniques[6].

Les travaux de Friedenstein sont les premiers ayant montré que la moelle osseuse contient des cellules ayant des capacités prolifératives et de différenciation en cellules osseuses et qu'en plus de synthétiser de l'os et du cartilage, des adipocytes et du tissu fibreux peuvent être formés *in vivo* (figure 5) notamment à partir de colonies uniques dénommées CFU-F (*Colonies Forming Units-Fibrolasts*).

Figure 4 : Schéma de voies des différenciations cellulaires



Source : Aubin et Triffitt , « Bone stem cells », 2002

Les CFU-F sont en réalité hétérogènes en taille, en morphologie et en potentiel de différenciation. De plus, certaines études montrent que par une dilution importante ou une faible densité de cellules implantées, seulement une partie des CFU-F sont CFU phosphatases alcaline positif (CFU-ALP) et une partie encore plus réduite sont CFU ostéogéniques (CFU-O).

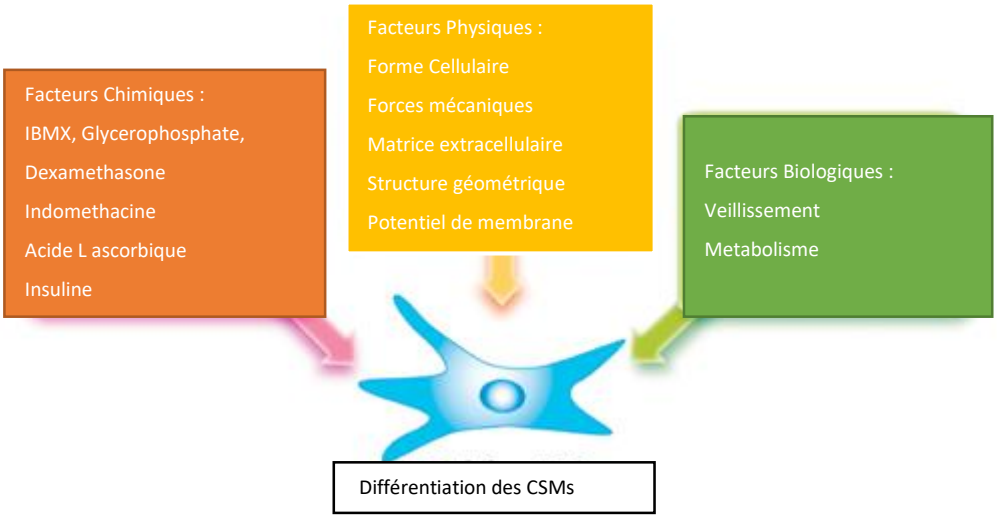
Les cellules engagées dans la formation d'ostéoblastes (ostéoprogéniteurs) sont retrouvées ailleurs dans le stroma, notamment au niveau de la calvaria et au niveau d'autres os. En complément, un phénomène intéressant de transdifférenciation à partir des adipoblastes en ostéoblastes a été suggéré. Dans des cultures cellulaires d'ostéoblastes différenciés exprimant l'ostéocalcine (OCN), les auteurs ont ainsi démontré que l'ajout de récepteurs nucléaires PPARγ2 (*peroxisome proliferator*

[6] Aubin, « Bone stem cells ».

activated receptor γ2) conduit à une différenciation de la totalité des ostéoblastes en adipoblastes, phénomène qui pourrait être responsable de l'ostéoporose. Cette transdifférenciation permet aussi aux adipoblastes de se transformer en ostéoblastes dans un milieu de culture de différenciation ostéoblastique. L'action de la protéine TAZ (transcriptional coactivator with PDZ motif) coactive les facteurs de transcriptions sous le contrôle de Runx 2 tout en inactivant les facteurs de transcriptions dépendants de PPARγ2.

Ces études ont ainsi contribué à faire émerger le concept de plasticité cellulaire, au cours duquel différents facteurs environnant les cellules souches les conduisent à s'engager dans une voie de différenciation avec des possibilités de dédifférenciation ou de différenciation en un autre type cellulaire. Les figures 6 illustrent les différents facteurs ayant une action sur la différenciation des CSM.

Figure 5 : Plasticité des cellules souches mésenchymateuse



Source : Qchen, « MSC plasticity nature »,2016

Des avancées significatives ont été réalisées dans l'identification des mécanismes d'induction et de régulation de la différenciation des CSM en cellules matures (gène Sox-9 pour les chondrocytes, PPARγ2 pour les adipocytes). Dans le cadre de la différenciation ostéoblastique, Cbfa1 renommé Runx-2 est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans la différenciation ostéoblastique. En

effet, Runx-2 a été identifié comme régulateur de l'expression d'OCN. L'expression ectopique de Runx-2 conduit les cellules à exprimer des gènes spécifiques d'ostéoblaste incluant l'OCN, et la déplétion de ce même gène chez la souris conduit à un squelette uniquement constitué de chondrocytes. Runx-2 est le marqueur de différenciation qui apparaît en premier au cours du développement Il est fortement exprimé dans les ostéoblastes et même surexprimé dans les cultures traitées avec les protéines BMP (*bone morphogenetic proteins*)[7]. Néanmoins, il apparait que Runx 2 n'est pas un gène maître comme peuvent l'être MyoD pour les myocytes ou PPARγ2 pour les adipocytes, il est nécessaire mais pas suffisant pour induire la différenciation du phénotype des ostéoblastes matures.

Le processus de différenciation des ostéoprogéniteurs en ostéoblastes matures suit un certain nombre d'étapes : (i) prolifération (ii) développement de la matrice extracellulaire et maturation (iii) minéralisation. Ces étapes sont accompagnées par des changements caractéristiques dans l'expression de gènes.

Nous constatons donc que la régulation de la différenciation des ostéoblastes est un phénomène complexe qui obéit à différents facteurs. Un exemple pertinent est celui de l'expression site spécifique des récepteurs d'œstrogène (RO). Des études montrent que RO α et RO β sont exprimés de manière différente dans l'os. Par exemple, RO β est fortement exprimé dans l'os poreux et les vertèbres lombaires et très peu exprimé dans l'os cortical des fémurs, ce qui pourrait expliquer les phénomènes d'ostéoporose site spécifique lors d'ovariectomies.

1.2.2 Ostéocytes :

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os. Elles sont dix fois plus nombreuses que les ostéoblastes dans un os humain adulte. Les ostéocytes sont des cellules dendritiques enfermées dans les lacunes osseuses formant un réseau. Les lacunes contiennent le corps cellulaire de l'ostéocyte et les prolongements cytoplasmiques traversent l'os perpendiculairement dans des canalicules. Ces expansions cellulaires permettent aux ostéocytes de communiquer entre eux (à travers les jonctions communicantes) mais aussi avec les cellules de la moelle osseuse et les espaces extra osseux. Du fait de l'herméticité de la matrice extra cellulaire osseuse, les ostéocytes ont développé ce réseau pour assurer leurs besoins en oxygène et nutriments.

La différenciation des ostéoblastes en ostéocytes est influencée par le type d'ossification, le type d'os formé, la localisation de l'os, le sexe et l'âge de l'individu. L'ostéocytogenèse semble être

[7] Yamaguchii, Suda, et Komori, « Regulation of osteoblast differentiation mediated by ».

soit un phénomène passif dans lequel une sous-population d'ostéoblastes peut s'entourer de matrice ostéoïde, soit un processus actif où la cellule envahit la matrice extracellulaire par clivage des fibres de collagène. Pendant l'ostéocytogenèse, les ostéoblastes se différencient tout en déposant une matrice ostéoïde composée de collagène de type I, II et III. Une fois cette matrice déposée, les ostéoblastes s'agrandissent et se rangent en ligne pour déposer encore plus de matrice. Dès que la matrice ostéoïde a atteint l'épaisseur d'environ 9 microns, les ostéoblastes vont se retrouver enfermés dans cette matrice.

Les ostéocytes présentent des récepteurs hormonaux pour la parathormone (PTH), les œstrogènes, les glucocorticoïdes alpha, la 1,25-dihydroxycholécalciférol (1-25 DHCC ou dihydroxyvitamine D_3) et de la prostaglandine E_2 (PGE_2). Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la physiologie osseuse. Par exemple, il a été démontré que l'injection de PTH permet de répondre plus favorablement à des stimuli mécaniques lors de la formation osseuse, en diminuant l'expression de la sclérostine qui, elle, contribue à inhiber la formation osseuse. L'activation du récepteur à la 1,25-DHCC semblerait produire le même effet.

Les ostéocytes ont aussi une fonction importante de mécanorécepteur. Ces cellules s'attachent à la matrice extra-cellulaire par un système protéique (intégrine et récepteur) de telle sorte que la déformation de la matrice provoque des torsions d'intégrine qui sont transmises au cytosquelette par des molécules (vinculine, taline, α-actinine).

Les forces appliquées à l'os ont un rôle reconnu dans la régulation de l'activité ostéoclastique ou l'activité ostéoblastique de l'os. Le squelette est capable de s'adapter continuellement aux forces mécaniques, soit par néoformation osseuse, soit par résorption osseuse. Déjà en 1638, les travaux de Galilée suggèrent que la forme des os est établie en fonction des forces qui leur sont appliquées. En 1892, J. Wolff suggéra aussi que l'os s'adapte aux forces appliquées. Par la suite, de nombreuses études, au plan cellulaire, sont venues démontrer que l'application d'une charge mécanique activait les ostéocytes, ces derniers jouant alors un réel rôle de mécano senseur. En effet les forces mécaniques appliquées conduisent à l'expression de gènes spécifiques.

Par ailleurs les paramètres d'induction de la formation osseuse ou de la résorption osseuse sont assez bien caractérisés. Ainsi, alors que la masse osseuse est influencée par l'amplitude maximale de la force appliquée, le taux de formation osseuse est lui lié à la fréquence des forces appliquées[8]. Pour des fréquences en dessous de 0,5 Hz, la formation osseuse est inexistante alors que pour des fréquences

[8] Turner, Forwood, et Otter, « Mechanotransduction in bone : do bone cells act as sensors of fluid flow ? »

de 0,5 à 2 Hz, le taux formation osseuse peut être jusqu'à quatre fois supérieur. De plus, lorsque des périodes de repos sont respectées, le taux de formation osseuse est supérieur par rapport à celui des os sans repos.

Une des théories les plus uniformément acceptée, est celle des flux canaliculaires. Cette théorie s'appuie sur le fait que les canalicules osseux non seulement forment un réseau permettant de délivrer des nutriments aux ostéocytes mais aussi permettent la transmission d'information mécanique. En effet, la pression du fluide interstitiel présent dans les canalicules est directement liée à la force appliquée sur l'os. Ainsi, la mécano-transduction commence par la conversion d'un stimulus physique en une réponse cellulaire. Différentes études suggèrent que le site de la mécano-transduction se situe au niveau du complexe entre les actines du cytosquelette intra-cellulaire et les macromolécules extracellulaires comme les intégrines ou les récepteurs CD44. Cette stimulation se traduit rapidement par l'ouverture de canaux relarguant de l'ATP. Ce relargage permet ensuite un influx d'ions calciques au travers la membrane plasmique et l'augmentation de la concentration en ions calciques dans l'ostéocyte. Cet influx est impliqué dans la transcription de facteur tel que PGE2,RANKL ou la sclérostine.

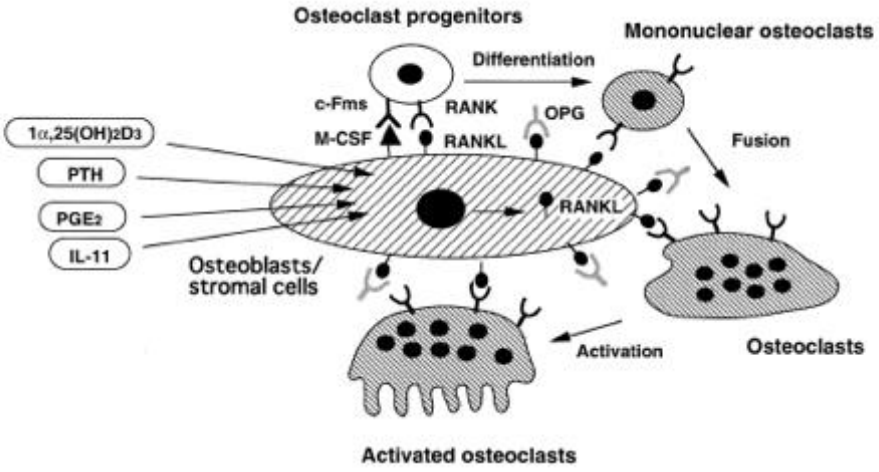
Depuis le développement de la microfluidique en biologie osseuse, deux voies de mécano-transduction ont été mises en évidence, l'un passant par les forces de cisaillement créées par le fluide interstitiel et l'autre produit par une déformation directe des ostéocytes. La première voie est utilisée pour les déformations légères de l'os (0,1 %), la seconde est impliquée dans les fractures où une déformation des cellules de plus de 10 % est constatée. Une telle déformation est aussi obtenue lors de la distraction ostéogénique pour permettre le déplacement des dents en orthodontie[9].

1.2.3. Ostéoclastes :

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinuclées provenant de cellules hématopoïétiques et ayant pour fonction de résorber l'os. Les ostéoclastes se développent dans un microenvironnement qui peut être reproduit *ex vivo*. Cet environnement contient des ostéoblastes, des cellules hématopoïétiques et des facteurs inducteurs de résorption tels que la 1,25-DHCC, la PTH, la PGE_2 et l'IL-11.

[9] Ikegame et al., « Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture ».

Figure 6 : Représentation de la différenciation et l'activation des ostéoclastes



Source : Takashi et al , « Osteoclast generation » ,2002

Les ostéoblastes jouent un rôle essentiel dans le développement des ostéoclastes (Figures 13). En effet, ce sont des cellules qui réagissent à des molécules extrinsèques (PTH, IL-1, ion calcium extracellulaire…) en internalisant ces signaux pour produire deux autres signaux essentiels à la différenciation des monocytes en ostéoclastes: le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) et le *receptor activator of nuclear factor κB ligand* (RANK-L). Le RANK-L, connu comme un membre-11a de la superfamille des *Tumor necrosis factor receptors* (TNFR), joue un rôle crucial dans l'ostéoclastogenèse.

En effet, RANK-L est un ligand pour la protéine membranaire RANK exprimée par les ostéoclastes mononucléaires. L'association RANK-L/RANK est transduit par le recrutement de diverses protéines adaptatrices notamment des *TNFR-associated factors* (TRAFs). L'ostéoprotégérine (OPG) est un analogue soluble de RANK, et est très affine pour RANKL. Son association à RANKL inhibe la transduction du signal et donc la différenciation des ostéoclastes.

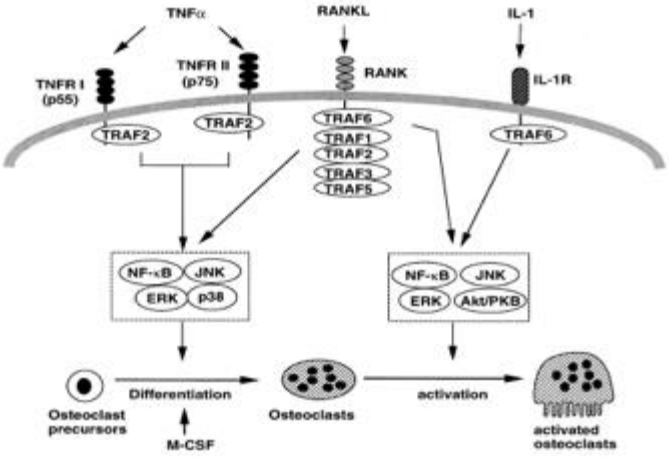
RANK n'est pas le seul facteur responsable de la différenciation et de la fonctionnalisation des ostéoclastes. IL-1 est aussi une des cytokines capables de ce double effet. Il a été démontré que des ostéoclastes purifiés ajoutés à des tranches de dentine ne remplissent pas leur rôle de résorption. Alors que si l'IL-1 ou le RANKL était ajouté au milieu de culture, les ostéoclastes résorbaient la matrice dentinaire[10].

Depuis la découverte du lien RANK-RANKL, RANKL (sous forme membranaire ou soluble) est considéré comme le seul facteur responsable de la différenciation ostéoclastique. Des études récentes montrent que TNFα stimule cette différenciation en l'absence de l'interaction RANK-RANKL. Ces

[10] Jimi et al., « Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. »

expériences ont permis de considérer que l'interaction RANK-RANKL n'est pas la seule voie possible de signalisation de différenciation des ostéoclastes. TNFα et IL-1 (Figure 15) peuvent jouer un rôle important dans la résorption osseuse pathologique au cours de l'arthrite, de l'ostéoporose ou de la parodontite.

Figure 7 : Schéma des voies de signalisation induisant la différenciation et l'activation des ostéoclastes



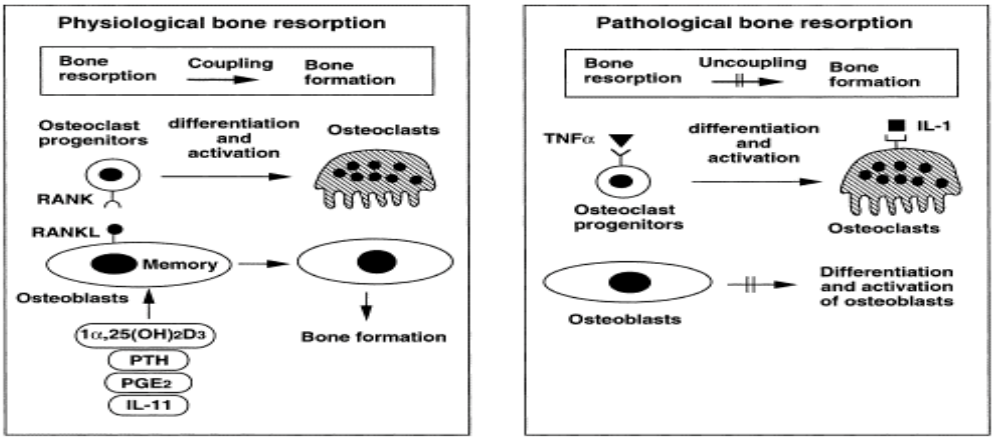
Source : Takashi et al , « Osteoclast generation » ,2002

Ces deux voies de signalisation sont liées à deux types différents de remodelages osseux (Figure 16) :

-l'un est physiologique et couplé à une néoformation osseuse par les ostéoblastes, le lien ostéoclastes-ostéoblastes permettant de détruire et de reformer de manière programmée la même quantité d'os à un site précis.

-l'autre est pathologique et conduit à une perte osseuse nette. Dans des conditions pathologiques, telle que la parodontite, les macrophages et/ou cellules T secrètent des cytokines inflammatoires tels que TNFα et IL-1 qui agissent directement sur les ostéoclastes progéniteurs. Cette situation est caractérisée par un découplage entre la résorption osseuse et la formation osseuse.

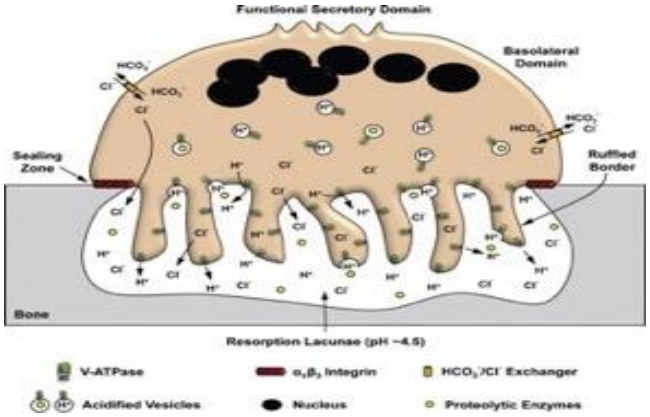
Figure 8 : Hypothèse de deux voies de régulation physiologique et pathologique des ostéoclastes



Source : Takashi et al , « Osteoclast generation », 2002

Les biologistes s'accordent sur le fait que la fonction principale des ostéoclastes est de résorber la matrice des os minéralisés, de la dentine et des cartilages calcifiés. Dans la revue Medecine/science de decembre 2001 le Pr Baron décrit le mécanisme de résorption osseuse tel que : « Lors de sa différenciation dans l'environnement médullaire, c'est en réponse à un stimulus chimiotactique que le précurseur de l'ostéoclaste est attiré vers la surface osseuse à résorber. Il le fait grâce à une augmentation de sa motilité, qui permet son extravasation, et sa migration vers la surface osseuse. Une fois la surface osseuse atteinte, les précurseurs ostéoclastiques y adhèrent et fusionnent de manière asynchrone, entrainant la formation d'une cellule multinuclée, l'ostéoclaste mûr. Lorsqu'il résorbe l'os, l'ostéoclaste est reconnu par une bipolarité morphologique et fonctionnelle. Le pôle en regard de la matrice osseuse, ou pôle apical, s'attache à cette matrice et délivre à proximité l'essentiel des secrétions cellulaires, à travers une bordure en brosse (Figure 9). Le pôle opposé, ou pôle basolatéral, est en rapport avec le microenvironnement (moelle osseuse et périoste) et a pour rôle des fonctions de régulation ».

Figure 9 : Schéma d'un ostéoclaste activé



Source : Qin et al., « V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption ». , 2012

1.3. Protéine de la matrice extra cellulaire :

La matrice osseuse est composée d'un échafaud de fibres de collagène tissées, où sont déposés entre les fibres, des cristaux d'hydroxyapatite de formule brute (Ca_{10} $[PO_4]_6[OH]_2$). Les autres protéines incluant les protéoglycannes, protéines glycosylées et non glycosylées permettent la formation des fibres de collagène et des cristaux. Ils ont aussi pour rôle de faire le lien entre la matrice extracellulaire et les cellules. La matrice extracellulaire de l'os contient aussi des sucres et lipides en faible quantité, contribuant à la phase organique de la matrice (1/3 de la matrice contre 2/3 de matrice inorganique).

1.3.1 Collagénique :

Le collagène est la protéine majoritaire (80-90 %) de la phase organique. Le collagène de type I représente plus de 95 % du collagène osseux, alors que le collagène de type V représente moins de 5 %. Les fibres de collagène sont stabilisées par des molécules connectives comprenant des résidus lysines. Ces molécules sont responsables de la résistance des fibres de collagène. Dans l'os mature les fibres de collagène forment des feuillets hautement organisés en couche qui se superposent de manière perpendiculaire laissant des espaces inter-fibrillaires où s'initie la minéralisation.

1.3.2 Non collagénique :

L'utilisation des techniques d'extraction dissociative a permis l'identification et la caractérisation de la plupart des protéines non collagéniques. Bien que des différences de composition liées à l'âge existent, les mêmes protéines sont toujours présentes quel que soit le type d'os. Parmi

elles, l'ostéocalcine (OCN) et les *bone sialoproteine* (BSP) sont essentiellement présentes dans les tissus minéralisés alors que d'autres telles que l'ostéonectine/SPARC (*secreted protein acidic, rich in cysteine*) et l'ostéopontine (OPN) sont retrouvées dans d'autres tissus. Ces protéines sont relarguées de la matrice par déminéralisation. On retrouve aussi des protéines telles que les protéoglycannes. Ces dernières sont généralement associées au collagène, les chaînes acides de ces protéines ont aussi des interactions avec les cristaux minéraux. En plus de ces protéines produites par les cellules osseuses, d'autres sont délivrées par le sang et s'agrègent aux minéraux de la matrice. Ces protéines comprennent l'?-2-HS-glycoprotéine, les immunoglobulines et les protéines α Gla.

1.4 L'os alvéolaire :

L'os alvéolaire est une partie spécialisée de la mandibule et du maxillaire, formant le support primaire des dents. Bien que ce soit un os fondamentalement comparable aux autres os, il est sujet à un remodelage rapide et continue, associé à l'éruption des dents et la fonction masticatrice. L'habilité de l'os alvéolaire à se remodeler rapidement est important pour le positionnement des dents et peut être délétère dans le cas de maladie parodontale.

La structure anatomique montre que l'os alvéolaire est composé d'os compact structuré en couches parallèles à la direction corono-apicale de la dent. Les fibres de Sharpey s'étendent de manière oblique de la fine paroi osseuse qui entoure l'alvéole au ligament alvéolaire. Une plus fine couche d'os formé d'os cortical s'étend à partir des os de la mâchoire et forme les surfaces linguales et vestibulaires des procès alvéolaire fait majoritairement d'os spongieux.

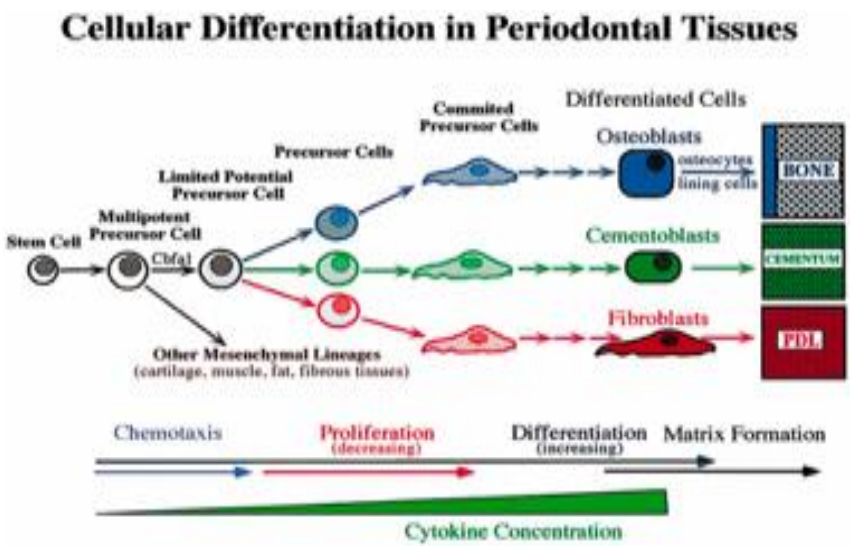
Les cellules de l'os alvéolaire sont similaires aux cellules des autres os. Néanmoins, il existe une interaction entre les fibroblastes du ligament alvéolaire et les ostéoblastes dans le processus de remodelage.

La matrice extracellulaire de l'os alvéolaire est assez similaire à celle des autres os .En effet, en complément du collagène de type I (>95 %), on peut retrouver dans l'os alvéolaire du collagène de type III et de type XII. Le collagène de type III est un collagène entrelacé avec le collagène de type I dans les fibres de Sharpey permettant une connexion et une stabilité entre le ligament et l'os. Alors que les collagènes de type I, V, XII sont produits par les ostéoblastes, le collagène de type III et une partie du collagène de type XII sont produits par les fibroblastes.

La jonction alvéolo-dentaire est composée de trois types de cellules différentes : ostéoblastes, cémentoblastes, fibroblastes qui dériveraient du même type de cellules souches mésenchymateuses dénommées cellules précurseurs à potentiel limité[11] (Figure 10).

Enfin, dans l'os alvéolaire, les mécanismes de communication intercellulaires font intervenir les mêmes cytokines et les mêmes hormones que dans les autres tissus osseux.

Figure 10 : Différenciation cellulaire dans le parodonte



Source : Sodek et McKee, « Molecular and cellular biology of alveolar bone » , 2000

[11] Sodek et McKee, « Molecular and cellular biology of alveolar bone. », 2000.

2. Ingénierie Tissulaire et Médecine Régénératrice

2.1. Introduction :

2.1.1. Généralités :

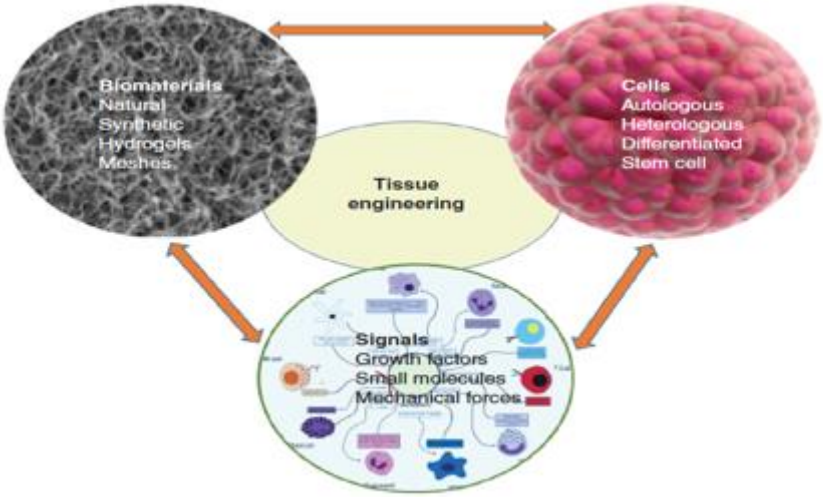
L'Ingénierie Tissulaire (IT) est une discipline qui utilise des cellules, des biomatériaux, des biomolécules, des signaux physiques et parfois de la robotique. La finalité de l'IT est de parvenir à la régénération d'un tissu capable de maintenir, restaurer ou améliorer la fonction d'un tissu endommagé. Bien que la première peau issue de l'IT ait été produite à la fin des années 1970, le terme n'a été introduit qu'en 1987.

Cependant, cet objectif était déjà présent dans l'Égypte antique lors de l'utilisation de prothèses en or pour les dents ou en bois pour les membres. Néanmoins, ces traitements font appel à des matériaux non vivants qui peuvent rétablir une fonction mais sont très différents du tissu originel. Le développement médical a permis au milieu du XXème siècle de remplacer des organes entiers par la transplantation. Le nombre limité de donneurs disponibles et le rejet de greffons ont conduit les chercheurs à développer la culture de tissus *in vitro*. La peau a été un des premiers produits issus de l'IT car sa culture *in vitro* est simple et peut être faite en deux dimensions. Le succès d'une telle approche a suscité l'intérêt des cliniciens pour appliquer ce principe à d'autres organes.

2.1.2. Principe :

Les termes d'IT et de Médecine Régénératrice sont souvent utilisés de manière interchangeable. En fait, l'IT implique la construction d'un tissu *in vitro* usant la triade : cellules, matériau support et signaux. Alors que la Médecine Régénératrice fait référence à des outils pour aider le corps à régénérer *in vivo* des tissus endommagés. L'Ingénierie Tissulaire et la Médecine Régénérative sont considérés aujourd'hui comme complémentaires.

Figure 11 : Triade de l'ingénierie tissulaire



Source : Rhami et Mhanna « Tissue engineering principles », 2016

Différentes approches ont été développées pour produire un tissu *in vitro*, l'approche la plus utilisée étant l'utilisation de matrices poreuses pré-faites (à partir de matériau brut) qui supportent les cellules et permettent une croissance tissulaire après implantation. Cette technique présente l'avantage de contrôler en amont les propriétés physico-chimiques de la matrice. Une fois la matrice fabriquée, les cellules sont implantées pour permettre une colonisation du matériau.

Au lieu d'implanter les cellules dans une matrice après fabrication, une autre stratégie consiste en l'encapsulation des cellules durant la formation de la matrice. Cette stratégie à l'avantage de réduire le temps de production mais le nombre de matrices disponibles est plus limité. Les hydrogels sont la plupart du temps utilisés pour cette stratégie, en raison de leur biocompatibilité et leur gélification à la température du corps. Le désavantage de l'encapsulation par hydrogel est que le tissu formé a de faible propriété mécanique et il est difficile de contenir les cellules au site d'implantation.

Une autre méthode utilisée est la décellularisation d'une matrice extracellulaire issue d'un tissu allogénique ou xénogénique. La matrice extracellulaire est utilisée comme support pour les cellules du patient. L'avantage de cette technique est la reproduction d'un milieu naturel proche des conditions physiologiques, les cellules peuvent s'y attacher, proliférer et se différencier. Cette méthode permet aussi de conserver les propriétés mécaniques originelles des tissus. La principale limite de cette méthode est la quantité limitée des matrices extra-cellulaires, la difficulté d'éliminer tous les éléments immunogènes et une distribution inhomogène des cellules implantées.

Néanmoins, cette technique a été utilisée avec succès dans le cadre de greffe de peau, de vessie et de valve cardiaque. Elle a permis la commercialisation de nombreux produits approuvés par l'EMA (*European Medecines Agency*) et la FDA (*Food and Drug Administration*).

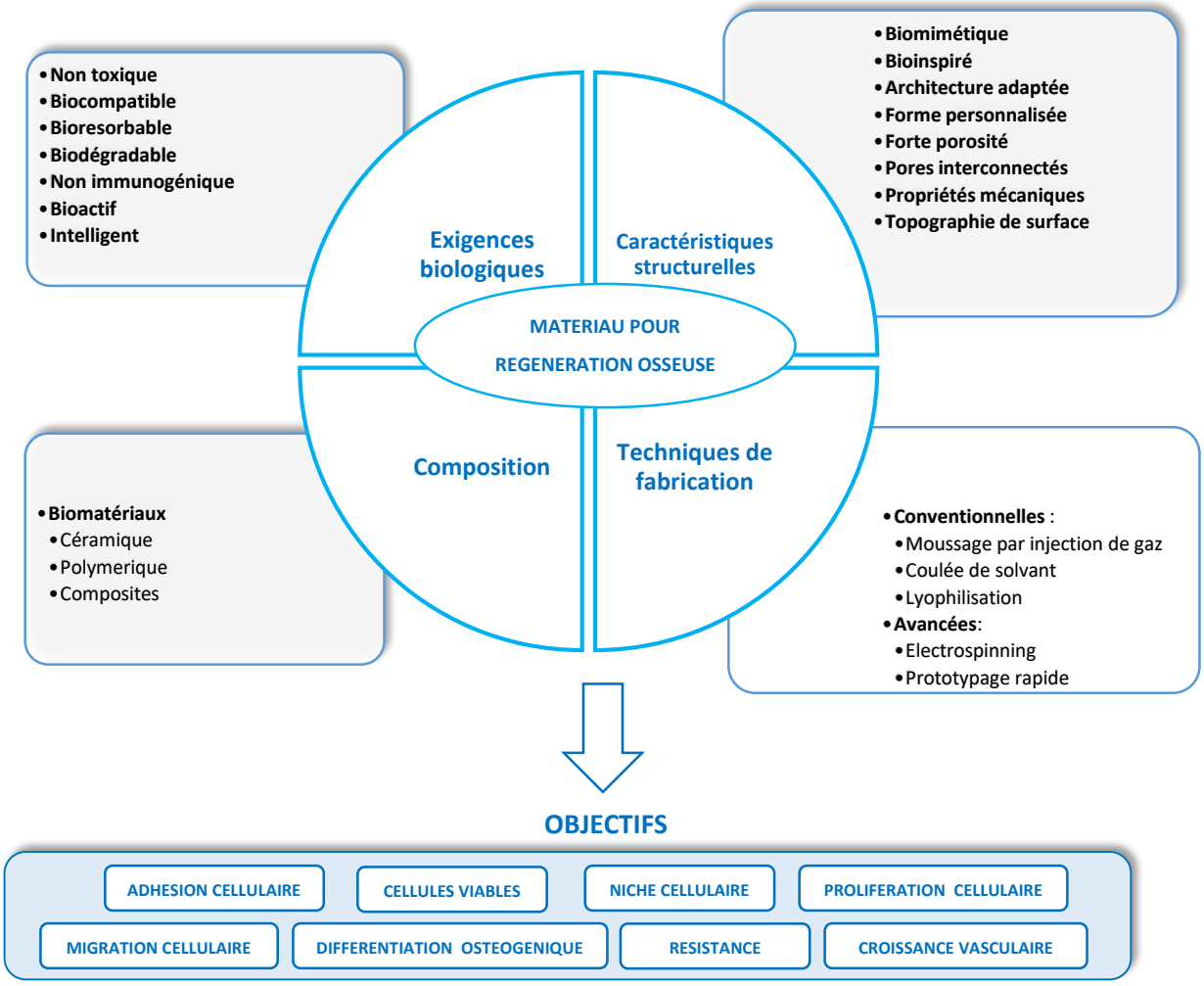
2.2. Matériau support (*scaffold*) :

Au cours de ces dernières décennies, un nombre important de biomatériau d'origine naturelle et synthétique a été proposé. Les recherches actuelles se dirigent vers des biomatériaux intelligents capables de diriger la fonction et/ou d'améliorer les performances cellulaires. Le rôle de ces biomatériaux est de fournir une structure de support des cellules et un milieu de diffusion des signaux intercellulaires. La synthèse d'une nouvelle matrice autogène et la dégradation du matériau support doivent être synchronisées pour ne pas qu'un processus aillent plus vite qu'un autre.

Généralement le but est de désigner un matériau qui mime la structure du tissu cible. En fonction de la complexité du tissu il n'est pas toujours possible de reproduire cette matrice *in vitro*. Des développements récents ont conduit à l'établissement de techniques telles que l'imprimante biologique (*bio-printing*) et la lithographie bi-photonique[12] qui permettent la production de structures tridimensionnelles précises. Ces techniques permettent aussi de positionner précisément les facteurs de croissance et les cellules dans la matrice. Dans le cadre de l'IT appliqué à l'os, le matériau support doit avoir les propriétés suivantes :

[12] Murphy et Atala, « 3D bioprinting of tissues and organs ».

Figure 12 : Schéma des propriétés idéales d'un matériau support en IT osseuse



Source : Auteur d'après Yang et al., « The design of scaffolds for use in tissue engineering » ,2016

- **Biocompatibilité :**

Le matériau de substitution doit être bien intégré par les tissus hôtes sans y induire de réponse immunitaire.

- **Porosité :**

Le matériau utilisé doit avoir des pores ouverts interconnectés. Cette structure poreuse doit permettre le développement des cellules. Il faut donc que la porosité soit assez élevée pour avoir un maximum de surface disponible. Cette structure doit faciliter la néo-vascularisation par les tissus environnants. De plus, le matériau doit avoir une microporosité adéquate pour la croissance de capillaires sanguins. Cette porosité interconnectée est importante pour la diffusion de nutriments, de gaz et le rejet de métabolites déchets résultants de la croissance cellulaire.

Cette porosité est particulièrement importante pour l'IT de l'os, car du fait du métabolisme osseux important, un taux élevé de transfert de masse est attendu et cela même dans des conditions *in vitro*. Par ailleurs, la porosité du matériau influence également sur la stabilité mécanique du tissu.

- **Taille des pores :**

La taille des pores est une composante importante du matériau. Si les pores sont trop petits, une occlusion va se produire par les cellules et empêchera la colonisation de la partie interne du matériau par les vaisseaux et les ostéoblastes. Dans le cadre de l'IT osseuse, il est assez bien établi que, la taille des pores devrait être comprise entre 200 à 900 µm[13]. En revanche, Holly et coll. ont proposé un concept différent. Dans leur étude, les auteurs pensent que la reconstruction osseuse ne peut s'opérer que par la mise en place d'une matrice temporaire avec de larges pores interconnectés allant de 1.2 à 2.0 mm. Cette approche améliore la croissance cellulaire et la vascularisation du fait d'un ratio surface/volume augmenté. Néanmoins, cette approche ne permet pas de mettre en place un matériau résistant et ne peut être utilisé dans les zones sujettes à de fortes stimulations mécaniques.

- **Propriétés de surface :**

Les caractéristiques chimiques et topographiques en surface jouent un rôle important dans l'adhésion et la prolifération cellulaire. Les propriétés chimiques sont en lien avec la capacité des cellules et protéines à adhérer au matériau. Les propriétés topographiques sont impliquées dans l'ostéoconduction. Comme défini par Davies et coll, l'ostéoconduction est le processus par lequel les cellules migrent vers la surface du substitut osseux à travers un caillot de fibrine, qui est établit juste après l'implantation du matériau. Cette migration de cellules ostéogéniques au travers d'un caillot va causer une rétraction de la matrice temporaire de fibrine. Une phase importante de ce processus est l'adhésion de la matrice de fibrine par le substitut osseux, car une mauvaise adhésion provoquera un détachement de la fibrine du fait de la rétraction cicatricielle et donc une mauvaise migration des cellules ostéogéniques. Il a été montré qu'une surface rugueuse est plus capable de maintenir la matrice fibrillaire qu'une surface lisse et donc cela conduit à l'amélioration de la migration des cellules ostéogéniques sur la surface du matériau support.

- **Propriété mécanique et résorption :**

In vitro, le matériau support doit avoir assez de résistance mécanique pour supporter une pression hydrostatique et maintenir les espaces où les cellules se multiplient et forment une matrice extracellulaire. *In vivo*, parce que l'os est un tissu soumis en continu à des stress mécaniques, la construction d'un tissu issu de l'IT doit correspondre aux propriétés mécaniques du tissu receveur. De plus le taux de résorption du matériau support doit être approprié au taux de croissance du néo tissu, pour qu'à la fin du processus, le matériau support soit totalement remplacé par la matrice de l'hôte.

---

[13] Yang et al., « The design of scaffolds for use in tissue engineering ».

- **Ostéoinduction :**

L'ostéoinduction est le processus par lequel les cellules souches et ostéoprogénitrices sont recrutées au niveau du site de cicatrisation osseux et sont stimulées pour activer la voie de différenciation ostéogénique. Par ailleurs, lorsque le défaut osseux est important, l'ostéoinduction naturelle combinée à un substitut osseux n'est pas suffisant. C'est pour cela que ce substitut doit aussi être ostéoinducteur *per se*.

2.2.1 Biomatériau issu de greffe osseuse :

La greffe osseuse autologue est considérée comme la référence standard, du fait du faible risque immunogène et du faible risque de transmission de maladie qui est associé à l'allogreffe ou la xénogreffe. De manière plus évidente, la greffe autologue permet de fournir une population viable cellulaire et des facteurs de croissances nécessaires à la formation osseuse. En chirurgie orale, des sites locaux tels que la tubérosité maxillaire ou la symphyse mandibulaire peuvent être utilisés pour des greffes de petites étendues. Néanmoins, il existe une forte demande à la substitution de l'autogreffe, mais des inconvénients existent : l'autogreffe est limitée en quantité tissulaire, le site donneur peut fournir une mauvaise qualité d'os , la durée de l'opération est rallongée et il existe une augmentation du risque d'infection. Bien que les allogreffes et xénogreffes soient peu ostéogènes, elles peuvent être préparées pour leurs capacités d'ostéoconduction et parfois d'ostéoinduction.

L'allogreffe est disponible sous différente forme : fraîchement congelée, lyophilisée ou déminéralisée et lyophilisée. Les propriétés mécaniques de l'allogreffe issue d'un cadavre ou d'un patient vivant sont substantiellement altérées pendant la décellularisation, la stérilisation, et la conservation à des fins cliniques. Ces traitements détruisent toutes les cellules vivantes qui sont ostéogéniques et ostéoinductrices, laissant une structure de support composée de matrice extracellulaire osseuse (minéraux et protéines). L'allogreffe sert de matériau support pour les ostéoblastes du receveur. En fonction de la méthode de production du matériau, l'allogreffe peut être ostéoinductrice si elle conserve les propriétés nécessaires au recrutement des CSM sur le site et contribue à leur différenciation (appelé dans la littérature « *cell homing* » ou niche cellulaire).

La xénogreffe offre une alternative moins coûteuse et plus abondante car elle est d'origine coraline, porcine ou bovine. Une étude récente comparant des implants dentaires à la suite d'une augmentation du plancher sinusien par ajout d'os autologue comparé à de l'os d'origine bovine commercialement disponible a montré qu'après 5 ans, la xénogreffe avait le même taux de survie des

implants que l'autogreffe[14]. Il est à noter que la survie d'un implant comprend d'autres facteurs tels que la technique chirurgicale ou la démographie des patients inclus dans l'étude.

2.2.2 Biomatériau polymérique :

Les polymères peuvent être naturels ou synthétiques. Les polymères naturels tels que la fibrine, l'acide hyaluronique, le chitosan et le collagène présentent une bonne biocompatibilité, une bonne ostéoconductivité et une faible immunogénicité. Ces matériaux présentent les inconvénients d'une résorption non contrôlée et d'une instabilité mécanique. Les polymères synthétiques comme le *polyanhydride*, le *polycaprolactone* (PCL), le *polyphosphazene*, l'acide polylactique (PLA), le *polyether ether ketone* (PEEK) et l'acide polyglycolique (PGA) ont non seulement la possibilité d'une dégradation contrôlée mais aussi celle de personnaliser leurs propriétés mécaniques et leur forme, celle d'augmenter l'adhésion cellulaire et le potentiel de délivrance des molécules solubles. De plus, ce type de polymères peut être produit à coût réduit et en quantité importante et uniforme. L'inconvénient majeur de ce type matériau est sa faible capacité à interagir avec les cellules en comparaison avec les polymères naturels. Une autre classe importante de polymères utilisée dans l'IT osseuse, sont les hydrogels. Ce sont des polymères hydrophiles pouvant absorber de l'eau de 0,1 à 1000 fois leur poids sec. Les hydrogels naturels (agarose, alginate et gélatine) ou synthétiques (*polyvinyl alcohol*) sont capables de mimer la matrice extracellulaire et de délivrer des molécules bioactives.

2.2.3 Biomatériau céramique :

Les céramiques bioactives peuvent être naturelles ou synthétiques (coralline, hydroxyapatite (HA), phosphate tricalcique (TCP), verre bioactif et silicate de calcium). Chimiquement similaire à l'os, cette classe montre une forte résistance à la compression et une faible ductilité, ce qui leur confère une forte résistance à la déformation mais aussi une fragilité. Les céramiques phosphocalciques sont biocompatibles, elles ne présentent pas d'activité ostéogéniques mais sont ostéocondutrices, fournissant un support pour les cellules et protéines de l'os. De manière intéressante, le contact de la matrice avec l'os conduit à la formation d'un tissu ostéoïde acquérant progressivement les propriétés mécaniques de l'os. Parmi les plus utilisées, nous retrouvons les céramiques phosphocalciques composées de :

- L'hydroxyapatite est très proche chimiquement de l'apatite de los. Il est considéré comme ostéoconducteur mais très peu résorbable.

[14] Lutz et al., « Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study ».

- Le phosphate tri calcique (TCP) de formule $Ca_3(PO_4)_2$ se trouve sous une forme cristalline α ou β, le plus utilisé étant le β-TCP. Il s'agit d'une céramique poreuse qui se transforme en hydroxyapatite *in vivo*. Le TCP est ostéoconducteur et a une résorption rapide par solubilisation des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} utilisés dans la néoformation osseuse.
- Les céramiques biphasées (BCP) associent l'HA et le β-TCP. Ce matériau allie les propriétés physiques de chacun des composés : une stabilité à long terme pour l'adhérence cellulaire et une résorption permettant la création de néotissus. Ainsi le ratio HA/TCP peut être modulé en fonction de la vitesse de résorption et le type d'os. Néanmoins, les BCP ne sont pas ostéoinductrices.
- Les ciments de phosphate de calcium injectables. Ces ciments se présentent sous forme de pâte obtenue par le mélange d'une poudre (HA, β-TCP, phosphate dicalcique dihydraté) et d'une solution aqueuse. La solidification du mélange s'opère après la formation d'une apatite carbonatée de faible cristallinité similaire à l'os. Ces ciments n'ont pas une porosité adéquate retardant la résorption du matériau et la prolifération cellulaire.

2.2.4 Biomatériau composite (hybride) :

Les composites consistent en une combinaison d'au moins deux matériaux avec différentes propriétés. La combinaison peut être un copolymère, un polymère-polymère ou un complexe polymère-céramique. Le copolymère dérive d'au moins deux types de monomère tel que le PLGA qui est la combinaison de polylactide et de polyglycolide considéré comme un matériau pertinent pour l'IT osseuse du fait de sa bonne résorption et de sa facilité de production.

2.3. Les cellules en culture :

Les cellules sont les unités de vie d'un tissu. Les nouvelles techniques de culture cellulaire et de différenciation de cellules souches ont ouvert de nouveaux horizons dans le domaine de l'IT. Les cellules autologues sont préférées dans ces stratégies car elles n'induisent pas de réaction immunogène, éliminant le besoin d'immunosuppresseur et leurs effets indésirables. Néanmoins, les cellules autologues sont limitées en quantité et requièrent des processus longs pour obtenir le tissu voulu. Les recherches actuelles se concentrent sur l'utilisation de cellules allogéniques ou xénogéniques pour pallier ces limites. L'utilisation de telles cellules reste associée à un obstacle majeur de rejet immun, à un risque de transmission de maladie, et à des considérations éthiques. L'utilisation

de cellules souches en IT continue de croître et a conduit aujourd'hui à les utiliser en clinique. Bien que les cellules souches mésenchymateuses adultes soient les plus utilisées, les cellules souches embryonnaires trouvent leur application dans l'industrie de l'IT. Enfin une découverte fondamentale a permis d'accéder à une nouvelle Source de cellules souches, les cellules souches pluripotentes induites (IPSC pour *induced pluripotent stem cells*). Cette découverte menée à l'Université de Kobé par S. Yamanaka a été récompensée par le prix Nobel de Physiologie et de Médecine 2012. En effet, l'étude menée par l'équipe de Yamanaka, a montré que la transfection de quatre gènes (Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4), permet de transformer des cellules différenciées adultes en cellules souches. Ces cellules souches sont capables à nouveau de se différencier en d'autres types cellulaires. Cette découverte a révolutionné la biologie ainsi que l'IT. Aujourd'hui, il existe de nombreux procédés d'induction de cellules souches.

L'utilisation de cellules en IT de l'os est aujourd'hui admise comme une voie d'amélioration des résultats des substituts osseux utilisés seuls. Un débat perdure dans le choix des cellules les plus efficaces à utiliser cliniquement. Le mécanisme proposé par lequel les cellules implantées améliorent la régénération osseuse implique (i) le relargage de molécules, facteurs de croissances ostéogéniques et angiogéniques (ii) la formation de site recrutant les cellules ostéogéniques et angiogéniques de l'hôte (iii) le dépôt actif de matrice extracellulaire. Le défi majeur dans l'utilisation de cellules réside dans l'identification des Sources de cellules les plus efficientes et dans celle des cellules qui pourront se différencier en ostéoblastes et en tissu vasculaire. On distingue ainsi deux grands types cellulaires pouvant être utilisés en IT de l'os : les cellules souches et les ostéoblastes.

2.3.1 Cellules souches :

Les cellules souches sont reconnues tant pour leur capacité de régénération que pour leur capacité de différenciation dans un environnement particulier. Néanmoins, le type de cellules souches est varié en fonction de leur origine et de leur capacité à former un tissu osseux. Pour une application clinique, les cellules utilisées doivent être facilement isolables, proliférer de manière efficiente, avoir des marqueurs ostéogéniques stables *bona fide* pour la formation de tissu osseux et avoir une sécurité à long terme (rejet immun, maladie du greffon contre hôte, cancérogénicité).

- **Cellule souche embryonnaire (CSE) :**

Les cellules souches embryonnaires sont par définition obtenues d'un embryon formé après la fertilisation jusqu'à la neuvième semaine de gestation. Les cellules embryonnaires sont souvent dérivées d'embryons formés *in vitro* pour des raisons éthiques. Ces cellules sont pluripotentes et ont une activité proliférative forte. Elles peuvent éventuellement être utilisées comme Source unique

pour les multiples types de cellules de l'os comprenant, les cellules ostéogéniques, les cellules vasculaires, les ostéoclastes et les cellules nerveuses.

Une étude montre que l'association d'hydroxyapatite, de CSE et de BMP produit des résultats satisfaisants dans la reconstruction osseuse chez la souris immunodéficiente[15]. Les CSE ont un bon potentiel pour être utilisés en clinique mais de nombreux écueils concernant la stabilité du caryotype de ces cellules formant des tératomes et leur cancérogénicité reste à éclaircir. Enfin des incompatibilités immunologiques peuvent avoir lieu.

- **Cellule souche pluripotente induite (IPSC) :**

Les IPSC sont des cellules souches pluripotentes dérivées de cellules matures. La première IPSC produite le fut en 2006 par transfection rétrovirale de quatre gènes (Oct4, Sox2, Klf4 et Myc) au sein d'un fibroblaste murin. Cependant, on a aussi constaté que la mémoire épigénétique des cellules des IPSC continue à influer sur le potentiel de différenciation des cellules et que l'intégration d'oncogènes doit être surveillée avant une éventuelle utilisation clinique. Il sera donc crucial d'utiliser des IPSC n'ayant pas subi de transformation génétique par rétrovirus dans le cadre d'une stratégie d'IT osseuse. D'autres approches permettent d'obtenir des IPSC sans transfection génétique de manière plus ou moins efficace.

- **Cellules souches mésenchymateuses (CSM) :**

Les CSMs sont aussi reconnues comme possédant un bon potentiel en IT de l'os car elles se différencient et forment de l'os naturellement. Ce potentiel a conduit les chercheurs à les isoler dans différentes parties du corps et à les caractériser. Les CSM sont définies au travers des marqueurs CD (*cluster of differentiation ou classe de différenciation)* comme par exemple négatif pour CD34, CD45, CD14, CD11a, CD19 et HLA-DR , positif pour STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD146 et CD44. En outre, les CSM ont été isolées à partir de nombreux tissus : moelle osseuse, sang périphérique, membrane synoviale, sang du cordon ombilical, dents déciduales, pulpe dentaire, fluide amniotique, tissus adipeux, cerveau, peau, cœur, rein et foie. L'incorporation de CSM dans un biomatériau d'IT osseuse est une stratégie largement étudiée pour la formation d'os et l'ostéointégration dans le cadre de réparation d'un défaut ou de régénération. Les mécanismes par lesquels la régénération est améliorée impliquent la différenciation ostéogénique des CSM, la formation de matrice extracellulaire ainsi que l'ostéoinduction par le relargage de facteurs de croissances ostéogéniques et la migration de cellules ostéoprogénitrices de l'hôte. De plus, les CSM prédifférenciées, dans une voie ostéogénique avant implantation ont montré une capacité de régénération plus rapide que celles non prédifférenciés. Bien que les CSM aient démontré un très bon

[15] Kim et al., « In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds ».

potentiel pour l'IT osseuse, de nombreux écueils sont à noter avant leur utilisation clinique. En effet des études ont montré qu'après 24-40 doublements de la population cellulaire, les CSM atteignent un stade de sénescence et ne prolifèrent plus. Aussi, le potentiel ostéogénique *in vitro* décroit significativement *in vivo* en fonction de l'âge du donneur et de sa condition systémique. Il est difficile de définir les CSM par le manque de données concernant les marqueurs cellulaires communs aux CSM des différentes Sources. Ces facteurs limitent actuellement la quantité et la qualité de CSM pouvant être utilisée dans une application clinique. Il faut quatre à six semaines approximativement d'expansion cellulaire avant de pouvoir traiter un patient. Aussi, la culture cellulaire de long terme pourrait conduire à la sélection de cellules avec un caryotype anormal et leur transformation en cellules malignes. Dernièrement, l'utilisation de sérum bovin fœtal (SBF) pendant la phase de prolifération *in vitro* a été remise en cause, du fait du risque de la transmission de prions et un possible rejet immun par de la présence de protéines xénogéniques. Les milieux synthétiques de cultures avec des facteurs de croissances et dépourvus de sérum sont une alternative.

De nombreuses stratégies sont présentées comme ayant la capacité de réduire la perte du pouvoir proliférateur et ostéogénique des CSM. Ces méthodes nécessitent la présence de FGF-2 et le maintien de CSM dans différentes matrices (exemple : collagène type I, matrigel…) au lieu d'une culture passive sur des plaques en plastique. Enfin les CSM présentent l'avantage d'être peu immunogènes et d'avoir une action immunosuppressive. Elles n'induisent pas la prolifération de lymphocytes et suppriment la prolifération des cellules T, la production de cytokines en réponse d'allo antigènes, la prolifération des cellules dendritiques et des cellules NK (*natural killer*). Ces données sont encourageantes pour l'utilisation thérapeutique de CSM.

- **Cellules souches dérivées d'adipocytes (CSDA) :**

Les CSDA sont des CSM particulièrement disponibles et faciles d'accès. Elles ont différents potentiels de différenciation, (ostéogénique, chondrogénique, adipocyte, cardiomyocyte, endothéliocyte). Le profil des CSDA est fonction de l'endroit de la biopsie (bras, cuisse, abdomen) mais ils partagent des marqueurs de surface communs : CD44, CD90, CD13, CD29, CD73, CD166 et CD105[16]. Il semble que ces cellules n'expriment pas ou peu les marqueurs STRO-1 ou CD34. L'expression de ces marqueurs peut varier au cours des passages cellulaires et de la technique d'isolation. Le potentiel ostéogénique de ces cellules a été démontré *in vitro* mais aussi *in vivo*. *In vitro*, les CSDA sont différenciées selon le même protocole que les CSM. Néanmoins, une étude montre que l'ajout de BMP-2 peut avoir ce rôle[17]. De plus, les CSDA prédifférenciées ont montré une bonne adhésion, une activité proliférative et la formation d'un tissu osseux homogène dans différents matériaux supports

[16] Cheng et al., « Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine ».
[17] Knippenberg et al., « Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells ».

tridimensionnelles. Bien que l'infusion de CSDA ait montré une amélioration de la régénération en orthopédie, le mécanisme sous-jacent n'est pas encore totalement éclairci. Ces cellules pourraient être implantées dans une technique à une étape, évitant la phase de d'expansion cellulaire *in vitro* (réduisant le coût et le temps). Dans cette approche, la biopsie, l'isolation des cellules, l'implantation dans un substitut osseux et la greffe de ce matériau peut être fait en une opération de quelques heures sans les contraintes de la culture *ex vivo*. Cette approche est possible car le nombre de CSDA dans une liposuccion est 500 fois supérieur que dans une biopsie de la moelle osseuse. Enfin, les résultats d'un tel protocole, montre une formation d'un tissu vascularisé, la présence de BSP et de d'OCN au bout de 8 semaines post-opératoire. Les CSDA ont donc un bon potentiel pour la fabrication d'os issus de l'IT.

- **Cellules souches dérivées du sang périphérique (CSDSP) :**

Les CSDSP sont des CSM. Leur isolation repose sur une technique pratique et très peu invasive. A l'origine, les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse. Ching et coll ont proposé une technique qui, à partir de 2 mL de sang périphérique, permet d'obtenir environ 0,5 à 1 million de cellules après 2 semaines de culture cellulaire, et même jusqu'à 5 millions de CSDSP après deux passages. Les CSDSP ont le même potentiel de différenciation que les CSM issues de la moelle. Elles possèdent un haut potentiel angiogénique ainsi qu'une capacité à la néo-vascularisation des défauts osseux. Bien que l'efficacité de ces cellules n'ait pas été totalement évaluée dans le cadre de la régénération osseuse, d'autres types semblables (CSM de la moelle osseuse) l'ont été et ont conduit à des résultats satisfaisants. Cependant, les CSDSP doivent faire encore l'objet de recherches supplémentaires pour être utilisées en clinique.

- **Cellules souches dérivées de la pulpe dentaire (CSDPD) :**

Les CSDPD peuvent se différencier en odontoblastes, en chondrocytes, en ostéoblastes, en adipocytes, en cellules endothéliales ou en cellules nerveuses. Les CSDPD sont isolées de la pulpe dentaire digérées et sélectionnées par une technique de cytométrie en flux magnétique utilisant l'anticorps anti-STRO-1. L'intérêt grandissant pour les cellules souches, et la possibilité de conserver ces cellules ont permis à de nombreuses sociétés (Bio EDEN, Provia Laboratories Inc) de développer la technique d'extraction et de conservation des cellules souches issues de dents déciduales exfoliées pour de futures applications cliniques en Médecine Régénératrice. Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens concernant l'application clinique notamment l'obtention de quantité suffisante de cellules, la composition et la qualité de la matrice minérale produite en comparaison celle de l'os.

2.3.2 Ostéoblastes :

L'utilisation d'ostéoblastes autologues est le choix le plus pertinent du fait de la non immunogénicité et de la possibilité de faire proliférer ces cellules *ex vivo* à partir d'une biopsie. Néanmoins, cette méthode, coûteuse en temps, ne permet d'extraire que peu de cellules après la dissociation des tissus et les cellules obtenues ont une capacité de prolifération relativement basse ce qui limite le nombre de cellules implantables dans le matériau support. De plus, dans certaines pathologies osseuses, les ostéoblastes ne sont pas appropriés pour la transplantation du fait de leur profil d'expression de protéines. Une alternative est l'utilisation d'ostéoblastes xénogéniques qui pourraient donner un rendement cellulaire adéquat mais subsistent une possibilité de transmission de maladies, un risque de rejet immunitaire et des questions éthiques. Dans ce contexte, cette approche a été abandonnée par la plupart des équipes de recherche.

2.3.3 Cellules autologues issu de prélèvement :

- **Ponction de moelle osseuse concentrée :**

La régénération osseuse peut être réalisée par la ponction de moelle osseuse du patient (généralement au niveau de la crête iliaque). La ponction contient différent type de cellules régénératives telles que les CSM, cellules souches endothéliales, cellules souches hématopoïétiques, plaquettes, lymphocytes et granulocytes. Chacune de ces cellules joue un rôle effectif dans le processus de régénération osseuse. Les cellules souches endothéliales sont angiogéniques, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en plaquettes sanguines qui contribuent à l'adhésion intercellulaire et à la libération de facteurs de croissance, les CSM forment des ostéoprogéniteurs et chondroprogéniteurs, les lymphocytes supportent la migration et la prolifération des cellules souches endothéliales, enfin les granulocytes sont pourvoyeurs de VEGF. De nombreuses études cliniques viennent étayer l'intérêt de l'apport de la ponction de moelle osseuse concentrée en orthopédie dans le cas d'ostéonécrose et de fracture avec retard de consolidation[18]. Cette approche est une méthode dotée d'un recul clinique important mais qui reste relativement invasive.

- **Les concentrés plaquettaires** :

N'étant pas une Source de cellules régénératrices, les concentrés plaquettaires peuvent être une Source de facteurs de croissance à ajouter lors des constructions d'IT osseuse. Étant originellement utilisés pour des raisons transfusionnelles, les concentrés plaquettaires sont utilisés aujourd'hui à des fins régénératives. On distingue principalement le plasma riche en plaquettes (PRP) et le PRF (plasma riche en fibrine (PRF). Le PRP est un concentré de plaquettes dans un volume réduit de plasma. Il est

[18] Connolly et al., « Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. »

facile d'obtention car il nécessite simplement du sang périphérique et une activation avec un mélange de thrombine et de calcium. Le PRP autologue pourrait être utilisé pour faciliter la régénération osseuse du fait de sa composition en facteurs de croissance qui ont une action sur la prolifération cellulaire et la synthèse de matrice extracellulaire (ex : TGF β-1, PDGF-BB, VEGF-A et IGF -1). Son utilisation a montré une meilleure régénération osseuse que l'utilisation d'un facteur de croissance seul, cela pouvant être expliqué par l'effet synergique du cocktail moléculaire présent dans le PRP. Dans le cadre de la vascularisation, le PRP n'a pas seulement un rôle pro-antigénique mais il induit aussi les cellules endothéliales à exprimer un phénotype pro-ostéogénique. L'expérimentation *in vivo* du PRP a donné des résultats contradictoires, pouvant être expliqués par les différences entre les lots d'animaux, le protocole d'obtention du PRP, le type de défaut osseux et la mesure des résultats. De plus, la préparation du PRP à une forte variabilité en concentration de facteurs de croissance en fonction du patient et du protocole. Bien que le PRP ait été expérimenté cliniquement pour la réparation de tissus mous tels que les nerfs, les tendons, le cartilage et le ligament, son inutilité dans le cadre de la régénération osseuse a été établi cliniquement[19].

Le PRF est une technique évolutive du PRP présentant l'avantage de ne pas utiliser de thrombine exogène, et contenant un réseau de fibrine permettant de s'en servir chirurgicalement comme membrane. Cette approche permet aussi de libérer les facteurs de croissance de manière contrôlée et les cellules leucocytaires. L'utilisation du PRF a été expérimentée majoritairement en Parodontologie où la majorité des études ont montré une amélioration des lésions parodontales et des récessions gingivales. Concernant la régénération de l'os, peu de données sont disponibles et aucune n'a un niveau de preuve suffisant pour conclure à son intérêt dans la néoformation osseuse. Enfin, il apparaît que les constituants des granules denses des plaquettes (ex : sérotonine, ATP, Ca^{2+}) ont un possible effet inhibiteur sur le métabolisme osseux, ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires des études sur l'utilisation des concentrés plaquettaires dans la régénération osseuse[20].

2.4. Molécules régénératrices :

Après avoir fourni des cellules et un substrat, les cellules requièrent certains signaux pour survivre et synthétiser leur propre matrice qui éventuellement pourra remplacer le substitut. Les signaux sont en général fournis par le microenvironnement cellulaire et sont internalisés par les cellules pour être traduits en réponse cellulaire comme la prolifération, l'apoptose, la migration, la différenciation et la synthèse de matrice. Dans les paramètres importants de la signalétique cellulaire,

[19] Del Buono et al., « Platelet rich plasma and tendinopathy: state of the art. »
[20] Badran et al., « Platelet concentrates for bone regeneration : current evidence and future challenges ».

nous retrouvons le taux d'oxygène, la stimulation mécanique, les facteurs de croissance et les molécules de la matrice extracellulaire. Il a été montré que les différents tissus ont besoin de paramètres différents, et un même tissu a des besoins différents en fonction de la profondeur du tissu et de son stade de maturation. En outre, les bioréacteurs améliorent le transport de masse, qui est un pré requis dans l'IT tridimensionnelle, aussi cette technologie permet de standardiser et d'automatiser des cultures cellulaires pour obtenir des résultats reproductibles. Les facteurs de croissances et les cytokines ont un rôle important sur le comportement cellulaire, tandis que le FGF-2 maintient les cellules souches pluripotentes alors que le TGFβ induit une différenciation.

Un défi majeur dans la construction de tissu issu de l'IT osseuse est le besoin de contrôler et de reproduire une cinétique de relargage qui mime celle présente pendant la réparation ou la morphogenèse de l'os. Une délivrance séquentielle ou simultanée spatio-temporelle de différents facteurs de croissance peut être effectuée en ciblant la fenêtre thérapeutique où une molécule doit être délivrée pour contribuer à la formation osseuse et l'angiogenèse. Par exemple, la délivrance séquentielle de BMP-2 puis de TGFβ ou de VEGF puis de BMP a montré une augmentation de la formation osseuse comparée à leur utilisation seul[21]. Le taux de relargage d'un facteur de croissance est lié à la relation chimique entre le matériau et le facteur de croissance. Cette relation peut s'effectuer de manières différentes : (i) Mélange des facteurs de croissance avec la matrice (interaction physico-chimique), (ii) Encapsulation des facteurs de croissance, (iii) Immobilisation chimique ou physique. Les applications cliniques récentes utilisent un biomatériau transporteur solubilisant les facteurs de croissance, le biomatériau et ensuite adsorbé sur des particules de substitut osseux. D'autres types de chargement ont été évalués lors d'étude précliniques comme l'encapsulation de facteurs de croissance dans des microparticules polymériques (1-100 µm). La diffusion des molécules à travers ces microparticules dépend de la taille des molécules et de la taille des microparticules. Enfin les signaux peuvent être conjugués à la surface du matériau support par liaison covalente, stratégie utilisée dans le cadre de l'héparine et de BMP-2. En effet, puisque l'héparine est affine pour BMP-2, les chercheurs ont donc conjugué l'héparine au biomatériau et ajouter du BMP-2, ce qui permet à ce dernier d'être relargué de manière contrôlée[22].

2.4.1 PDGF :

Le rôle principal de PDGF est la promotion de la cicatrisation des tissus mous. Il a été introduit pour améliorer la cicatrisation dans des ulcérations chez des patients diabétiques et a été approuvé quelques années plus tard en chirurgie dentaire pour la régénération parodontale. *In vitro*, les études

[21] Cui, Dighe, et Irvine Jr, « Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering ».
[22] Lee et Shin, « Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering ».

montrent que le PDGF stimule les populations cellulaires clés pour la régénération parodontale, augmentant la synthèse d'ADN des cémentoblastes et régulant l'expression de l'OPN[23]. PDGF stimule aussi la mitose et le chimiotactisme des cellules du ligament alvéolo-dentaire (LAD). Il a un effet prolifératif synergique lorsqu'il est combiné aux allogreffes. Les cellules du LAD semblent moduler la formation osseuse par l'accroissement de la prolifération ostéoblastique, l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes et l'expression des marqueurs de la minéralisation (OPC, OCN). Dans le cadre de la pose immédiate d'implants dentaires, le PDGF combiné à une xénogreffe permet une amélioration du niveau osseux évaluée radiologiquement.

2.4.2 BMP :

Les BMP font partie de la superfamille des TGF-β et possèdent des propriétés ostéoinductrices importantes, particulièrement pour BMP-2,-4,-6,-7 et -9. BMP-2 et BMP-7 stimulent la différenciation des cellules du LAD en ostéoblastes et augmentent l'expression des marqueurs de la minéralisation lorsque ces molécules sont ajoutées aux cellules du LAD ou aux ostéoblastes *in vitro*. Les BMPS ont aussi montré un rôle d'inhibition de la prolifération et minéralisation des cémentoblastes ainsi que des fibroblastes de la gencive. Ils sont principalement utilisés pour améliorer la formation osseuse dans le cadre de l'orthopédie et la chirurgie implantaire. Concernant les thérapeutiques parodontales, les BMP améliorent la rapidité de la cicatrisation osseuse et la quantité d'os, mais limitent la cémentogenèse conduisant à des ankyloses et des résorptions radiculaires. La rh-BMP-2 (rh : recombinant humain) est commercialement disponible pour le comblement alvéolaire après extraction et les élévations du plancher sinusien (2007). En orthopédie, cette molécule est disponible pour les fractures du tibia ouvertes avec broche intramédullaire (2004) et l'arthrodèse lombaire (2002). Dans le cadre de l'élévation du plancher sinusien, BMP-2 améliore le gain osseux sur le plan histologique et radiologique, mais aussi peut être indiquée pour l'augmentation osseuse verticale et horizontale. La délivrance de BMP-2 au travers d'un biomatériau poreux pourrait moduler son effet sur le plan qualitatif. On peut noter des complications liées à BMP-2 telles qu'un échec de la cicatrisation ou la présence de séromes post-opératoires. Comparativement à BMP-2, BMP-4 et BMP-7 présentent les mêmes effets.

2.4.3 FGF-2 :

Initialement le FGF-2 a été découvert par la stimulation des fibroblastes bovins. Dans le cadre du parodonte, cette molécule a un effet sur les tissus mous par l'induction de la prolifération de

[23] Saygin et al., « Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts ».

l'épithélium gingival, des cellules du LAD et des fibroblastes du conjonctif. En outre, FGF-2 inhibe la minéralisation et l'expression des phosphatases alcalines par les cellules du LAD, tout en maintenant leur potentiel de différenciation et l'expression de l'OPN. Ces propriétés couplées à une forte activité angiogénique font de FGF-2 un facteur important dans la régénération parodontale. Le FGF-2 pourrait jouer aussi un rôle de régulateur dans l'IT osseuse en maintenant l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse.

2.4.4 GDF-5 (growth differentiation factor 5) :

Tout comme les BMP, GDF-5 appartient à la super famille des TGF-β et partage une structure similaire. GDF-5 stimule la prolifération des cellules du LAD, la différenciation précoce des ostéoblastes et la synthèse de matrice extra-cellulaire par ces deux types cellulaires. Lorsque que le matériau β-TCP est chargé en GDF-5, cela augmente de manière significative la régénération parodontale chez les canins et les primates. En implantologie, GDF-5 améliore la qualité du tissu péri-implantaire et la stabilité de l'implant. On note une meilleure régénération osseuse lorsque des particules d'hydroxyapatite issues de l'os bovin (Bio-Oss®) sont recouvertes de GDF-5.

2.4.5 Tériparatide :

Le tériparatide (rh-PTH(1-34)) est un médicament utilisé dans le traitement de l'ostéoporose. Cette molécule est une protéine comprenant les 34 premiers acides aminés de la PTH. Il a été montré chez le rat que cette molécule améliore la minéralisation osseuse, la formation osseuse alvéolaire après extraction et prévient la perte osseuse parodontale. Dans certaines procédures de régénération osseuse guidées, cette molécule augmente la formation osseuse autour de l'implant[24].

2.5 Application préclinique et clinique de l'IT osseuse :

Les thérapies cellulaires et génétiques sont prometteuses pour améliorer les techniques actuelles de régénération osseuse par l'augmentation de la bioactivité du matériau et la diffusion accrue des facteurs de croissances locaux. Même si de nombreux organes/tissus ont été développé au travers de l'IT (cœur, vessie, nerf, ovaire, dent, etc…), seulement certains ont été implantés avec succès chez l'Homme. Les organes qui aujourd'hui peuvent être considérés comme cliniquement disponibles sont la vessie, les vaisseaux sanguins, la peau et la cornée.

[24] Jung et al., « The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration ».

2.5.1 Application clinique :

Dans le but de régénérer de l'os, l'application d'une solution d'IT osseuse est très dépendante de la situation clinique. Par exemple, une fracture du tibia sans consolidation demandera une stimulation de la cicatrisation alors que d'autres régénérations osseuses devront avoir recours à un support mécanique.

2.5.1.1 Orthopédie :

- **Fracture et arthrodèse :**

Depuis une dizaine d'année, la BMP a été utilisée au travers d'une éponge de collagène compris dans une cage métallique (Infuse, Medtronic) ou d'un mastic de collagène (OP-1, Stryker) pour améliorer la cicatrisation lors de l'arthrodèse et les fractures non jointives. Alors que les résultats initiaux étaient prometteurs, de nombreux effets indésirables (ostéolyse, ossification hétérotopique) ont été rapportés du fait d'une concentration trop forte de BMP et d'une mauvaise diffusion[25]. De plus, l'efficacité clinique de la BMP est controversée dans le traitement des factures du tibia[26] De manière intéressante, il a été montré que le phosphate de calcium dans l'arthrodèse peut donner des résultats équivalents à une greffe autologue. Aussi l'ajout d'extrait de moelle osseuse à un matériau biocéramique n'apporte pas d'avantage à la cicatrisation pour les défauts osseux bénins, la mise en place du matériau biocéramique suffit.

- **Défaut osseux** :

Les défauts osseux segmentaires sont les plus communément trouvés dans le tibia et résultent en une amputation si le défaut ne peut être restauré ou maintenu. Le traitement indiqué aujourd'hui est la greffe autologue, la technique de la membrane induite (technique de Masquelet) ou la distraction osseuse. L'utilisation de BMP-2 combiné à une allogreffe a montré une efficacité aussi importante que la greffe autologue, dans le cadre de défaut osseux cortical du tibia[27]. Les dernières études cliniques utilisent des cellules souches implantées dans un matériau support et une variation de la technique de Masquelet en utilisant une membrane angiogénique et ostéogénique[28]. A ce jour, le développement d'une construction mécaniquement robuste et vascularisée pouvant être utilisée en orthopédie reste à être cliniquement translaté.

---

[25] Chrastil et al., « Complications associated with the use of the recombinant human bone morphogenetic proteins for posterior interbody fusions of the lumbar spine ».
[26] Aro et al., « Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. »
[27] Jones et al., « Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects : a randomized, controlled trial ».
[28] Ren et al., « Fabrication, vascularization and osteogenic properties of a novel synthetic biomimetic induced membrane for the treatment of large bone defects ».

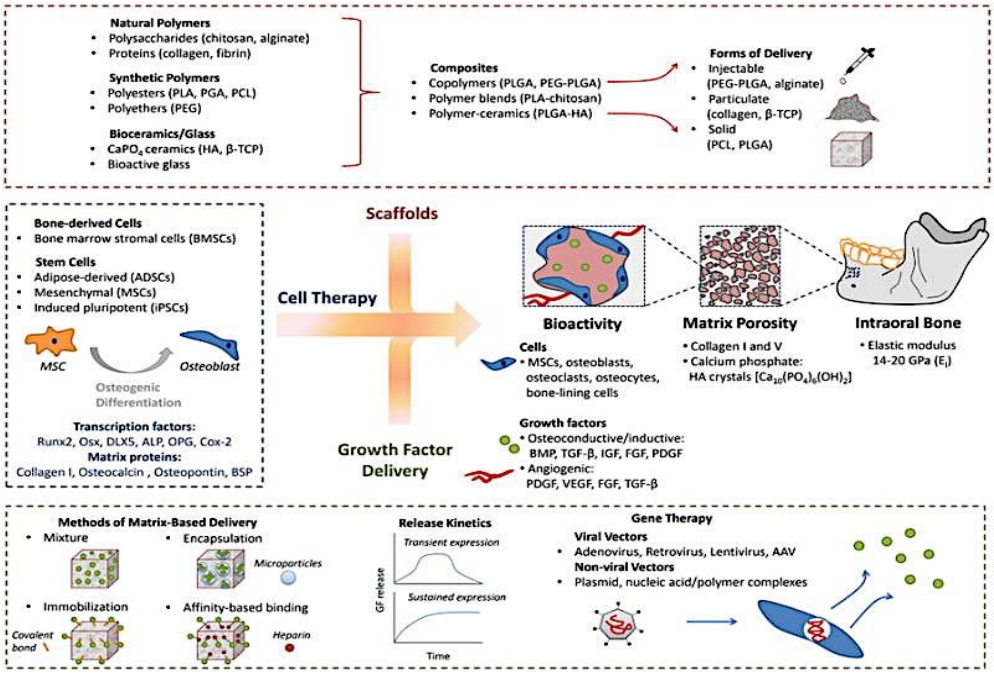
2.5.1.2 Chirurgie orale :

- **Préservation/augmentation de l'os alvéolaire :**

Des études ont analysé positivement la sécurité d'une thérapie cellulaire dans le cadre d'une augmentation osseuse alvéolaire. Une équipe a étudié l'association de PRP, de cellules mononucléaires issues de la moelle osseuse et un matériau support[29]. Les greffes ont eu un taux de succès de 94,7 % avec un volume osseux assez important pour la pose d'un implant. Les échecs de greffes ont été causés par des infections et un manque d'intégration du greffon dans l'os corticale du receveur. La formation osseuse montre la présence d'ostéoblastes au travers des trabécules osseuses et une perte osseuse marginale après 4 ans de suivi. Une autre étude clinique a analysé le comportement histomorphologique d'une alvéole après extraction d'une dent antérieure maxillaire avec ou sans injection de cellules de moelle osseuse[30]. Les résultats cliniques montrent que l'ajout de cellules de la moelle osseuse réduit la perte osseuse due à l'extraction dentaire. Néanmoins, 6 mois après l'injection, le volume osseux entre les cas témoins et les cas injectés était le même. Une étude plus récente randomisée et contrôlée de faisabilité, a comparé l'utilisation de cellules de moelle osseuse à l'utilisation d'une membrane gélatineuse pour la préservation alvéolaire. Les résultats ont montré que les cas utilisant la membrane ont eu besoin beaucoup plus fréquemment d'une seconde greffe (six fois plus de d'exposition implantaire). De plus, l'os régénéré dans les cas d'injection de cellules de moelle osseuse avait une meilleure densité et un meilleur taux de vascularisation que ceux utilisant la membrane.

[29] Cerruti et al., « Allogenous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors : clinical case reports ».
[30] Pelegrine et al., « Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft ».

Figure 13 : Schéma des possibles applications de l'IT osseuse en chirurgie dentaire



Source: Pilipchuk et al., « Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity », 2015

- **Élévation du plancher sinusien** :

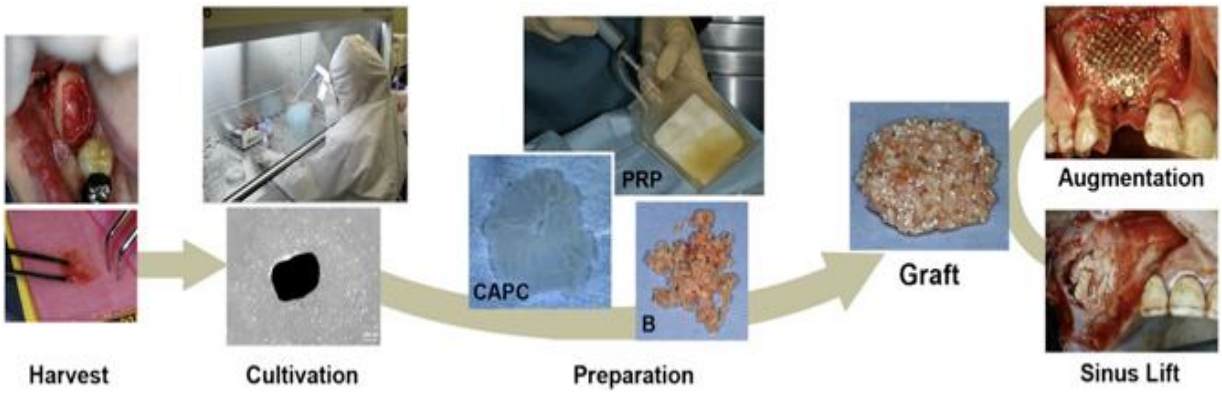
L'élévation du plancher sinusien est souvent un impératif pour la pose d'un implant maxillaire. L'utilisation d'une thérapie cellulaire en complément à un matériau de comblement ou une greffe conventionnelle pourrait améliorer la formation osseuse et accélérer la régénération. Lors d'une étude histomorphométrique, Gonshor et coll. ont comparé la formation osseuse dans une élévation de plancher sinusien en utilisant soit une allogreffe contenant des CSM autologues soit une allogreffe conventionnelle. Les résultats ont montré qu'en cas d'ajout de CSM, on aboutissait à 32,5 % d'os vital et 4,9 % de matériau de la greffe résiduel, avec une période de cicatrisation de 3,7 mois. Dans le cas des greffes conventionnelles, on note 18,3 % d'os vital et 25,8 % de matériau résiduel[31]. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Rickert et coll.

Enfin une étude menée par Nagata et coll., a utilisé les cellules du périoste amplifiées riches en cellules ostéogéniques (CAPC) et du PRP dans une matrice d'os autologue comparativement à une

[31] Gonshor et al., « Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation procedure. »

greffe autologue simple chez l'Homme. L'étude montre que l'ajout de CAPC et de PRP active l'enzyme ALP (25 % contre 7 %) et les ostéoclastes (5,6 % contre 0,4 %). Par ailleurs, le volume d'os régénéré était le même entre les deux techniques. Les auteurs ont conclu que l'ajout de cellules du périoste permettait de promouvoir la néoformation d'os et sa résorption par le recrutement de cellules immuno-positives pour ALP et TRAP. Les résultats des scanners montrent que l'ajout de CAPC conduit à la résorption des particules d'os cortical greffé. Enfin, ces résultats suggèrent l'hypothèse que l'os régénéré avec les CAPC acquière une capacité de remodelage à des stades primaires de l'augmentation osseuse alvéolaire[32]. Cette thérapie cellulaire aurait donc pour effet d'améliorer la qualité de l'os post-greffe. Cet effet peut être exercé par des mécanismes biologiques variés (Figure 30).

Figure 14 : Procédure de greffe autogène avec des cellules du périoste et du PRP.



Source :Nagata et al., « A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells : coordinated activation of bone formation and resorption », 2012

De manière générale, les cellules souches implantées dans une allogreffe ou une xénogreffe sont capables d'induire un volume suffisant d'os pour permettre la pose d'un implant dentaire. Avec ses limitations, le haut pourcentage d'os vital lors de la thérapie cellulaire doit encourager les cliniciens à implanter plus tôt après une greffe osseuse. Par ailleurs, la puissance de preuve de ces études reste limitée et d'autres études standardisées contrôlées randomisées avec des scénarios plus complexes doivent être réalisées.

L'utilisation de l'IT en Médecine Régénératrice du squelette est un domaine d'intenses recherches. L'efficacité clinique des stratégies actuelles montre des résultats ambigus avec un

[32] Nagata et al., « A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells : coordinated activation of bone formation and resorption ».

consensus limité sur le type de cellule, leur nombre, leur combinaison, les facteurs de croissance, leur dosage, leur mode de délivrance et le matériau support adéquat. Aussi les procédures cliniques induisent une inflammation non négligeable pouvant altérer et inhiber l'action des cellules souches. Par ailleurs, une injection retardée après une inflammation aigue du site a généré des résultats intéressants en cardiologie[33] et en neurologie[34]. Les bases de l'IT osseuse sont donc construites, des innovations concernant l'isolation des cellules souches, leur amplification et la délivrance d'une construction issue de l'IT permettront dans les années à venir d'utiliser cliniquement cette stratégie, tant en chirurgie orthopédique qu'en chirurgie orale.

[33] Orlic et al., « Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium ».
[34] Cameron et al., « Delayed post-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells is neurorestorative of striatal medium-spiny projection neurons and improves motor function after neonatal rat hypoxia-ischemia ».

3. Le corail

3.1. Caractéristiques biologiques :

3.1.1 Origine :

Chacun connaît le corail soit pour en avoir approché soit pour en avoir vu. Il existe plus de 2500 espèces différentes de corail. Certains squelettes de coraux présentent une similitude architecturale très intéressante avec l'os. Le squelette du corail du type cnidaire est un biomatériau important du fait de son architecture, de la distribution de ses pores et sa haute bioactivité avec les cellules osseuses. Peu d'espèces de corail ont des propriétés physiques et architecturales correspondantes à celles de l'os. En revanche, les espèces *Porites, Goniopora, Acropora, Lobophylia* sont très similaires à l'os. Le corail est un animal et le polype va édifier son exosquelette constitué d'une substance calcaire : l'aragonite ou le carbonate de calcium ($CaCO_3$). La forme des récifs dépend du genre et de l'espèce corallienne mais également des contraintes mécaniques qu'ils subissent (marée, courants, transformation du sol sous-marin).

Le polype corallien construit son squelette le jour et se nourrit la nuit. Le mécanisme de construction est proche de l'ostéogenèse. La couche tissulaire la plus externe du polype est composée de calicoblastes sécrétrices d'une substance fondamentale qui se calcifie et sert de trame au squelette corallien, à l'image des ostéoblastes qui sécrètent le collagène pour servir de trame à l'os des mammifères. Cette substance fondamentale va modifier les propriétés physico-chimiques des cellules ectodermiques permettant ainsi l'absorption d'ions carbonates et calciques présents dans l'eau de mer. La composition de cette eau de mer est proche par ses principaux constituants de celle du sérum sanguin où l'os puise le phosphate et calcium. Certains squelettes de coraux présentent des analogies architecturales remarquables avec le tissu osseux. L'architecture corallienne permet la pénétration osseuse car : (i) elle est poreuse (ii) la porosité est ouverte (iii) la taille des pores favorise l'envahissement par des éléments cellulaires et l'établissement d'une vascularisation.

Les coraux massifs sont principalement utilisés en médecine pour leur haute porosité (50-90 %), leurs pores de tailles importantes et le volume important disponible à travers le monde. Une autre propriété du corail est sa capacité à se résorber *in situ* de manière synchronisée à la régénération osseuse. Bien que le corail soit composé de carbonate de calcium au lieu de phosphate de calcium, il a une structure et des propriétés mécaniques similaires à l'os humain et leur cristallinité est pratiquement identique. Les coraux peuvent être convertis en phosphate de calcium par traitement

hydrothermique, pour mimer la composition de l'os humain et améliorer l'ostéoconduction. Les coraux et les phosphates de calcium biocéramiques non coralliens sont hautement versatiles et cliniquement sans danger. Ils sont capables de délivrer des gènes ou des facteurs bioactifs, en plus de leur capacité à remplacer l'os. Par exemple, les ions relargués par ces matériaux interagissent avec le métabolisme de l'os natif. De plus, ces coraux peuvent recruter les cellules ostéogéniques et les ostéoclastes au sein de leur squelette, aidant à maintenir une structure et une organisation osseuse homéostatique. Bien qu'il existe des méthodes de fabrication synthétique de l'hydroxyapatite, ce dernier diffère de l'hydroxyapatite du corail en composition, en morphologie des cristaux, en taille forme et propriétés physico chimique. On identifie principalement trois types différents de corail étudiés pour l'IT osseuse :

- Acropora : taille des pores 412 µm, porosité de 60 % ,
- Goniopora : taille des pores 314 µm, porosité de 75 % ,
- Porites : taille des pores de 150 µm, porosité de 65 %.

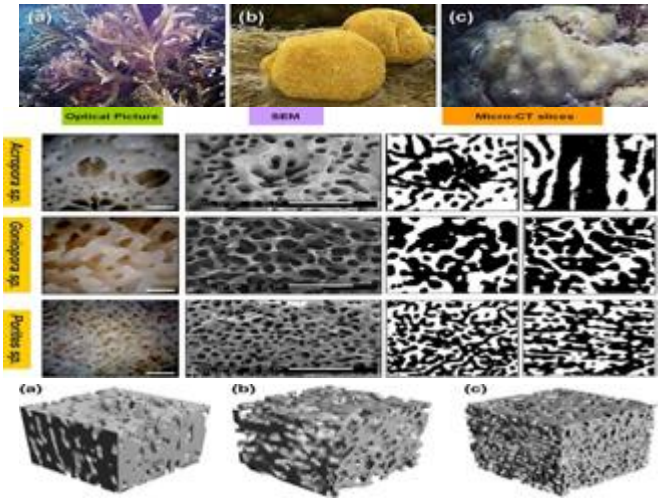
Figure 15 : (a) Acropora (b) Goniopora (c) Porites.

(A) Image en milieu naturel. (B) Image 2D au microscope optique, microscope électronique et au micro-CT (échelle de la barre : 1mm). (C) Représentation 3D des différentes espèces à partir des coupes de micro CT (cube de hauteur de 2580 microns).

A

B

C



Source: Yang et al, « A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals based on the criteria for bone-tissue engineering scaffolds », 2009

Le processus de bio minéralisation des coraux scléractiniaires a été partiellement décrit : les protéines organiques contrôlent le processus de cristallisation et la matrice organique organise et contrôle la minéralisation et la densification terminale. Les processus biologiques sont contrôlés par

des gènes qui induisent la formation du squelette et chaque espèce possède des gènes différents codant pour des formes de cristaux de carbonate de calcium différentes. Premièrement, les protéines organiques agissent comme des centres de nucléation, puis elles se combinent avec des nano cristaux, les reliant selon un premier arrangement ordonné. Les matières organiques continuent à enrober les cristaux et à guider la croissance et la structuration des cristaux de plus en plus grands, s'étendant en de longues fibres. En dessous de ce processus, se trouve un ensemble de gènes globaux qui interviennent dans la biominéralisation selon un mécanisme récemment élucidé chez les larves de coraux flottantes[35]. La matrice organique et les gènes qui codent la fabrication et l'assemblage doivent être transcrits avec précision et déterminés pour bien comprendre comment (les mécanismes) et pourquoi (l'évolution et l'adaptation) les coraux sont conçus et configurés de la façon dont nous les observons. Ces données sont requises pour la revitalisation des coraux par biomimétisme et bioinspiration. La compréhension actuelle des éléments de ce mécanisme et comment ils s'organisent permet la création de coraux par biomimétisme. Par exemple, les modèles serrés de cristallisation des vésicules disposées par des cellules calicoblastiques peuvent être émulées dans des milieux spécialement préparés contenant des vésicules artificielles auto-organisatrices, c'est un processus qui ressemble à la formation osseuse.

3.1.2 Processus de résorption et néoformation :

Les études de Guillemin et coll montrent que le processus de remodelage osseux diffère entre une lésion osseuse non implantée avec un biomatériau corallien et un site implanté. Le processus de régénération d'une lésion osseuse (tibia de chien) sans comblement montre une réparation à partir des berges endostées de la lésion osseuse ainsi que du périoste selon un modèle membraneux. Alors que pour le squelette corallien on observe :

- Une invasion des pores par les éléments cellulaires extravasés de la moelle,
- Une résorption ostéoclastique du squelette corallien concomitante à une apposition ostéoblastique,
- Un remodelage osseux,

L'apparition d'ostéoclastes à l'interface os-corail est observée dès le début du processus de réparation. Ils restent présents sur les coupes histologiques jusqu'à la résorption complète de l'implant corallien (huit semaines)[36]. En ce qui concerne les remplacements, l'évolution des sites sans comblement aboutit majoritairement à une pseudo-arthrose. La régénération des sites implantés avec

[35] Mass et al., « Temporal and spatial expression patterns of biomineralization proteins during early development in the stony coral Pocillopora damicornis ».
[36] Guillemin et al., « The use of coral as a bone graft substitute ».

un fragment de squelette corallien se fait selon le même processus que les comblements mais sur une période plus longue : colonisation du biomatériau par les éléments extravasés de la moelle osseuse, vascularisation précoce puis résorption graduelle et remplacement progressif de celui-ci par de l'os spongieux. Plus tard, ce tissu osseux spongieux se résorbe au niveau médullaire et évolue en os compact au niveau cortical. L'apparition d'os spongieux est constatée dès la 6ème semaine et à un an. Il persiste encore quelques rares îlots de squelette corallien. Ainsi il a été démontré que le corail implanté se résorbe progressivement pour laisser place à un néo-tissu osseux. Le mécanisme sous-jacent à ce phénomène semble être sous la dépendance de l'action des ostéoclastes que l'on trouve constamment en bordure des fragments de coraux implantés. Cette action a été rapportée à l'activité de l'anhydrase carbonique qu'ils contiennent[37] car l'intervention de l'anhydrase carbonique dans la destruction de substrats carbonatés a déjà été démontrée. En effet, des études chez l'animal ont montré que l'injection d'inhibiteurs spécifiques (acétazolamide) de l'anhydrase carbonique a eu pour résultat un ralentissement significatif de la résorption du corail implanté, comparativement au cas non traité avec cet inhibiteur. Ce ralentissement était associé à une nécrose osseuse en bordure de l'implant aboutissant dans tous les cas à une pseudo-arthrose. L'anhydrase carbonique jouerait au sein de l'ostéoclaste le rôle de pompe à proton augmentant le pH extra-cellulaire et favorisant la dissolution des minéraux.

3.1.3 Biocompatibilité et étude *in vitro* :

La biocompatibilité du corail chez différentes espèces a été évaluée par différent auteurs. Il a été observé de manière constante qu'à part une inflammation transitoire initiale, le corail ne montre aucun signe d'intolérance sur le court, moyen et long terme. Aucune des réactions suivantes n'a été reporté : inflammation aiguë ou chronique, réaction infectieuse avec des neutrophiles, réaction de rejet avec prolifération de cellules rondes, encapsulation fibreuse. Le rejet immun des implants coralliens n'a été retrouvé dans aucun tissu examiné. D'autres études ont montré que le corail ne cause pas de calcification anarchique des tissue mou et que des implants placés sous le périoste sont constamment résorbés et remplacés par le l'os autogène

L'entière majorité des études *in vitro* ont analysé la biocompatibilité entre le corail et les ostéoprogéniteurs. Ce matériau de support doit permettre l'attachement, la prolifération, la différenciation des CSM et des ostéoblastes[38]. Les études disponibles montrent que le corail n'est pas

[37] Gay et Mueller, « Carbonic anhydrase and osteoclasts : localization by labeled inhibitor autoradiography ».
[38] Tran et al., « Culture and differentiation of osteoblasts on coral scaffold from human bone marrow mesenchymal stem cells ».

cytotoxique et qu'il permet la croissance cellulaire[39]. Quand des cellules sont placées sur les granules du corail, ces cellules montrent une bonne capacité d'attachement, d'étalement et de prolifération. A la suite d'une induction ostéogénique, une activité de la phosphatase alcaline et la présence de matrice minérale ont été constatées dans le matériau corallien. L'activité de l'alcaline phosphatase, le taux de calcium et le nombre de cellules étaient significativement supérieurs dans les ostéoblastes implantés dans du corail que dans d'autres matériaux céramiques. L'analyse de l'expression génétique des ostéoblastes implantés dans un corail de type porite a montré une augmentation de l'expression de RUNX 2, ostéopontine, l'alcaline phosphatase et l'ostéocalcine. Les auteurs ont conclu que le corail est un matériau favorable pour l'implantation de cellules ostéogéniques[40].

Enfin une étude comparant l'implantation de cellules ostéogéniques dans une greffe de corail vs une greffe d'os humain conclu que la différenciation ostéogénique des CSM est supérieure dans une greffe de corail comparé à une greffe d'os. L'expression augmentée de l'ostéonectine étant un facteur important et différenciant.

Différents auteurs ont essayé d'étendre les propriétés du corail en y ajoutant des molécules ostéoinductrices. Des particules de corail sont capables d'absorber et de diffuser du TGF-β 1 *in vitro*[41]. Une autre étude montre qu'un matériau composite chitosan/corail a été combiné avec un plasmide codant pour la protéine PDGF-β. La prolifération des cellules inséminées était augmentée. Enfin il a été montré que la combinaison de PRP et de CSM dans un matériau poreux de corail avait un effet ostéogénique supérieur que l'utilisation du corail seul. L'analyse microscopique et histologique d'ensemencement de CSM dans un matériau de corail a révélé que les CSMS arrivaient à confluence et couvraient la surface du matériau sans atteindre les couches profondes. Une étude arrive à passer outre cette limitation en utilisant une matrice de fibrine pour avec une distribution uniforme des CSM dans le matériau de corail. De plus, il a été rapporté que les cellules souches utilisées dans le corail se différenciaient sans ajout de facteur de différenciation. Par ailleurs, la taille des pores est un facteur qui affecte la prolifération et la différenciation des cellules ensemencées. C'est dans cette logique qu'une étude a montré que les CSM humaines se différenciaient et proliféraient plus vite dans un corail partiellement transformé en HA avec des pores de 200 microns comparativement à ce même matériau avec des pores de 500 μm. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les cellules arrivent à confluence plus rapidement dans un matériau à petits pores permettant ainsi une différenciation précoce.

---

[39] Shamsuria et al., « In vitro cytotoxicity evaluation of biomaterials on human osteoblast cells CRL-1543, hydroxyapatite, natural coral and polyhydroxybutarate. »
[40] Lean et al., « Gene expression analysis of osteoblasts seeded in coral scaffold ».
[41] Demers et al., « Effect of experimental parameters on the in vitro release kinetics of transforming growth factor beta1 from coral particles. »

3.2. Caractéristiques physico- chimiques et mécaniques :

3.2.1 Composition chimique :

Tableau 1 : Composition du squelette corallien

Carbonate de calcium	97-99 %
Magnésium	0.05–0.2 %
Sodium	0.4–0.5 %
Acide aminés	0,07 %
	Acide asp : 155 ppm
	Sérine : 55 ppm
	Proline : 125 ppm
	Alanine : 95 ppm
	Leucine : 70 ppm
	Thréonine : 25 ppm
	Acide Glu : 110ppm
	Glycine : 110 ppm
	Valine : 35 ppm
	Isoleucine : 40 ppm
	Tyrosine : 40 ppm
	Arginine : 40 ppm
Potassium	0,02 %-0,03 %
Strontium	trace
Fluorine	trace
Phosphate	trace

Source : Auteur d'après Guilleminet al, « The use of coral as a bone graft substitute », 1987

Du point de vue chimique on distingue :

- Une phase organique incorporée dans le squelette au cours de la cristallisation. Elle représente 1 à 15 % de la composition totale, sa transformation ultérieure dépend des groupes considérés.
- Une phase minérale essentiellement constituée par du carbonate de calcium sous forme de cristaux d'aragonite ($CaCO_3$).

- D'autres éléments (oligo-éléments, acides aminés, pigment, ions métalliques). Ces éléments proviennent soit de leur incorporation lors de l'édification du squelette soit de la transformation de la phase organique.

Ces différences de composition chimique dépendent du genre et de l'espèce mais aussi de la composition du milieu ambiant.

3.2.2 Caractéristique mécanique :

Les propriétés mécaniques d'un matériau dans le cadre de la régénération osseuse sont un élément critique dans le succès d'une greffe. Les propriétés mécaniques d'un matériau support ont été étudiées dans le cadre d'un implant supportant une charge dans un défaut osseux. La résistance, la tension, l'élasticité et la compression sont des facteurs testés. Les paramètres rhéologiques reliés à ces facteurs sont :

- Module d'élasticité ou module de Young (relation entre la contrainte de traction et le début de la déformation)
- Module de flexion (déformation d'un matériau résultant à une courbure)
- Résistance à la traction (contrainte maximum pouvant être appliquée à un matériau avant rupture)
- Tension maximum (lié à la ductilité du matériau)

D'autre paramètres découlent de ces facteurs : module tangent, module de résilience, module de Weibull, travail à la fracture et intensité de contrainte

La contrainte entrainant une rupture dans le matériau corallien est comprise entre 20 et 400 MPa indiquant que le corail a des propriétés équivalentes voir supérieures à celles de l'os spongieux. Dans le cadre d'un comblement d'un défaut osseux, le corail sous forme de granule est plus utilisé que le corail sous forme de bloc, ce qui affecte ses propriétés mécaniques. Aussi, le corail naturel étant résorbable, cela n'affecte pas sa résistance. D'un point de vue mécanique, l'implantation d'un corail naturel dans un site soumis à de forte contrainte mécanique requière (i) l'utilisation des éléments d'ostéosynthèse (ii) la connaissance du comportement à la résorption. C'est pour ces raisons que le corail est un matériau limité mécaniquement.

Tableau 2 : Propriétés physiques et mécaniques de différents coraux

	Porites	*Acropora*	*Lobophyllia*		*Goniopora*	Trabecular bone	Cortical bone
			Interior	*Exterior*			
Macroporosity (µm)	154 ± 53	412 ± 212	500–1000		314 ± 116	NA	NA
	[89–435]*	[124–941]			[145–651]		
Microporosity (µm)	5–15	5–20	NA		NA	NA	NA
Global Porosity (%	47–64	12–60	45–60		23–80	50–80	5–30

Source : Guillemin et al, « Coral physical properties », 1998

3.3. Application en Ingénierie Tissulaire clinique et préclinique :

Comme vu précédemment (Chapitre 2), puisque l'IT répond à une triade de trois éléments : matériau support, cellules, signalétique et que le corail présente une anatomie et des propriétés assez proches de l'os, c'est donc dans cette logique que des équipes de recherche ont utilisé le corail dans des applications d'IT osseuse préclinique et des applications cliniques plus traditionnelles.

3.3.1. Étude préclinique :

Les études réalisées sur des animaux peuvent être divisées en trois catégories : implantation ectopique du corail, implantation dans un site osseux défectueux, implantation d'une construction de corail ou composite de corail incluant des facteurs de croissances.

Les implants ectopiques semblent biocompatibles mais ils n'induisent pas une réponse ostéogénique. Néanmoins l'ajout de signaux ostéogéniques dans ces implants permet une formation osseuse. Les caractéristiques structurales et le niveau de formation de l'os sont liés à la résorption du carbonate du calcium corallien. Une telle approche peut résulter en la construction de forme prédéterminée avec une structure assez similaire à l'os natif. Cette stratégie peut être utilisée pour produire un greffon pré-vascularisé. De plus, des études comparatives ont montré que la néo formation d'un tissu osseux était plus importante avec les coraux types porites et acropora que dans les greffes utilisant du β–TCP ou de l'os issus de banque[42]. Par ailleurs, certains auteurs ont analysé le mécanisme de formation de l'os dans les implants de corail. Un corail partiellement converti, composé de 7 % d'HA et de carbonate de calcium a été chargé en BMP-2 avec du vérapamil (inhibiteur de canaux calcico-sodiques lents) ou du zolédronate, un biphosphonate inhibiteur d'ostéoclastes puis placé dans un site intramusculaire du babouin. Les résultats montrent que l'inhibition des mouvements calciques

[42] Viateau et al., « Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model ».

et de la fonction des ostéoclastes inhibe fortement la formation d'os. Il a été noté que BMP-2 était sous exprimé mais que le gène Noggin était surexprimé, ce qui indique que la formation osseuse via le corail macro poreux passe par la voie des BMP. Une autre étude montre que le chargement d'un corail en hTGF-β3 placé dans les mêmes conditions que l'étude précédente, surexprimé BMP-2. Ces résultats sont en accord avec l'observation de la formation d'os à la périphérie du greffon, pouvant être due au recrutement d'ostéoprogéniteur.

L'implantation de corail dans un défaut osseux a été étudiée par de nombreux auteurs. Les défauts osseux chez le chien traité avec un corail composé de carbonate de calcium (99 %, Biocoral®) ou de l'os autologue ne montrent aucune différence de cicatrisation entre les deux techniques. En revanche, le corail sous forme d'hydroxyapatite a montré une apposition d'os autour du greffon mais très peu de résorption. L'HA issu du corail (Interpore 500®) a montré une formation osseuse limité à 66,5 % un an après implantation du greffon. Une autre étude montre que le corail transformé en HA (Pro Osteon 200®) est encapsulé dans un tissu fibreux et que l'addition de cellules autologues de la moelle osseuse n'améliore pas les résultats.

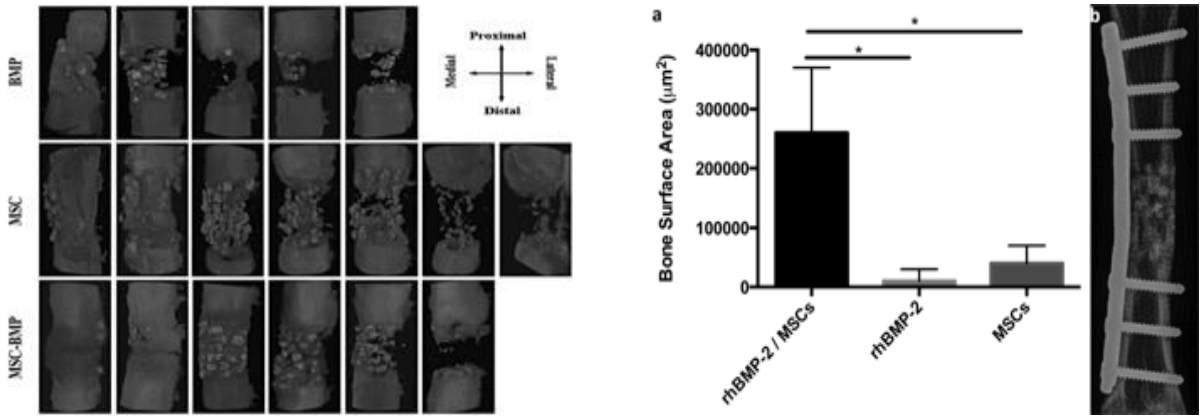
Les matériaux à base de corail ont été utilisés en IT osseuse par de nombreuses équipes de recherche. La combinaison de corail, de BMP et d'ostéoprogéniteurs a montré une cicatrisation osseuse comparable à une greffe autologue. Les cellules utilisées dans construction à base de corail son majoritairement des cellules issues de la moelle osseuse. Néanmoins, des cellules souches issues d'adipocytes ostéoinduits ont montré des résultats favorables. Des cellules transfectées avec le gène codant pour VEGF utilisé avec du corail a montré une amélioration de la vascularisation et de la résorption du greffon accompagné d'une plus haute réponse ostéogénique. En plus de BMP, d'autres molécules ont été testées. Une étude comparative entre IGF-1 et BMP-2 montre que IGF-1 induit une meilleure régénération dans le cadre d'un chargement de cette molécule dans un greffon corallien. Le PRP ajouté au corail a aussi montré une meilleure cicatrisation pour le traitement d'un défaut de tibia proximal. Des données contrastantes avec les précédentes, montre qu'un matériau composé de Biocoral®, BMP et collagène IV induit un nombre important de cals comparé au corail utilisé seul, sans différence de propriétés mécaniques de l'os régénéré. Néanmoins, cette étude souligne une augmentation statistiquement significative d'anticorps anti-BMP, suggérant une réaction immunogénique.

Le corail est donc un matériau adéquat pour la délivrance contrôlée de facteurs de croissance, tout particulièrement pour rhBMP-2, qui est le facteur de croissance le plus ostéoinducteur. Les résultats *in vivo* utilisant une telle construction ont montré une augmentation de la formation osseuse dans le cadre de petits défauts osseux. Dans les larges défauts, une telle approche s'est montrée inconstante et parfois inefficace, surtout dans les sites ou la vascularisation est réduite. Par ailleurs,

dans certains cas, l'ajout de rhBMP-2 à forte dose a été associée à une formation osseuse anormale (Gao et coll., 1997 , Sciadini & Johnson, 2000). Pour ces raisons, l'utilisation de rhBMP-2 fait aujourd'hui débat au sein des cliniciens et de la communauté scientifique. D'autres facteurs de croissance tels que TGF-β, VEGF et PDGF combinés avec le corail ont montré des effets indésirables moindres mais une efficacité limitée. On a montré de manière intéressante que le corail produisait des facteurs de croissance de façon similaire à l'Homme (notamment BMP-2 et TGF-β)[43]. C'est pour ces raisons que la culture de corail pourrait permettre de produire en grande quantité des coraux riches en BMP-2. Si un tel processus fonctionne, le corail pourrait être largement utilisé du fait de ses propriétés ostéoinductives en IT osseuse.

Figure 16 : (A) Implantation de corail + faible dose de BMP2 chez le rat (B) Implantation de corail +rhBMP-2 chez le lapin. Les expériences de Petite et al ont montré que le dosage de BMP-2 permettait de réduire considérablement les effets secondaires.

A B



Source : (A) « Low-dose BMP-2 and MSC dual delivery onto coral scaffold for critical-size bone defect regeneration in sheep », 2017 , (B) Burastero et al, « The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats », 2010

3.3.2. Étude clinique :

[43] Green et al., « A therapeutic potential for marine skeletal proteins in bone regeneration ».

La première implantation de corail naturel chez l'animal fut dans les années 1970. Son utilisation en clinique a débuté en 1979. Depuis, différentes études cliniques utilisant du corail naturel ou partiellement transformé en HA ont été conduites en chirurgie où la greffe osseuse est couramment pratiquée. La plupart des études cliniques utilisent le corail sous forme de granule ou de block et plus rarement sous forme de pâte. De plus, les coraux ont été utilisés seuls, en combinaison avec une greffe autologue, avec du PRP ou une matrice d'os déminéralisée en orthopédie, cranio-facial, maxillo-faciale et neuro chirurgie.

3.3.2.1 Chirurgie orthopédique :

Le corail/HA a été utilisé pour le comblement de vacuité osseuse dans les fractures du tibia. Les résultats de cette pratique ont montré des résultats similaires à celles effectuées avec de l'os autologue. Ce matériau a aussi été utilisé dans le cadre de résection tumoral. Le corail/HA est un excellent matériau de comblement montrant la formation d'une cale à un mois et une complète cicatrisation à quatre mois. Le matériau se dégrade ensuite dans les 18-24 mois suivant son implantation. La limite de cette approche est une difficulté à contenir le matériau mais cette fuite n'engendre aucun effet indésirable sur 6 ans de suivi.

3.4.2.2 Chirurgie de la colonne vertébrale :

L'arthrodèse est une procédure indiquée dans l'utilisation de greffe osseuse. Différentes études cliniques ont utilisé le corail/HA seul ou avec du PRP pour la fusion de vertèbre. Alors que 95,5 % des patients expriment une satisfaction des résultats de l'opération, seul 70,5 % ont pu retrouver leur niveau d'activité physique. De plus, le corail ne permet qu'un taux bas de fusion (45 %). Ce n'est donc pas un matériau indiqué lorsque le but de post-opératoire n'est pas la fusion.

3.3.2.3 Chirurgie cranio facial :

Le corail porite a été utilisé en clinique pour la chirurgie crânio-facial avec succès. Une des études les plus importante dans ce domaine a utilisé le corail comme substitut osseux chez 183 patients où 80 des cas ont impliqué une réparation crânio-faciale. Une résorption partielle (40 %) a été observée chez tous les sujets à 8-10 mois et une résorption complète a été observée un an après. De manière intéressante il a été reporté que le taux d'infection post opératoire était inférieur (4 %) dans les cas utilisant le corail, comparativement aux cas avec de l'os autologue (20 %). Le corail est donc considéré comme un substitut osseux adéquat en chirurgie crânio faciale.

3.3.2.4 Chirurgie maxillo-faciale :

Un volume adéquat d'os est impératif dans cadre de l'ostéointégration d'un implant osseux. La résorption osseuse et le remodelage de l'os alvéolaire après une extraction sont des écueils à la pose d'un implant. Le corail a été utilisé avec succès dans des procédures d'augmentation osseuse pour améliorer la stabilité primaire de l'implant durant son ostéointégration en chirurgie maxillo-faciale et chirurgie dentaire. L'élévation sinusienne (sinus lift) utilisant du corail combiné au PRP a montré des résultats satisfaisants[44]. L'utilisation de corail et PRP dans cette procédure a montré une formation osseuse similaire à l'os autologue. Bien que tous les matériaux greffés utilisés aient montré de bons résultats, les meilleurs résultats ont été observés lors de l'utilisation d'os autologue. Une autre étude avec 5 ans de suivi compare le taux d'échec implantaire lors de la pose d'un implant dans un site ayant subi une élévation sinusienne par apport de différent matériau incluant un gel corallien. Cette étude montre que l'incidence de la perte d'un implant est similaire indépendamment du matériau utilisé. Le gel de corail montrant le plus haut taux de résorption (40 %) parmi les biomatériaux testés[45].

3.3.2.5. Parodontie :

L'équipe du laboratoire de Paris VII avec le Pr OUHAYOUN fut pionnière dans l'utilisation du corail en parodontie. Dans un premier temps, des blocs de squelette de différents types de coraux ont été mis en place :

- Pour le comblement de lésions infra-osseuses,
- Pour le remodelage d'un segment de crête édenté par greffe enfouie,
- Dans l'alvéole d'extraction recouvert d'une greffe gingivale,
- Dans une cavité kystique.

Toutes ces tentatives de comblement se sont soldées par des échecs : exfoliation du fragment de squelette corallien. Du corail sous forme de granule avec une granulométrie comprise entre 300 et 450 μm a été utilisé. La stérilisation de leur biomatériau s'est faite par rayonnement γ mais les premiers coraux implantés furent stérilisés par la chaleur : il faut savoir que ce mode de stérilisation est à manier avec précaution car le corail peut subir une transformation de l'aragonite en calcite (HA), le rendant ainsi non résorbable. Plusieurs patients ont été traités grâce à ces granules : comblement de lésions apicales après résection, comblement de lésion osseuse parodontale, maintien de la hauteur de la crête alvéolaire après extraction. Les observations cliniques et radiographiques

---

[44] Papa et al., « Outcome of 47 consecutive sinus lift operations using aragonitic calcium carbonate associated with autologous platelet-rich plasma : clinical, histologic, and histomorphometrical evaluations ».
[45] Velich et al., « Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. »

montrent que le corail est toléré de manière excellente par les tissus parodontaux avec une absence d'inflammation gingivale, de nécrose gingivale et une conservation sur l'arcade de toutes les dents traitées avec ce biomatériau parfois dans des situations jugées comme étant extrêmes (cohorte de 50 patient avec 3 ans de suivi)

3.3.2.6 Conclusion :

En conclusion, durant les 40 dernières années, les études cliniques publiées utilisant le corail ne sont pas très nombreuses et le nombre de patient est limité. Les résultats des études confirment ceux obtenu *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Une résorption du corail suivie d'une néoformation osseuse a été démontrée. Aussi, l'utilisation du corail ou du corail/HA, est limité à de petits défauts osseux, mais n'est pas indiqué dans le cadre d'une grande reconstruction osseuse ou d'arthrodèse. L'addition de facteurs de croissances et/ou de cellules souches est nécessaire pour permettre au corail d'être ostéoinducteur et élargir les applications de ce matériau.

3.3.3 Production du corail :

Originellement, le corail est pêché puis traité en laboratoire. Le traitement consiste en une stérilisation du matériau et à sa déprotéinisation. La stérilisation peut se faire par traitement thermique (risque de transformation du carbonate de calcium en HA) ou par rayon γ.

Le corail est une espèce protégée et sa population s'est réduite de 19 % depuis 1990 du fait de la hausse de température océanique. La majorité des coraux pêchés ne sont plus vivants et cette pratique n'est pas associée à un impact négatif écologique. En revanche, le manque de reproductibilité et la possible contamination par des polluants des coraux restent un problème majeur. Des équipes se sont alors concentrées sur l'élevage du corail, l'aquaculture du corail ou la bio émulation de corail par des procédés chimiques ou la bio-impression.

On a estimé qu'il faudrait 10^5 kg de corail par an pour subvenir aux besoins cliniques. Les techniques d'aquaculture aujourd'hui permettraient de produire 10^{11} kg/an couvrant une surface de $0{,}2 \times 10^8$ ha (Khalessi et coll., 2008). Alors que l'intérêt de la culture de corail réside dans la possibilité de contrôler et de reproduire la calcification et la biomasse produite, le défi principal de la culture de corail est le taux de croissance de cet animal. En effet, dans des conditions reproduisant celles de la mer, le corail ne grandit que de 25mm par an (jusqu'à 20 cm pour les coraux en branche). En optimisant la lumière et les conditions de culture, il est possible de multiplier ce taux par 4. La culture de coraux permet donc de produire des éléments avec des tailles de pores, des formes et une

architecture prédéterminées. Aussi, il est possible de modifier la culture de certaines espèces pour obtenir des coraux non vus dans la nature mais particulièrement adaptés à l'IT osseuse.

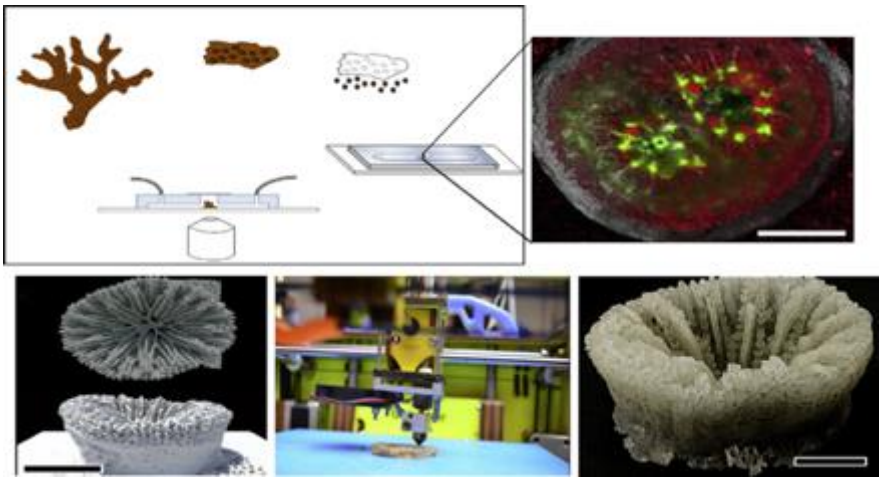
La biominéralisation du corail peut être réalisée par synthèse chimique suivant un processus proche de la biominéralisation naturelle. Les techniques utilisant les émulsions et les systèmes colloïde recréer une matrice naturelle de cristallisation. Tout comme dans la biominéralisation, les cristaux s'agrègent et s'organisent pour former des structures complexes. Des systèmes ont donc été créés avec des patrons en 3D pour la précipitation et la cristallisation et minéralisation de biominéraux calcique et émuler la synthèse de corail, de la nacre, de l'émail ou de l'os. L'émulation de la biominéralisation corallienne dans un système chimique artificiel est possible avec un milieu aqueux concentré en vésicules.

Aujourd'hui, les constructions synthétiques mimant les caractéristiques du corail ne sont pas exploitables d'un point de vue clinique car les phénomènes de minéralisations sont complexes et non complètement élucidés. Une dernière stratégie utilisant la microfluidique permet de répliquer un corail à partir d'un polype. De manière alternative, il est possible d'imprimer un corail en 3D. Avec les bio-imprimantes, la construction du corail est automatisée et précise[46,]

Figure 17 : (A) Reproduction d'un corail par microfluidique, B) Reproduction d'un corail par bio-impression

A

B



Source: Shapiro et al, «A coral-on-a-chip microfluidic platform enabling live-imaging microscopy of reef-building corals », 2017

[46] Brás et al., « A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase ».

3.4 Directions futures :

Par sa porosité, sa capacité à permettre l'attachement la prolifération et la différenciation de cellules souches, sa résorbabilité et son ostéoconductivité, le corail est un matériau support idéal en IT osseuse. Ses caractéristiques permettent l'ajout de cellules ostéogéniques par l'architecture du corail peuvent avoir accès aux nutriments externes et relarguer leurs déchets. Ce matériau peut aussi être utilisé comme un vecteur de facteurs de croissance en diffusant de manière contrôlée ces derniers. Plusieurs études *in vivo* utilisant du corail combiné à des cellules ou des facteurs de croissance ont montré de bons résultats mais inférieurs à l'autogreffe. C'est ainsi que les dernières études combinent l'association de cellules souches et de facteurs de croissance. Une des constructions les plus prometteuses est celle utilisant des CSM et du rhBMP-2 car elle permet une formation osseuse aussi importante que l'autogreffe. D'autres stratégies se concentrent sur la délivrance de polynucléotides codant pour des facteurs de croissances (ARN, ADN) alternativement aux facteurs de croissance. Cette approche permet une délivrance continue de facteurs de croissance, car les polynucléotides atteignent la cellule cible et induit une production locale de facteurs de croissance sans dépasser les doses physiologiques qui entrainent un échec de la greffe ou des effets secondaires. Enfin, des innovations dans la culture de long terme de corail doit permettre un contrôle et une reproductibilité des lots et une alternative durable à la pêche sur un temps plus long.

Ainsi aucune étude clinique n'a été effectuée utilisant le corail associé aux cellules souches et aux facteurs de croissance. Il reste donc un champ important à explorer pour permettre aux patients d'obtenir une greffe de qualité pouvant remplacer *ad integrum* un défaut osseux en évitant les greffes autologues.

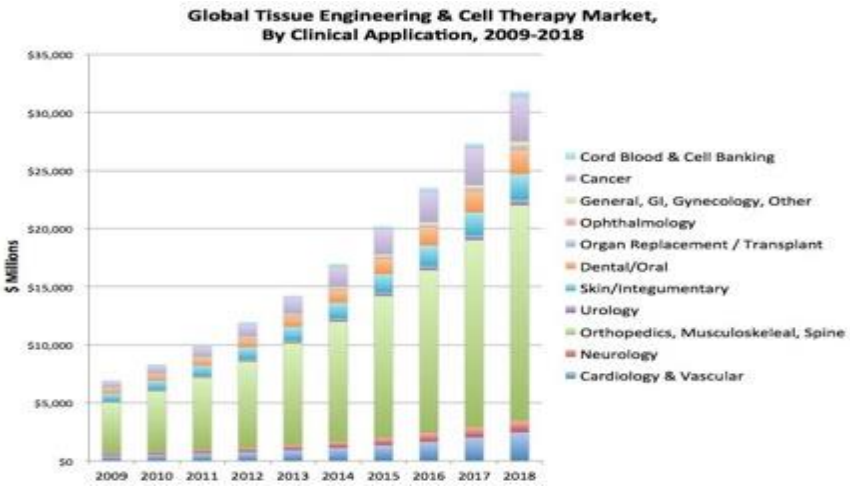
4. Aspect réglementaire et commercial

Nous développerons dans ce chapitre l'aspect réglementaire particulier de l'IT osseuse et son marché. Outre les preuves scientifiques et l'efficacité clinique d'une thérapie, la composante réglementaire et commerciale doit être connue et maitrisée pour que le patient puisse bénéficier un jour d'une telle thérapie. En effet, les patients peuvent bénéficier des dernières technologies de laboratoire s'il existe une traction du marché et si le coût de R&D et de mise sur le marché pour l'entreprise développant le concept permet un retour sur investissement. Malheureusement, sans cette approche pluridisciplinaire, une innovation majeure peut ne jamais être translatée en clinique.

4.1. Marché :

On estime que la majorité des produits d'ingénierie tissulaire sont utilisés pour le traitement des blessures et des malformations congénitales, alors que les produits d'ingénierie tissulaire utilisés pour le traitement des maladies sont moins courants. Le marché adressable mondial de l'Ingénierie Tissulaire et de la thérapie cellulaire est estimé à environ 12 milliards d'euros en 2014 et devrait atteindre 28 milliards d'euros en 2018. Le marché prédominant est celui de l'orthopédie. Associé au marché dentaire, cela représente plus de la moitié du marché adressable globale de l'IT (17 milliards d'euros). Ce secteur est en forte progression, avec un taux de croissance annuel de 17 %.

Figure 18 : Volume du marché adressable mondial de l'IT et de la thérapie cellulaire



Source : Bryan & Garnier Ltd, « Cell therapy : the new backbone for orthopaedic » 2014

L'industrie de l'IT a commencé à se développer dans les années 1990 et a atteint plus de 70 entreprises à la fin de 2001. En 2001, un certain nombre de produits issus de l'IT avaient atteint le marché, notamment, Organogenesis® Apligraf® et Carticel® de chez Genzyme. Les attentes étaient élevées à la fois dans les milieux scientifiques et dans les médias. Peu de temps après le tournant du siècle, l'industrie est entrée dans une période moins enthousiaste. L'activité du secteur privé a baissé de 20 % et la valeur en capital des entreprises d'IT cotées en bourse a chutée de 90 %. Cette situation est due en partie à la mauvaise conjoncture économique (Bulle Technologique de 2001), à la baisse de l'intérêt des investisseurs et aux résultats cliniques décevants. De manière surprenante, l'industrie a rebondi en 2008 et était de nouveau sur la bonne voie pour répondre aux attentes des années 90. Les valeurs en capital des entreprises publiques d'IT ont été multipliées par 10 par rapport à 2003 et les produits qui entraient en essai clinique, obtenaient l'approbation de la FDA/EMA et dans certains cas, devenaient rentables. Aujourd'hui, cette industrie continue à croître et n'a jamais été aussi prometteuse.

L'orthopédie domine le domaine, en représentant 49 % du marché et 19 entreprises. Le domaine des greffes osseuses et des substituts est parmi les marchés les plus prometteurs de l'industrie orthopédique et dentaire. En 2013, les revenus de marché mondial, composés traditionnellement d'allogreffe, d'allogreffe usinés, de facteur de croissance, de matrices osseuses déminéralisées, synthétiques ou xénogéniques, et de matrices cellulaires, ont été estimés à 1,6 milliards d'euros sur les 10 marchés dominants en valeur. Malgré la surveillance de la FDA du BMP et du segment des matrices cellulaires, les ventes sur le marché des substituts osseux devraient augmenter régulièrement tout au long de la période de prévision, atteignant 2,5 milliards d'euros avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 4,5 %.

Les procédures de greffes osseuses sont en train de passer progressivement de greffes osseuses autologues et allogéniques à des substituts de greffes osseuses synthétiques. L'émergence de nouveaux matériaux biologiques ou synthétiques pour faciliter la régénération des os endommagés ou malades peut réduire de plus en plus l'utilisation de l'autogreffe dans les chirurgies. La motivation à incorporer les propriétés favorables de différents matériaux dans un produit de greffe osseuse efficace a conduit à la manipulation et au développement de diverses nouvelles greffes composites. Aujourd'hui, certaines grandes entreprises orthopédiques ont consacré une part importante de leur budget de R & D à ces produits à base de cellules souches. L'incorporation de CSMs adultes dans l'os d'allogreffe donne naissance à une matrice exploitant la triade de guérison ostéoconductivité, ostéoinduction, et ostéogenèse. Cette tendance est présente aussi dans l'industrie dentaire à tel point que la plupart des sociétés développe des produits avec des indications en chirurgie dentaire et en chirurgie orthopédique. Dans un marché inondé de produits biologiques avec des données

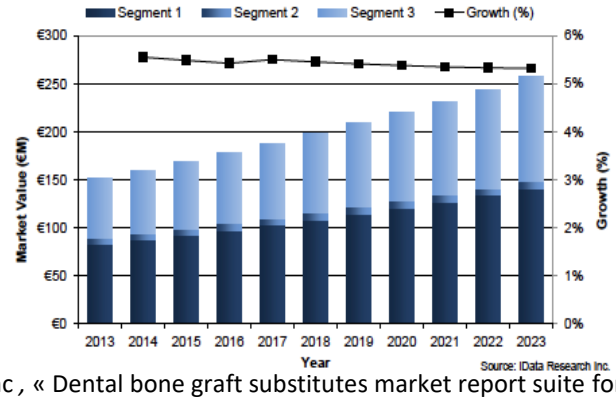
scientifiques soutenant l'efficacité, la disponibilité de données cliniques humaines pour démontrer l'efficacité d'un produit reste la clé du succès.

- Le marché de la greffe osseuse en chirurgie dentaire :

Malgré le fait que les procédures d'autogreffe deviennent moins populaires, elles représentent toujours une part considérable des procédures de greffes osseuses dentaires en Europe. En conséquence, le marché des biomatériaux dentaires est nettement sous-développé en Europe par rapport au marché américain. Une préférence dominante pour les matériaux de xénogreffe caractérise le marché du substitut osseux dentaire en Europe et très peu de régions ont montré une évolution vers les matériaux d'allogreffes. Il est attendu à ce que les règlements et les protocoles rigoureux mis en place par la directive européenne des tissus et les cellules continuent à limiter le marché des allogreffes et l'ensemble du marché des biomatériaux dentaires à l'avenir.

Ces dernières années, le marché européen des biomatériaux dentaires a démontré des améliorations croissantes dues à plusieurs facteurs et tendances. Le facteur majeur de la croissance a été le développement du marché des implants dentaires, en particulier dans les régions où la pénétration est relativement faible, comme au Royaume-Uni. Aussi les initiatives de sensibilisation et de marketing ont conduit le nombre de procédures d'implants qui utilisent les substituts de greffe osseuse dentaire à atteindre plus de 40 % dans certaines régions, avec un taux d'utilisation de membranes barrières croissant proportionnellement. Enfin, un nombre croissant d'entreprises implantaires ont récemment pénétré l'espace des biomatériaux afin de fournir une solution complète à leurs clients. Parmi les autres développements notables sur le marché des biomatériaux dentaires figurent les partenariats entre les sociétés d'implants et les entreprises de biomatériaux, les matériaux d'allogreffes et l'introduction de produits innovants utilisant des nouveaux matériaux. Au total, le marché des substituts dentaires osseux et autres biomatériaux a été évalué à 300,7 millions de d'euros en 2016. Ce chiffre devrait augmenter à un TCAC de 8,4 % pour atteindre environ 620,6 millions de d'euros d'ici 2023.

Figure 19 : Évolution du marché européen des substituts osseux dentaires



Source : iData Research Inc , « Dental bone graft substitutes market report suite for Europe | 2017-2023 | MedSuite | dental bone graft substitutes, dental growth factor, dental barrier membranes », 2017

Par ailleurs malgré une littérature scientifique riche en IT osseuse en chirurgie dentaire, le marché de l'IT dans ce domaine est contracté voire inexistant. Au vu des caractéristiques macroéconomiques de ce domaine, tout laisse à penser que la première mise sur le marché d'un produit complet issu de l'IT osseuse sera dans le domaine orthopédique. Ce marché étant plus attrayant, le retour sur investissement permettra le développement et le financement d'une application en chirurgie dentaire.

4.2. Régulation des produits issus de l'IT :

La régulation des produits à visé thérapeutique réfère à une législation différenciant deux principales catégories : les médicaments et les Dispositifs Médicaux (DM). Ces deux catégories contiennent des produits dépourvus d'élément biologique. La plupart des substituts osseux utilisés en chirurgie orthopédique ou orale sont des DM de classe III. L'ingénierie tissulaire faisant intervenir la manipulation de cellules ou de virus entre dans une nouvelle réglementation.

Dans un guide de 2012 (texte en annexe) à l'attention des porteurs de projet l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) définit le cadre réglementaire des thérapies innovantes :

« Entré en vigueur le 30 décembre 2008, avec une période transitoire pour les produits déjà sur le marché, le règlement européen (CE) n°1394/2007 sur les médicaments de thérapie innovante a considérablement modifié l'environnement réglementaire applicable aux approches thérapeutiques qui font appel dans leurs mécanismes d'actions et activités aux gènes, tissus ou cellules.

Ce règlement, en confirmant le statut de médicament, spécialité pharmaceutique, aux produits de thérapie génique, de thérapie cellulaire, de l'ingénierie tissulaire et aux médicaments

combinés de thérapie innovante, est en fait une *lex specialis* qui introduit des dispositions spécifiques pour ces médicaments et qui complètent les dispositions générales, énoncées dans la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain ».

- **Les médicaments de thérapie innovante (MTI)** : « cette définition couvre les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI avec un dispositif médical) ».

La plupart des produits utilisés en IT osseuse, évoluent dans cette définition légale.

- **Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP)** : « ce sont des MTI fabriqués et utilisés au sein d'un unique état membre. »

- **Les préparations** : « ce sont des produits cellulaire ou tissulaire (allogéniques ou autologues) à finalité thérapeutique. » Les préparations ne sont pas considérées comme des médicaments et suivent une réglementation nationale. Certaines thérapies chirurgicales osseuses faisant appel à des manipulations cellulaires sont considérées comme telles.

Figure 20 : Classification des MTIs

PRODUIT	MANIPULATION / DESTINATION	DOMAINE d'APPLICATION	STATUT / REGLEMENTATION
Tissus/Cellules (Humain)	NON substantielle **ET** Même destination donneur/receveur	Restreinte Ou Large	Préparation cellulaire / tissu National
Tissus/Cellules Vecteurs de thérapie génique	OUI Substantielles **Ou** Cellules/tissus à usage non homologue à la fonction d'origine	Large	MTI Europe
Tissus/Cellules Vecteurs de thérapie génique	OUI Substantielles **Ou** Cellules/tissus à usage non homologue à la fonction d'origine	Restreinte Fabrication ponctuelle pour 1 patient déterminé Utilisation dans 1 seul état	MTI-PP National

Source : *Agence national de la sécurité du médicament et des produits de santé*, « Médicaments de thérapie innovante, Médicaments de thérapie innovante préparé ponctuellement et préparations : synthèse du cadre réglementaire applicable pour la fabrication, le développement et la mise sur le marché de ces produits », 2012

- **Les Médicaments « issus » de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire :**

« Sont considérés comme issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :

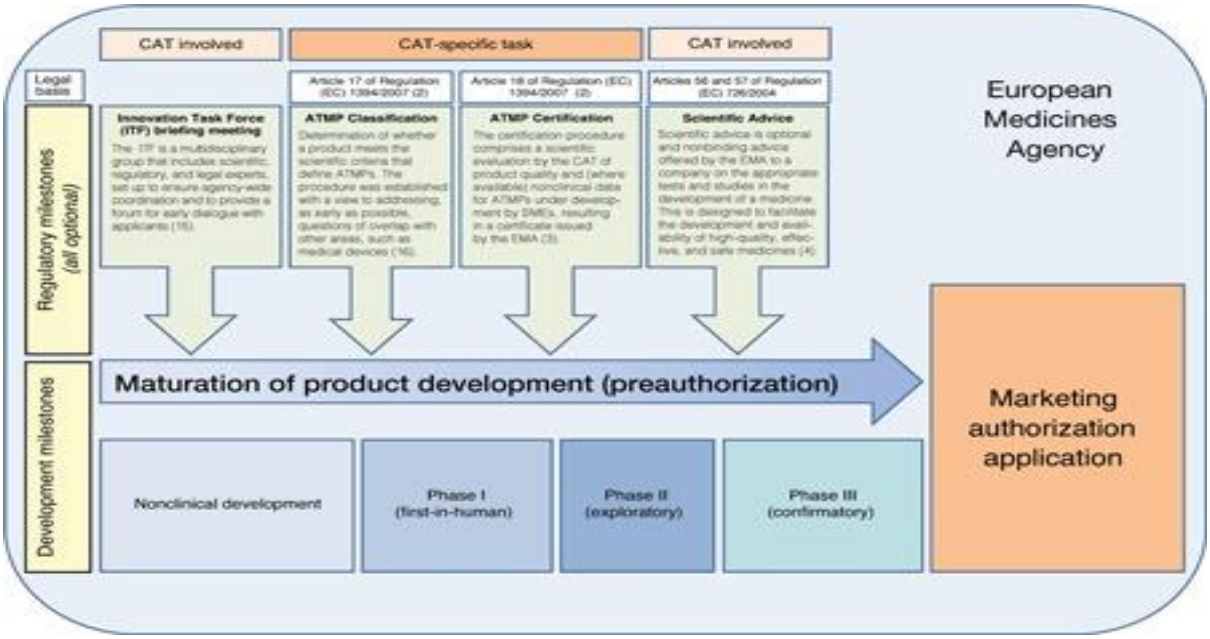
a) les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés.

b) les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur ».

- **Mise sur le marché d'un MTI** :

La mise sur le marché d'un MTI est définie dans le rapport de l'ANSM de 2012 comme suivant le même processus d'évaluation d'un médicament avec la particularité de faire intervenir un Committee for Advanced Therapies" (CAT) qui est un groupe de travail spécialisé dans les nouvelles technologies qui évalue tout particulmièrement la sécurité des MTI. Ce groupe de travail est donc en collaboration avec un comité des médicaments à usage humain (CHMP).

Figure 21 : Schéma des étapes réglementaire d'un MTI



Source : *EMA,* « Advanced therapy medicinal products (ATMPs) and ATMP Regulation *advanced therapy medicinal products (ATMPs) and ATMP regulation »* , 2018

L’objectif de cette nouvelle réglementation est d’assurer la sécurité de processus technique récent avec un fable recul clinique. La demande de mise sur le marché doit donc satisfaire des tests effectués par des organismes notifiés au sein de l’Union européenne.

Du fait d’un potentiel thérapeutique et économique important de nombreuses entreprises utilisent les dernières biotechnologies en date pour améliorer les greffes osseuses existantes (voir exemple en annexe). Néanmoins, il n’existe aujourd’hui aucune entreprise qui commercialise une construction complète d’IT osseuse comprenant des cellules, un matériau support et des signaux cellulaires.

Conclusion

En raison de son attractivité scientifique et commerciale, l'IT sera très certainement un domaine qui apportera de nombreuses avancées cliniques. En revanche, la réglementation particulière des MTI, pourra dans certains domaines d'application ralentir sa mise sur le marché. Deux sociétés sont pionnières dans la mise sur le marché de thérapies osseuses utilisant les cellules souches, alors que la majorité développe encore des matrices simples ou complexées avec des facteurs de croissance.

Nous nous étions posé la question de savoir si le corail pouvait être un matériau utilisé dans une construction d'IT osseuse. Nous avons montré que c'était un matériau possédant une biocompatibilité excellente, qu'il était possible de reproduire un microenvironnement favorable à la prolifération et la différenciation des cellules souches. Aussi, les études pré cliniques ont montré que son association avec des facteurs de croissance et des cellules souches donnait des résultats équivalents voir supérieurs à la greffe autologue.

A ce jour, le corail est un matériau qui possède l'un des meilleurs profils pour l'IT osseuse. C'est un matériau qui fut l'objet de controverse du fait de sa trop rapide résorption, mais cette dernière peut être contrôlée par l'ajout d'inhibiteur et/ou un frittage sélectif de la matrice.

Néanmoins un nombre d'études trop réduites doit tempérer cette conclusion. En effet le corail devra être étudié à une plus grande échelle pour confirmer les études réalisées. Sur le plan commercial, le corail péché présente le désavantage d'une scalabilité et d'une reproductibilité incertaine contrairement au matériau synthétique. L'aquaculture et l'impression 3D pourront compenser dans l'avenir ce désavantage. Jusqu'à présent le corail n'est développé par les entreprises que comme substitut osseux, et il n'existe aucun programme pour son utilisant en IT osseuse. Il pourrait donc profiter de la forte croissance de ce marché pour être utilisé chez les patients.

Bibliographie

Aro, H.T., S. Govender, A. D. Patel, P. Hernigou, A. Perera de Gregorio, G. I. Popescu, J. D. Golden, et al. « Recombinant human bone morphogenetic protein-2 : a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. » *The journal of bone and joint surgery. American volume* 93, nº 9 (2011): 801-8. https://doi.org/10.2106/JBJS.I.01763.

Aubin, J. E. « Bone stem cells ». *Journal of cellular biochemistry* 72, nº S30–31 (1998): 73-82. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31+<73::AID-JCB11>3.0.CO,2-L.

Badran, Z., M. Abdallah, J. Torres, et F. Tamimi. « Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges ». *Platelets* 29 (2017): 1-8. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1327656.

Brás, E.J.S., V. Chu, M.R. Aires-Barros, J.P. Conde, et P. Fernandes. « A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase ». *Journal of chemical technology and biotechnology* 92, nº 2 (2017): 334-41. https://doi.org/10.1002/jctb.5010.

Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper, et R. Recker. « Bone biology. II : formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. » *Instructional course lectures* 45 (1996): 387-99. https://doi.org/8727758.

Cameron, S.H., A.J Alwakeel, L. Goddard, C.E. Hobbs, E.K. Gowing, E.R. Barnett, S.E. Kohe, et al. « Delayed post-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells is neurorestorative of striatal medium-spiny projection neurons and improves motor function after neonatal rat hypoxia-ischemia ». *Molecular and cellular neuroscience* 68 (2015): 56-72. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.019.

Cerruti, H.F., I. Kerkis, A. Kerkis, N.H. Tatsui, A. Da Costa Neves, D.F. Bueno, et M.C.P. Da Silva. « Allogenous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors : clinical case reports ». *Artificial organs* 31, nº 4 (2007): 268-73. https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00374.x.

Cheng, K.H., T. Kuo, K. Kuo, et C. Hsiao. « Human adipose-derived stem cells : isolation, characterization and current application in regeneration medicine ». *Genomic medicine, biomarkers, and Health Sciences* 3, nº 2 (2011): 53-62. https://doi.org/10.1016/j.gmbhs.2011.08.003.

Chrastil, J, J.B. Low, P.G. Whang, et A.A. Patel. « Complications associated with the use of the recombinant human bone morphogenetic proteins for posterior interbody fusions of the lumbar spine ». *Spine* 38, nº 16 (2013). https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182982f8e.

Connolly, J.F., R. Guse, J. Tiedeman, et R. Dehne. « Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. » *Clinical orthopaedics and related research*, 1991, 259-70. https://doi.org/10.1097/00003086-199105000-00038.

Cui, Q., A.S. Dighe, et J.N. Irvine Jr. « Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering ». *Current pharmaceutical design* 19, nº 19 (2013): 3374-83. https://doi.org/10.2174/1381612811319190004.

Del Buono, A., R. Papalia, V. Denaro, G. Maccauro, et N. Maffulli. « Platelet rich plasma and tendinopathy : state of the art. » *International journal of immunopathology and pharmacology* 24, nº 1 Suppl 2 (2011): 79-83. https://doi.org/10.1177/03946320110241S215.

Demers, C.N., M. Tabrizian, A. Petit, R.C. Hamdy, et L. Yahia. « Effect of experimental parameters on the in vitro release kinetics of transforming growth factor beta1 from coral particles. » *Journal of biomedical materials research* 59, nº 3 (2002): 403-10.

Friedenstein, A.J. « Precursor cells of mechanocytes ». *International review of cytology* 47, nº C (1976): 327-59. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60092-3.

Gay, C.V., et W.J. Mueller. « Carbonic anhydrase and osteoclasts : localization by labeled inhibitor autoradiography ». *Science* 183, n° 4123 (1974): 432-34. https://doi.org/10.1126/science.183.4123.432.

Gonshor, A., B.S. McAllister, S.S Wallace, et H. Prasad. « Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation procedure. » *The international journal of oral & maxillofacial implants* 26, n° 1 (2011): 123-31.

Green, D.W., M.P. Padula, J. Santos, J. Chou, B. Milthorpe, et B. Ben-Nissan. « A therapeutic potential for marine skeletal proteins in bone regeneration ». *Marine drugs* 11, n° 4 (2013): 1203-20. https://doi.org/10.3390/md11041203.

Guillemin, G., J. L. Patat, J. Fournie, et M. Chetail. « The use of coral as a bone graft substitute ». *Journal of Biomedical materials research* 21, n° 5 (1987): 557-67. https://doi.org/10.1002/jbm.820210503.

Ikegame, M., O. Ishibashi, T. Yoshizawa, J. Shimomura, T. Komori, H. Ozawa, et H. Kawashima. « Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture ». *Journal of bone and mineral research* 16, n° 1 (2001): 24-32. https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.1.24.

Jimi, E., I. Nakamura, H. Amano, Y. Taguchi, T. Tsurukai, M. Tamura, N. Takahashi, et T. Suda. « Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. » *Endocrinology* 137, n° 8 (1996): 2187-90. https://doi.org/10.1210/endo.137.8.8754795.

Jones, A.L., R.W. Bucholz, M.J. Bosse, S.K. Mirza, T.R. Lyon, L. X. Webb, A. N. Pollak, et al. « Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects : a randomized, controlled trial ». *Journal of bone and joint surgery . Series A* 88, n° 7 (2006): 1431-41. https://doi.org/10.2106/JBJS.E.00381.

Jung, R.E., D.L. Cochran, O. Domken, R. Seibl, A.A. Jones, D. Buser, et C.H.F. Hammerle. « The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration ». *Clinical oral implants research* 18, n° 3 (2007): 319-25. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01342.x.

Kim, S., S. Kim, S. Lee, S. Eun Ahn, S. Gwak, J. Song, B. Kim, et al. « In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds ». *Biomaterials* 29, n° 8 (2008): 1043-53. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.005.

Knippenberg, M., M. N. Helder, B. Zandieh Doulabi, P. I.J.M. Wuisman, et J. Klein-Nulend. « Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells ». *Biochemical and biophysical research communications* 342, n° 3 (2006): 902-8. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.052.

Lean, H.F., A. H. Suzina, A. Azlina, et T. P. Kannan. « Gene expression analysis of osteoblasts seeded in coral scaffold ». *Journal of biomedical materials research - Part A* 87, n° 1 (2008): 215-21. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31765.

Lee, S.H., et H. Shin. « Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering ». *Advanced drug delivery reviews* 59, n° 4-5 (2007): 339-59. https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.016.

Lutz, R., S. Berger-Fink, P. Stockmann, F.W. Neukam, et K.A. Schlegel. « Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft -: a 5-year retrospective study ». *Clinical oral Implants research* 26, n° 6 (2015): 644-48. https://doi.org/10.1111/clr.12352.

Martin, T. J., et K. W. Ng. « Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity ». *Journal of cellular biochemistry* 56, n° 3 (1994): 357-66. https://doi.org/10.1002/jcb.240560312.

Mass, T., H.M. Putnam, J.L. Drake, E. Zelzion, R.D. Gates, D. Bhattacharya, et P.G. Falkowski. « Temporal and spatial expression patterns of biomineralization proteins during early

development in the stony coral Pocillopora damicornis ». *Proceedings of the royal society of London b : biological sciences* 283, nº 1829 (2016). https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0322.

Murphy, S.V., et A. Atala. « 3D bioprinting of tissues and organs ». *Nature biotechnology* 32, nº 8 (2014): 773-85. https://doi.org/10.1038/nbt.2958.

Nagata, M., H. Hoshina, M. Li, M. Arasawa, K. Uematsu, S.Ogawa, K.Yamada, et al. « A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells : coordinated activation of bone formation and resorption ». *Bone* 50, nº 5 (2012): 1123-29. https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.02.631.

Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, et D.M. Bodine. « Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium ». *Pediatric* 7 Suppl 3 (2003). http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1399-3046.7.s3.13.x/full%5Cnpapers3://publication/uuid/7F308577-BAB6-47E1-BA0A-377CA21020C6.

Papa, F., A. Cortese, R. Sagliocco, M. Farella, C. Banzi, M.C. Maltarello, C. Pellegrini, et al. « Outcome of 47 consecutive sinus lift operations using aragonitic calcium carbonate associated with autologous platelet-rich plasma : clinical, histologic, and histomorphometrical evaluations ». *Journal of craniofacial surgery* 20, nº 6 (2009): 2067-74. https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181be88ab.

Pelegrine, A.A., C.E.S Da Costa, M.E.P. Correa, et J.F.C. Marques. « Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft ». *Clinical oral implants research* 21, nº 5 (2010): 535-42. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01891.x.

Qin, A., T. S. Cheng, N. J. Pavlos, Z. Lin, K. R. Dai, et M. H. Zheng. « V-ATPases in osteoclasts : structure, function and potential inhibitors of bone resorption ». *International journal of biochemistry and cell biology*, 2012. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.014.

Ren, L., Y. Kang, C. Browne, J. Bishop, et Y. Yang. « Fabrication, vascularization and osteogenic properties of a novel synthetic biomimetic induced membrane for the treatment of large bone defects ». *Bone* 64 (2014): 173-82. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.04.011.

Rodan, G.A., et T.J. Martin. « Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption : a hypothesis ». *Calcified tissue international*, 1981. https://doi.org/10.1007/BF02409454.

Saygin, N.E., Y. Tokiyasu, W.V. Giannobile, et M.J. Somerman. « Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts ». *Journal of periodontology* 71, nº 10 (2000): 1591-1600. https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.10.1591.

Shamsuria, O., A. S. Fadilah, A. B. Asiah, M. R. Rodiah, A. H. Suzina, et A. R. Samsudin. « In vitro cytotoxicity evaluation of biomaterials on human osteoblast cells CRL-1543, hydroxyapatite, natural coral and polyhydroxybutarate. » *The medical journal of malaysia* 59 Suppl B (2004): 174-75.

Sodek, J, et M D McKee. « Molecular and cellular biology of alveolar bone. » *Periodontology* 24 (2000): 99-126. https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240106.x.

Tran, C.T., C. Gargiulo, H.D. Thao, H.M. Tuan, L. Filgueira, et D.M. Strong. « Culture and differentiation of osteoblasts on coral scaffold from human bone marrow mesenchymal stem cells ». *Cell and tissue banking* 12, nº 4 (2011): 247-61. https://doi.org/10.1007/s10561-010-9208-2.

Turner, C.H., M.R. Forwood, et M.W. Otter. « Mechanotransduction in bone : do bone cells act as sensors of fluid flow ? » *The FASEB journal* 8, nº 11 (1994): 875-78. https://doi.org/10.1016/8756-3282(91)90003-2.

Velich, N., Z. Németh, C. Tóth, et G. Szabó. « Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. » *The journal of craniofacial surgery* 15 (2004): 38-41. https://doi.org/10.1097/00001665-200401000-00013.

Viateau, V., M. Manassero, L. Sensébé, A. Langonné, D. Marchat, D. Logeart-Avramoglou, H. Petite, et al. « Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an

ectopic large animal model ». *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 10, n° 3 (2016): E177-87. https://doi.org/10.1002/term.1782.

Watanabe, H., T. Yanagisawa, et J. Sasaki. « Cytoskeletal architecture of rat calvarial osteoclasts : microfilaments, intermediate filaments, and nuclear matrix as demonstrated by detergent perfusion ». *The anatomical record* 243, n° 2 (1995): 165-74. https://doi.org/10.1002/ar.1092430203.

Yamaguchii, A., T. Suda, et T. Komori. « Regulation of osteoblast differentiation mediated by ». *Endocrine reviews* 21, (2000): 393-411. https://doi.org/10.1210/er.21.4.393.

Yang, S., K.F. Leong, Z. Du, et C.K. Chua. « The design of scaffolds for use in tissue engineering ». *Tissue engineering* 7, n° 6 (2001): 679-89. https://doi.org/10.1089/107632701753337645.

Table des figures

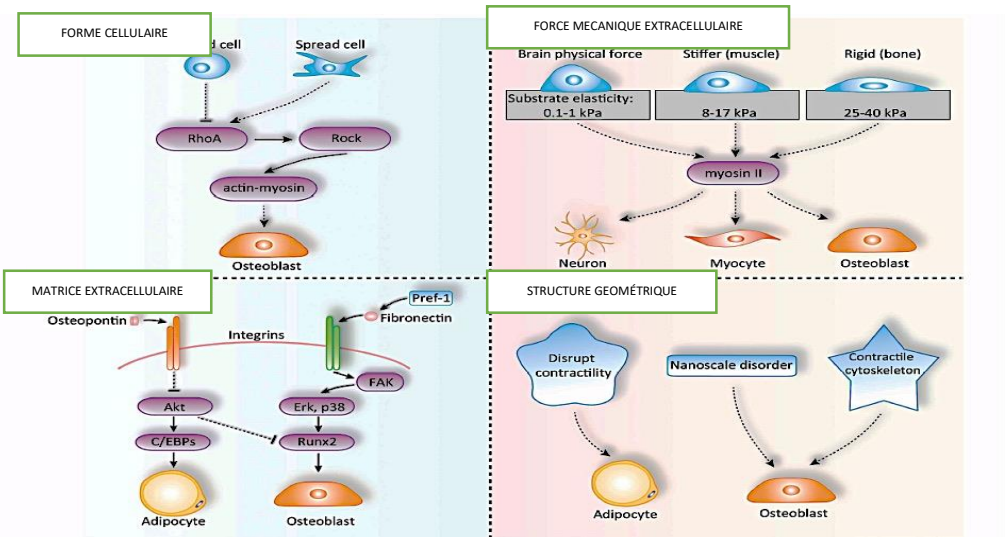
Figure 1 : Coordination cellulaire ostéoblastes/ostéoclastes 9
Figure 2: Relation cellulaire entre le périoste et la suture 10
Figure 3 : Ossification enchondrale 11
Figure 4 : Schéma de voies des différenciations cellulaires 12
Figure 5 : Plasticité des cellules souches mésenchymateuse 13
Figure 6 : Représentation de la différenciation et l'activation des ostéoclastes 17
Figure 7 : Schéma des voies de signalisation induisant la différenciation et l'activation des ostéoclastes 18
Figure 8 : Hypothèse de deux voies de régulation physiologique et pathologique des ostéoclastes .. 19
Figure 9 : Schéma d'un ostéoclaste activé 20
Figure 10 : Différenciation cellulaire dans le parodonte 22
Figure 11 : Triade de l'ingénierie tissulaire 24
Figure 12 : Schéma des propriétés idéales d'un matériau support en IT osseuse 26
Figure 13 : Schéma des possibles applications de l'IT osseuse en chirurgie dentaire 42
Figure 14 : Procédure de greffe autogène avec des cellules du périoste et du PRP. 43
Figure 15 : (a) Acropora (b) Goniopora (c) Porites 46
Figure 16 : (A) Implantation de corail + faible dose de BMP2 chez le rat (B) Implantation de corail +rhBMP-2 chez le lapin. Les expériences de Petite et al ont montré que le dosage de BMP-2 permettait de réduire considérablement les effets secondaires. 54
Figure 17 : (A) Reproduction d'un corail par microfluidique, B) Reproduction d'un corail par bio-impression 58
Figure 18 : Volume du marché adressable mondial de l'IT et de la thérapie cellulaire 60
Figure 19 : Évolution du marché européen des substituts osseux dentaires 63
Figure 20 : Classification des MTIs 64
Figure 21 : Schéma des étapes réglementaire d'un MTI 65

Table des tableaux

Tableau 1 : Composition du squelette corallien 50
Tableau 2 : Propriétés physiques et mécaniques de différents coraux 51

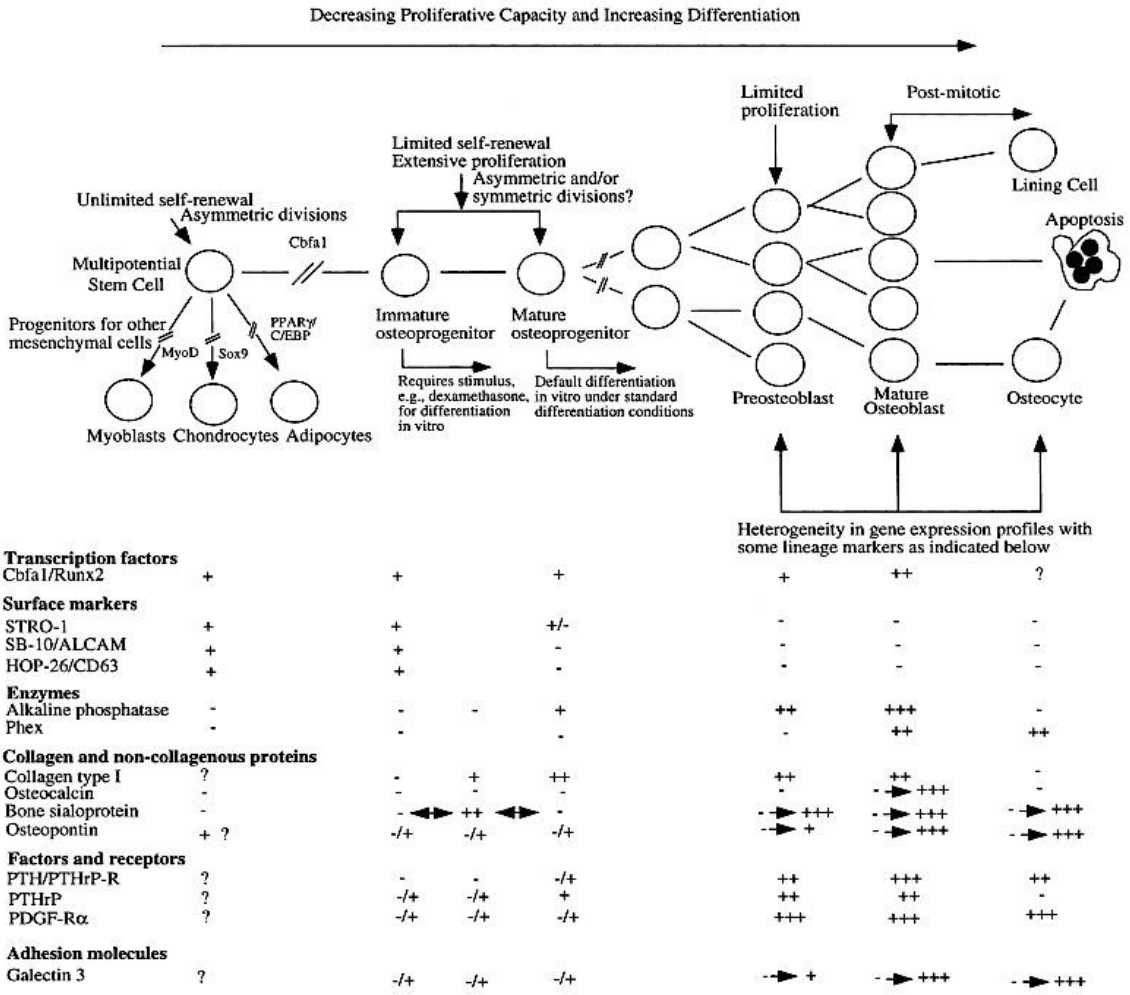
Annexes

Figure annexe 1 : Exemples de signaux externes induisant une différenciation



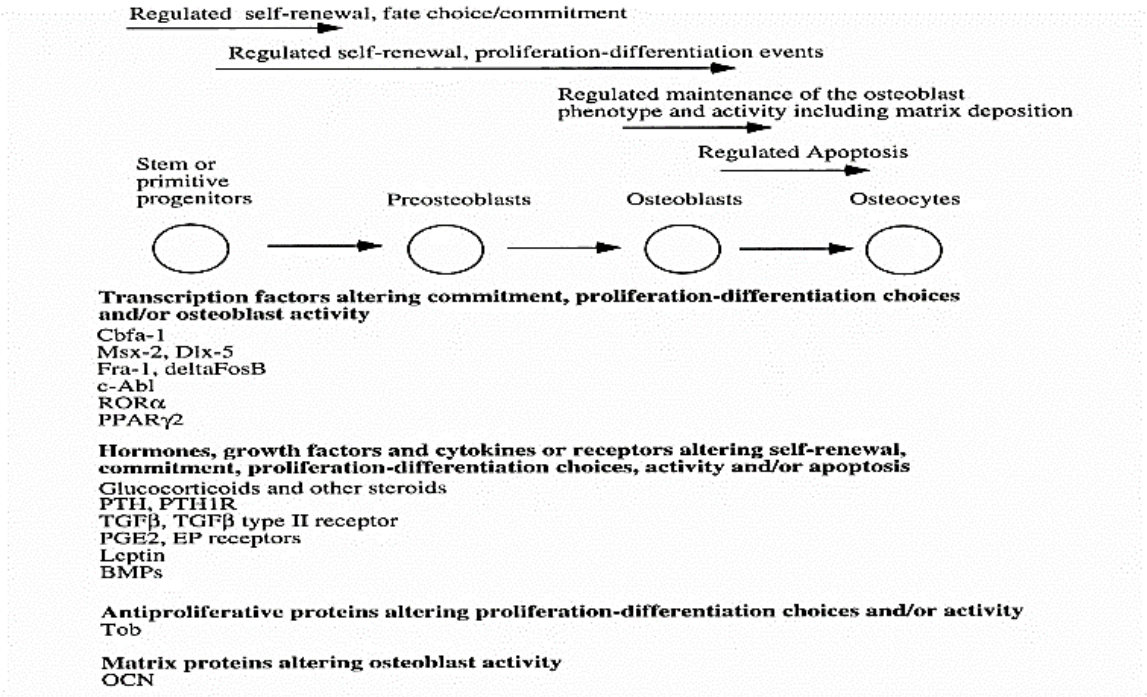
Source : QCHEN , « MSC plasticity » ,2016

figure annexe 2 : Étapes de différenciation des cellules souches en cellules osseuses et ses marqueurs



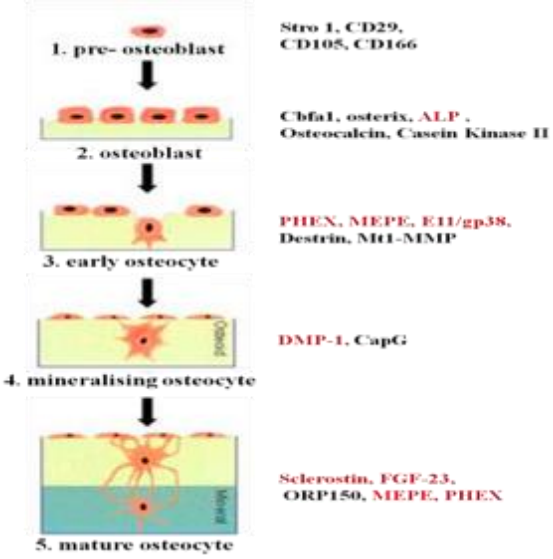
Source: Aubin et Triffitt, Mesenchymal stem cells and osteoblasts dfferentiation, 2002

Figure annexe 3 : Schéma de la régulation des cellules ostéogéniques



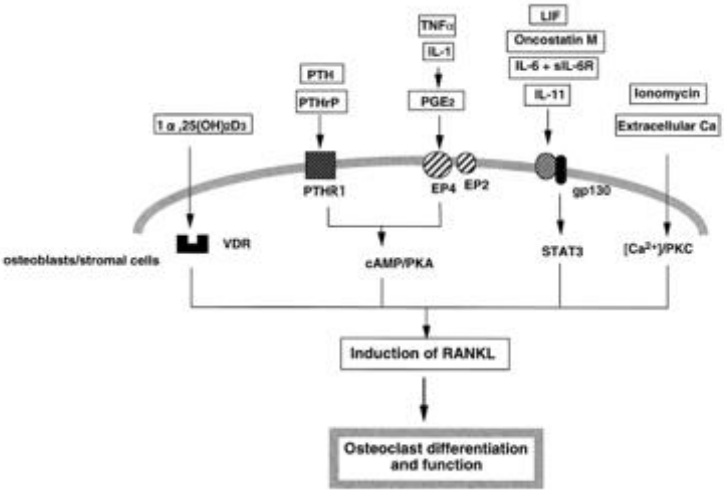
Source : Aubin et Triffitt, Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation,2002

Figure annexe 4 : Expression protéique au cours de la différenciation des ostéoblastes



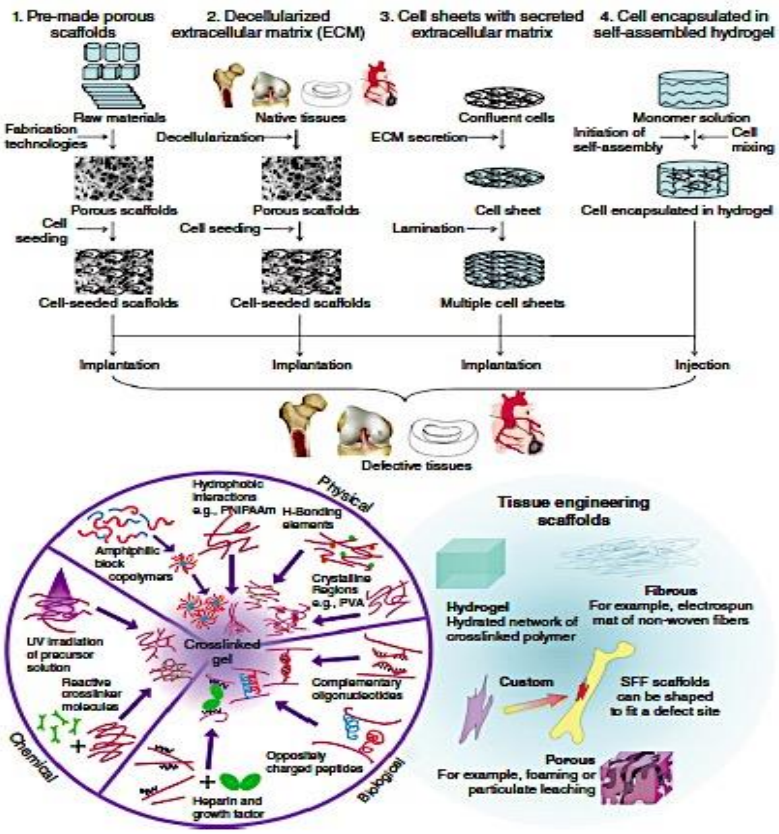
Source : Bonewald et al , Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis, 2010

Figure annexe 5 : Schéma des voies de signalisation de l'induction de RANKL chez les ostéoblastes



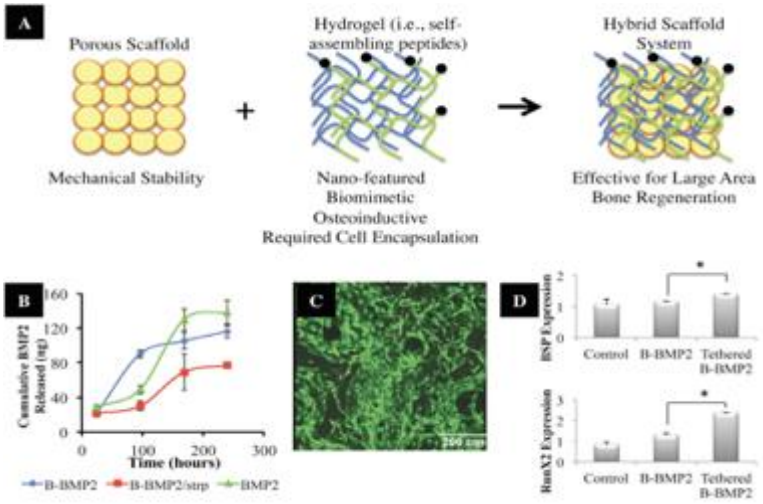
Source: Takashi et al , Osteoclast generation, ,2002

Figure annexe 6 : Illustration des différentes approches dans le choix du matériau en IT



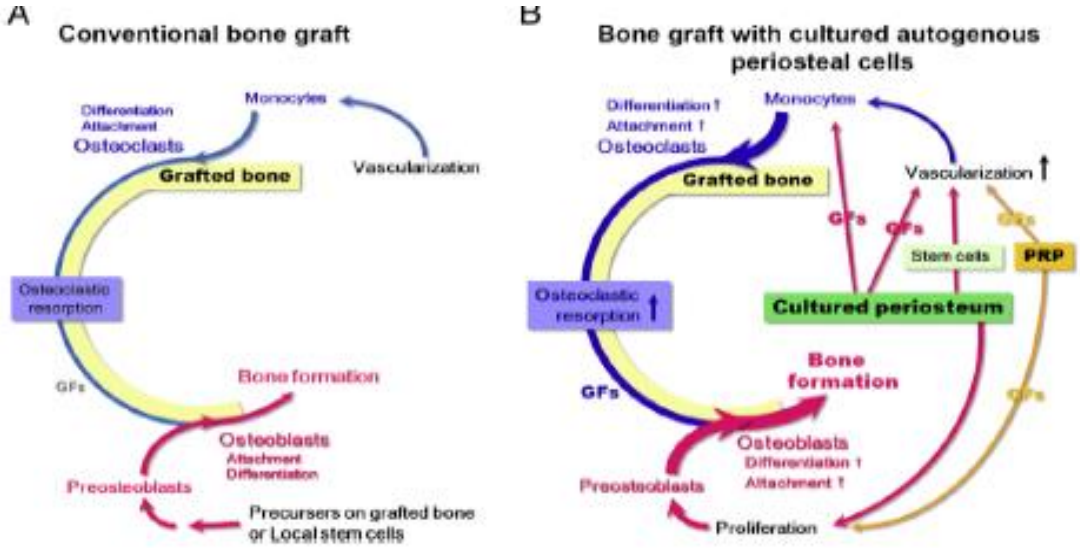
Source : Rami Mhanna and Anwarul Hasan, Introduction to tissue engineering: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine , 2017

Figure annexe 7: Schéma d'un matériau hybride à deux phases



Source: Igwe et al , Design, fabrication and *in vitro* evaluation of a novel polymer-hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering ,2012

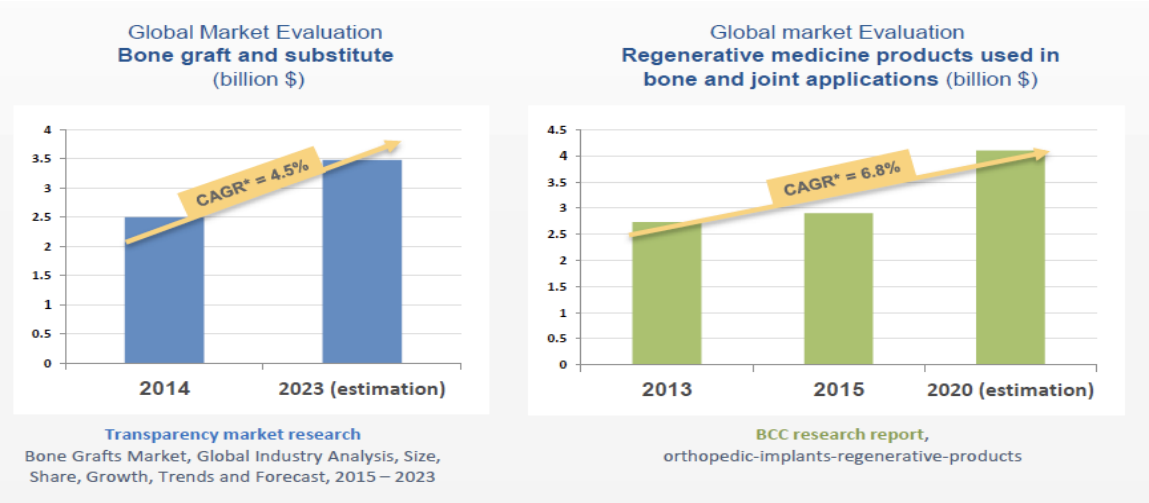
Figure annexe 8 : Hypothèse du mécanisme d'action des cellules de périoste cultivées dans la régénération osseuse



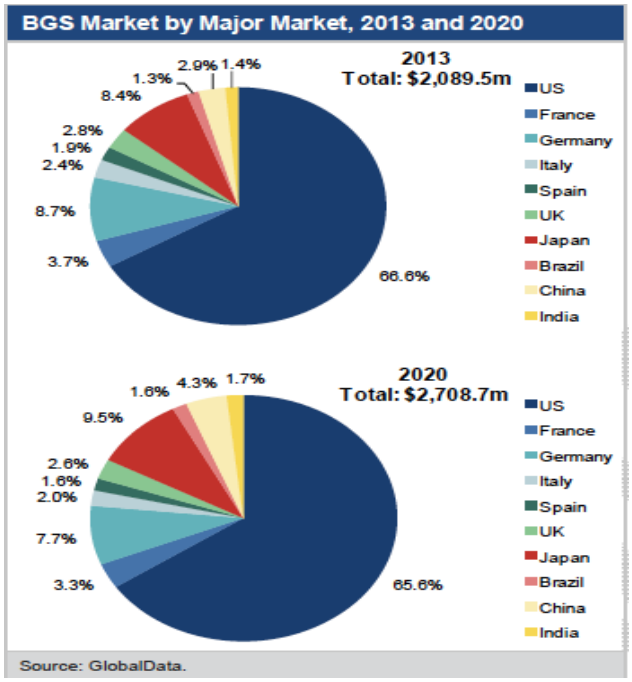
Source: Nagata et al., A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption, 2012

Figure annexe 9 : (A) Évolution du marché mondial des substituts osseux et produit de régénération (B) Segmentation du marché des substituts osseux.

A



B



Source: Global Data

Texte détaillé du guide pour porteur de projet de l'ANSM 2012

« Entré en vigueur le 30 décembre 2008, avec une période transitoire pour les produits déjà sur le marché, le règlement européen (CE) n°1394/2007 sur les médicaments de thérapie innovante a considérablement modifié l'environnement réglementaire applicable aux approches thérapeutiques qui font appel dans leurs mécanismes d'actions et activités aux gènes, tissus ou cellules.

Ce règlement, en confirmant le statut de médicament, spécialité pharmaceutique, aux produits de thérapie génique, de thérapie cellulaire, de l'ingénierie tissulaire et aux médicaments combinés de thérapie innovante, est en fait une *lex specialis* qui introduit des dispositions spécifiques pour ces médicaments et qui complètent les dispositions générales, énoncées dans la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain.

Ce règlement ne déroge pas aux principes fondamentaux énoncés dans la directive 2004/23/CE relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains mais introduit des exigences supplémentaires. Ainsi lorsqu'un médicament de thérapie innovante contient des cellules ou des tissus humains, la directive 2004/23/CE s'applique uniquement en ce qui concerne le don, l'obtention et le contrôle, du tissu ou des cellules qui serviront de matériau de départ à l'élaboration et production du médicament de thérapie innovante qui est lui sous le règlement 1394/2007.

Remarque : La version anglaise du règlement des thérapies innovantes parle de « Advanced Therapy Medicinal Products » (ATMP), ce terme a été traduit en français par « Médicament de thérapie innovante **».** Ainsi, l'abréviation ATMP en anglais devient MTI en français.

- **Les médicaments de thérapie innovante (MTI)** : cette définition couvre les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI avec un dispositif médical). Ils suivent le règlement européen n°1394/2007 et sont d'une part régulée au niveau national pour les essais cliniques et au niveau européen pour leur mise sur le marché et l'ensemble des procédures de suivi post-autorisation. Les produits utilisés en IT osseuse, évoluent dans ce cadre législatif.

- **Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP)** : ce sont des MTI fabriqués et utilisés au sein d'un unique état membre. Ces MTI-PP sont sous le régime des MTI du

règlement européen mais sont cependant exemptés de la clause de l'AMM centralisée et doivent donc suivre un cadre réglementaire national qui doit être équivalent aux règles communautaires applicables en matière de qualité et de sécurité. Ce nouveau type de produit, créé par le règlement européen, a été introduit dans le code de la santé publique français par la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011. A titre de remarque c'est cette catégorie de médicament qui, dans le règlement n°1394/2007, est défini par la terminologie « exemption hospitalière » à l'article 28.

- **Les préparations** : ce sont des produits cellulaire ou tissulaire (allogéniques ou autologues) à finalité thérapeutique. Ce ne sont pas des médicaments de thérapie innovante. Contrairement au MTI et MTI-PP, ces préparations ne sont pas des médicaments au sens du code de la santé mais sont des produits de santé, sous la compétence de l'ANSM et sont réglementées au niveau national sur la base de la directive 2004/23/CE.

Bien que ces trois statuts et ces trois cadres réglementaires aient le même objectif : assurer la qualité des produits et la sécurité des patients, les différences imposent aux développeurs de déterminer très tôt, au minimum avant la mise en place des études « pivots », la qualification du produit pour suivre les bons référentiels et éviter des impasses réglementaires rendant inadapté le développement réalisé.

- **Les Médicaments « issus » de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire :**

Sont considérés comme issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :

a) les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés.

b) les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur.

- Pour les besoins du point a) le règlement liste dans son annexe I une série de manipulations qui ne sont pas reconnues comme des manipulations substantielles

- La notion de modification substantielle doit se comprendre sur les conséquences de la modification, qui est substantielle si elle entraine "une modification des propriétés biologiques ou fonction initiale (cf. définition) Attention cependant, une succession de modifications, chacune non substantielle peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés de cellules / tissus et constituer au final une modification substantielle

- **Mise sur le marché d'un MTI** :

Comme pour tout médicament, spécialité pharmaceutique, pour pouvoir être mis sur le marché, les MTI devront obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM), qui pour ces produits sera obtenue obligatoirement dans le cadre d'une procédure centralisée d'autorisation. Cette autorisation est délivrée par la commission européenne après évaluation de l'Agence Européenne du Médicament. Cette évaluation est réalisée par le comité des médicaments à usage humain (CHMP) en collaboration avec le comité d'experts en charge de l'évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité des MTI, le « Committee for Advanced Therapies" (CAT).

De plus, du fait du faible recul sur ces produits le règlement introduit des exigences applicables après l'autorisation de mise sur le marché consistant en un suivi particulier de l'efficacité et des effets indésirables ainsi qu'une gestion adaptée des risques. L'objectif est de mettre en place les conditions nécessaires au recueil d'information en continu et dans la pratique réelle, permettant de s'assurer que le produit présente bien une balance bénéfice /risque favorable. Pour les médicaments combinés de thérapie innovante qui incluent des dispositifs médicaux ou des dispositifs médicaux implantables actifs, ces dispositifs doivent satisfaire aux exigences essentielles énoncées respectivement dans la directive 93/42/CEE modifiée et dans la directive 90/385/CEE modifiée. La demande d'autorisation de mise sur le marché doit donc inclure les éléments prouvant la conformité du dispositif médical aux exigences essentielles et inclut les résultats de l'évaluation par un organisme notifié conformément aux directives précitées. Si la demande n'inclut pas les résultats de l'évaluation par un organisme notifié, l'EMA peut demander un avis sur la conformité du dispositif médical avec les exigences essentielles à un organisme notifié ».

Chapitre Annexe :

Sociétés concurrentes dans le domaine :

Du fait d'un potentiel thérapeutique et économique important de nombreuses entreprises utilisent les dernières biotechnologies en date pour améliorer les greffes osseuses existantes. Néanmoins, il n'existe aujourd'hui aucune entreprise qui commercialise une construction complète d'IT osseuse comprenant des cellules, un matériau support et des signaux cellulaires.

- **<u>Sociétés développant des produits d'IT osseuse :</u>**

- **WRIGHT Medical**

Figure : photo du AUGMENT® Bone Graft

Wright medical

AUGMENT® Bone Graft est une greffe osseuse artificielle composée de deux parties. Une poudre composée de β-TCP, et un liquide comprenant une protéine artificielle appelée facteur de croissance dérivé des plaquettes humaines recombinantes (rhPDGF-BB). La biomatériau céramique a été utilisée pendant de nombreuses années dans des indications orthopédiques. Il fonctionne en fournissant un cadre pour la croissance des cellules osseuses. À mesure que l'os se développe, la partie en céramique est progressivement remplacée par l'os nouveau. La deuxième partie, rhPDGF-BB, est une protéine artificielle (facteur de croissance) présente naturellement dans les cellules sanguines.

Ce produit a premièrement eu un refus de la FDA en 2013 pour sa commercialisation (Detenu par Biomimetic Therapeutics) mais suite à un deuxième essai clinique plus pertinent, AUGMENT®est commercialisé depuis 2015 (racheté par WRIGHT MEDICAL) dans les indications suivantes : arthrodèse de la cheville (articulation tibiotalienne) et / ou de l'arrière-pied (incluant les articulations sous-

talienne, talonaviculaire et calcanéo-cuboïde, seules ou combinées), arthrose post-traumatique, polyarthrite rhumatoïde, arthrite psoriasique, nécrose avasculaire, instabilité articulaire, déformation articulaire, anomalie congénitale ou arthropathie articulaire. Ce produit est un DM de classe III.

- **Bonus Biogroup**

Bonus BioGroup est une société de biotechnologie appliquant une technologie exclusive et innovante pour générer des greffes osseuses viables utilisant l'IT osseuse (cellules scaffold et signaux). La société s'efforce de devenir un leader mondial dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la transplantation osseuse vivante.

Leur produit BonoFill™ est produit individuellement à partir des cellules adipeuses dérivées de chaque patient. Par conséquent, lors de la transplantation dans l'os déficient des patients, les cellules autologues éliminent le risque de rejet et d'échec de la chirurgie. Le tissu adipeux requis pour la production de cellules dérivées d'adipose est récolté dans une procédure simple et peu invasive. BonoFill™ contient à la fois des cellules osseuses matures et pré matures, et peut contenir des cellules endothéliales. Lors de la transplantation, les cellules osseuses continuent de proliférer et de sécréter des facteurs de croissance, tandis que les cellules endothéliales améliorent la vascularisation du greffon (formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Cette composition cellulaire favorise la régénération osseuse et les mécanismes de récupération dans le site de transplantation.

BonoFill™ consiste en un échafaudage minéral approuvé par la FDA. La nanostructure unique de l'échafaud soutient de manière optimale l'expansion cellulaire in vitro (en laboratoire) et fournit les propriétés de support désirées in vivo (chez le patient). Les cellules sont cultivées en multi-couches dans un bioréacteur. Les avantages de la technique du bioréacteur sont divers. Il assure non seulement un environnement homogène bien mélangé, mais maintient également l'extensibilité, permet un contrôle automatisé, réduit la manipulation des cellules et raccourcit la période de culture. Ces avantages contribuent à la rentabilité, à la sécurité et à la haute densité de BonoFill™

Les défauts osseux maxillo-faciaux nécessitent de grandes quantités de greffe osseuse pour combler les lacunes osseuses, améliorer la solidité de l'os et soutenir les implants dentaires. Différentes stratégies sont disponibles pour augmenter le processus de régénération osseuse altérée, y compris la greffe osseuse autologue "gold standard", la transplantation d'allogreffe, l'utilisation de facteurs de croissance, les échafaudages ostéoconducteurs et les substituts osseux synthétiques. Cependant, toutes les stratégies actuelles sont associées à des inconvénients substantiels et des

limitations à leur utilisation et à leur disponibilité. En conséquence, la nécessité d'un traitement plus avancé est cruciale. Les études précliniques avec BonoFill™ ont démontré des profils élevés d'innocuité et d'efficacité. L'évaluation clinique de BonoFill™ est actuellement en cours d'étude clinique de phase I / II pour l'augmentation et la régénération osseuse maxillo-faciale. D'autres indications comme les fractures de tibia non jointives font parties des indications possibles de ce produit. Enfin, du fait de sa composition BonoFill™ sera sous la réglementation des MTI.

Figure : Schéma du processus de fabrication du BonoFill™

Source : Bonus BioGroup

- **Bone therapeutics**

Bone Therapeutics est une société de biotechnologie leader dans le développement de produits de thérapie cellulaire destinés à l'orthopédie et aux maladies osseuses. Bone Therapeutics développe une gamme de produits régénérateurs innovants pour la reconstruction du tissu osseux, administrables sans chirurgie ouverte par voie percutanée. C'est la seule société en phase III pour la commercialisation de cellules ostéogéniques ce qui en fait la société la plus avancée dans ce domaine.

Bone Therapeutics a développé une technologie révolutionnaire dans le domaine de l'orthopédie. Sa technologie est basée sur des produits de thérapie cellulaire, plus spécifiquement des cellules ostéoblastiques différenciées administrées directement sur le site osseux endommagé et qui vont immédiatement commencer à restaurer un os à la normale in situ. Les deux premiers produits de

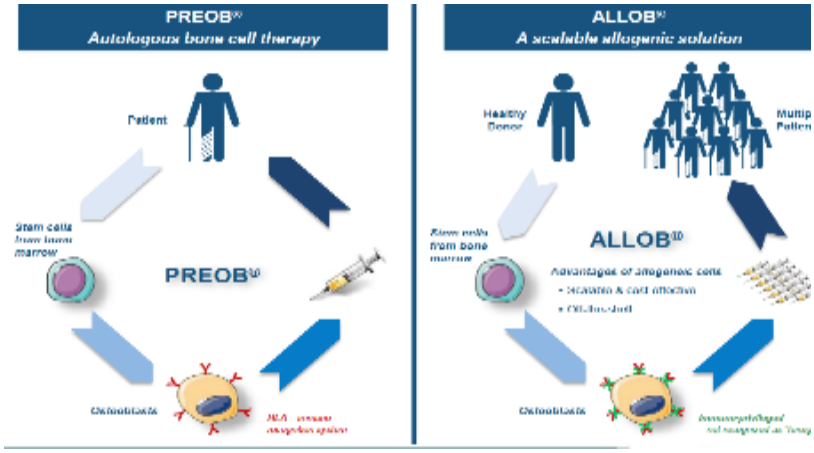
thérapie cellulaire en cours de développement, PREOB® (autologue) et ALLOB® (allogénique), sont uniques dans l'espace des troubles osseux pour les raisons suivantes :

- Meilleure efficacité de ces ostéoblastes modifiés par rapport aux cellules souches mésenchymateuses non différenciées (MSC) utilisées par les compétiteurs grâce à un processus de différenciation spécifique, exclusif et breveté. Les CSM extraites de la moelle osseuse sont des cellules souches multipotentes, ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en seulement quelques cellules spécifiques : ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. Bone Therapeutics utilise des cellules spécialisées dans l'os dédiées à la régénération osseuse. Commencer la différenciation à partir d'une cellule souche osseuse spécialisée permet un traitement plus puissant (plus rapide et meilleure capacité de formation osseuse).
- Meilleure sécurité car le processus de différenciation commence à partir de cellules souches spécialisées dans les os. Il n'y a pas de risque d'obtenir un "mélange" de différentes cellules à la fin de la procédure de différenciation) par opposition au démarrage du processus de différenciation avec une cellule souche multipotente (qui a le potentiel de se différencier en n'importe quel type de tissu). L'utilisation de cellules indifférenciées peut entraîner une prolifération incontrôlée de différents types de cellules et de cancers.
- Technique peu invasive impliquant un séjour hospitalier plus court et une réhabilitation plus rapide en cas de fracture. Contrairement à la chirurgie de greffe osseuse qui implique une chirurgie ouverte, la technologie de Bone Therapeutics ne nécessite qu'une injection percutanée ambulatoire unique rapide (environ 20 minutes) pour implanter les cellules ostéoblastiques. Le processus de fabrication est court, robuste, reproductible et spécifique.

En effet, il ne faut que trois semaines pour fabriquer PREOB® et quatre semaines pour fabriquer ALLOB® en utilisant des milieux de culture spécifiques. Le processus complet pour passer de la moelle osseuse à ALLOB® est divisé en deux parties. Deux semaines sont nécessaires pour produire un produit intermédiaire qui est cryoconservé.

Aujourd'hui Bone Therapeutics se concentre sur l'orthopédie pour une entrée sur le marché plus aisée mais sa technologie pourrait s'appliquer à des procédures en chirurgie orale tout comme Bonus Biogroup.

Figure : Schéma des produits développés par Bone Therapeutics



Source : Bone Therapeutics

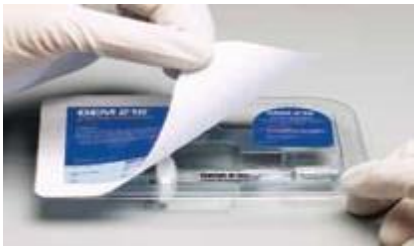
- **Emdogain Straumann**

Straumann® Emdogain® est un gel de matrice d'émail contenant un gel facile à appliquer et provenant de bourgeons dentaires porcins non éruptifs. En tant que composant des tissus embryonnaires, il est conçu pour favoriser la régénération prévisible des tissus durs et mous perdus en raison d'une maladie parodontale ou d'un traumatisme.

Le composant principal de Straumann® Emdogain® est l'amélogénine, qui s'assemble en une matrice insoluble dans des conditions physiologiques. La matrice a la capacité prouvée de stimuler divers types de cellules impliquées dans la cascade de cicatrisation des tissus mous et durs (cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes, fibroblastes, cellules parodontales et cémentoblastes) vers un schéma de régénération.

- **OSteohealth**

Figure : photo du EM 21S®



Source : Osteohealth

La matrice EM 21S® incorporant des facteurs de croissance a été développée en utilisant des principes innovants de génie tissulaire qui combinent une protéine bioactive (rhPDGF-BB) et une matrice ostéoconductrice (phosphate tricalcique bêta, β-TCP). Il s'agit de la même technologie que le produit AUGMENT® Bone Graft mais son indication est différente. En effet le EM 21S® initialement développé par Biomimetics Therapeutic est indiqué en chirurgie parodotontale pour la régénération tissulaire et osseuse. Ce produit est commercialisé depuis 2009.

- **Sociétés développant des produits à base de corail :**

A ce jour il n'existe aucune entreprise d'envergure commercialisant ou poursuivant des études sur l'utilisation du corail en IT osseuse. Cependant quelques entreprises commercialisent du corail en tant que substitut osseux, sous différentes formes en utilisant différentes techniques.

- **Biocoral Inoteb**

BIOCORAL INC. PROFIL DE L'ENTREPRISE Biocoral, Inc. est une société internationale spécialisée dans la recherche et le développement et la commercialisation de biomatériaux, de technologies biomédicales et de biotechnologies. Via ses filiales françaises, la société recherche, développe, fabrique et commercialise des greffons osseux (Biocoral®) et d'autres produits de croissance osseuse pour des applications orthopédiques, orales et maxillo-faciales dans un certain nombre de pays en dehors des États-Unis. La société a également développé ce que la direction estime être la première colle biologique entièrement autologue au monde. La société a également complété les dernières étapes de développement de son produit pour le traitement des fractures osseuses associées à l'ostéoporose et continue de travailler sur la prévention de telles fractures

- **Corebone**

CoreBone exploite les qualités osseuses du corail grâce à un procédé breveté unique et incorpore des minéraux bioactifs dans le corail pendant la croissance des coraux dans les aquariums pour améliorer la formation osseuse. CoreBone produit la seule greffe osseuse fabriquée à partir de coraux cultivés dans un système fermé et contrôlé, ce qui garantit un environnement exempt de contaminants et la qualité des produits. Le matériel de greffe de CoreBone est composé de la partie minérale pure du corail. Il se compose de cristaux de carbonate de calcium (> 95 %) sous forme d'aragonite enrichie

de silicium, de strontium et d'autres substances non organiques. Les trois principaux éléments - calcium, silicium et strontium - sont connus pour jouer un rôle important dans le processus de minéralisation osseuse et dans l'activation des réactions enzymatiques avec des cellules ostéogéniques. Etude clinique en cours : « The Use of CoreBone Coral Particles vs. Cones for Preservation of Alveolar Bone (CoreBone) ». Corebone est commercialisé dans des indications parodontales et pré implantaire en chirurgie orale, et dans quelques indications orthopédiques. Il s'agit un DM de classe III.

- **Zimmer Biomet**

Pro Osteon 200R est une matrice résorbable et ostéoconductrice composée d'hydroxyapatite et de carbonate de calcium. Initialement autorisé pour une utilisation en chirurgie maxillofaciales en tant que matériau de résorption lente, le Pro Osteon 200R à résorption rapide est indiqué comme un substitut de greffe osseuse qui se résorbe et est remplacé par de l'os pendant le processus de guérison. Sa porosité interconnectée, sa composition chimique et son temps de résorption font du Pro Osteon 200R un environnement propice à la croissance des os

Vu, le Directeur de thèse

Docteur Charles-Daniel ARRETO

Vu, le Doyen de la Faculté de Chirurgie dentaire
de l'Université Paris Descartes

Professeur Louis MAMAN

Vu, le Président de l'Université Paris Descartes
Professeur Fréderic DARDEL
Pour le Président et par délégation,

Le Doyen Louis MAMAN

L'utilisation du corail dans une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse

Résumé :

La greffe autologue est aujourd'hui considérée comme le gold standard pour régénérer des défauts osseux. Malheureusement cette technique est limitée en quantité et augmente le risque infectieux chez le patient. La discipline de l'ingénie tissulaire (IT) permet de construire des tissus comprenant une matrice, des cellules et des signaux cellulaires pour restaurer les défauts osseux. Cette thèse d'exercice a pour objet de faire l'état de l'art de l'ingénierie tissulaire osseuse et d'évaluer la pertinence de l'utilisation du corail dans une telle stratégie.

Nous avons vu que l'Ingénierie tissulaire osseuse est une discipline qui pourrait dans les prochaines années être intégrée en clinique. Aussi du fait de sa biocompatibilité, sa résistance mécanique, sa capacité à permettre aux cellules souches de s'attacher, proliférer et se différencier, le corail pourra jouer un rôle essentiel dans de futures applications cliniques de l'IT osseuse. Par ailleurs cette utilisation n'est possible que si une maîtrise de sa résorption est effectuée. Enfin cette construction ne sera cliniquement disponible que si l'innovation permet de satisfaire les nouvelles conditions réglementaires des médicaments de thérapies innovantes. Le marché de l'IT (particulièrement de l'IT osseuse) et celui des substituts osseux est orienté très favorablement, ce qui permettra un investissement financier important dans de telles thérapies.

Discipline :

Chirurgie orale

Mots clés fMesh et Rameau :

Bioingénierie -- Dissertations universitaires ; Thérapie cellulaire et tissulaire -- Dissertations universitaires ; Bouche -- Chirurgie -- Thèses et écrits académiques ; Acroporidés -- Thèses et écrits académiques

Université Paris Descartes

Faculté de Chirurgie dentaire

1, rue Maurice Arnoux

92120 Montrouge