



**HAL**  
open science

# Les cellules souches pour induire la régénération osseuse

Gabriel Cohen

► **To cite this version:**

Gabriel Cohen. Les cellules souches pour induire la régénération osseuse. Chirurgie. 2019. dumas-02494447

**HAL Id: dumas-02494447**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02494447>**

Submitted on 28 Feb 2020

**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

**THESE**

***POUR OBTENIR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE***

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille  
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix-Marseille Université  
(Administratrice provisoire : Madame le Professeur Simone BONNAFOUS)

***Les cellules souches pour  
induire la régénération osseuse***

Présentée par

**COHEN Gabriel**

Né le 23 février 1993

A Aix-en-Provence

Thèse soutenue le **Judi 19 décembre 2019**

Devant le jury composé de

**Président : Professeur RUQUET Michel**

**Assesseurs : Docteur PRECKEL Bernard-Éric**

**Docteur GIRAUD Thomas**

**Professeur ABOUT Imad**



**THESE**

***POUR OBTENIR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE***

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille  
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix-Marseille Université  
(Administratrice provisoire : Madame le Professeur Simone BONNAFOUS)

***Les cellules souches pour  
induire la régénération osseuse***

Présentée par

**COHEN Gabriel**

Né le 23 février 1993

A Aix-en-Provence

Thèse soutenue le **Judi 19 décembre 2019**

Devant le jury composé de

**Président : Professeur RUQUET Michel**

**Assesseurs : Docteur PRECKEL Bernard-Éric**

**Docteur GIRAUD Thomas**

**Professeur ABOUT Imad**

## ADMINISTRATION

*Mise à jour : décembre 2019*

### **DOYENS HONORAIRES**

PROFESSEUR	RAYMOND SANGIUOLO <sup>†</sup>
PROFESSEUR	HENRY ZATTARA
PROFESSEUR	ANDRE SALVADORI
PROFESSEUR	JACQUES DEJOU

### **DOYEN ASSESEURS**

PROFESSEUR	BRUNO FOTI
PROFESSEUR	MICHEL RUQUET
PROFESSEUR	ANNE RASKIN

### **DIRECTEURS DE DEPARTEMENTS**

FORMATION INITIALE  
RECHERCHE  
FORMATION CONTINUE

PROFESSEUR	MICHEL RUQUET
PROFESSEUR	ANNE RASKIN
PROFESSEUR	FREDERIC BUKIET

### **CHARGES DE MISSIONS**

RELATIONS INTERNATIONALES  
INTERNAT ET DIPLOMES D'ETUDES SPECIALISEES  
AFFAIRES GENERALES

PROFESSEUR	HERVE TASSERY
PROFESSEUR	VIRGINIE MONNET-CORTI
DOCTEUR	PATRICK TAVITIAN

### **RESPONSABLE DES SERVICES ADMINISTRATIFS ET TECHNIQUES**

MADAME	KATIA LEONI
--------	-------------

## **LISTE DES ENSEIGNANTS**

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD**

BUKIET FREDERIC (58-01)  
DEJOU JACQUES (58-01)  
FOTI BRUNO (56-02)  
MONNET-CORTI VIRGINIE (57-01)  
ORTHLIEB JEAN-DANIEL (58-01)  
RASKIN ANNE (58-01)  
RUQUET MICHEL (58-01)  
TARDIEU CORINNE (56-01)  
TARDIVO DELPHINE (56-02)  
TASSERY HERVE (58-01)

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

ABOUT Imad (65)

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD**

ABOUDHARAM GERARD (58-01)	LAURENT MICHEL (58-01)
BANDON DANIEL (56-01)	LAURENT PATRICK (57-01)
BELLONI DIDIER (57-01)	LE GALL MICHEL (56-01)
BOHAR JACQUES (56-01)	MAILLE GERALD (58-01)
CAMOIN ARIANE (56-01)	PHILIP-ALLIEZ CAMILLE (56-01)
CAMPANA FABRICE (57-01)	PIGNOLY CHRISTIAN (58-01)
CATHERINE JEAN-HUGUES (57-01)	POMMEL LUDOVIC (58-01)
ERARD-MAGNO ELISABETH (56-01)	PRECKEL BERNARD-ÉRIC (58-01)
GAUBERT JACQUES (56-01)	RÉ JEAN-PHILIPPE (58-01)
GIRAUD THOMAS (58-01)	ROCHE-POGGI PHILIPPE (57-01)
GIRAudeau ANNE (58-01)	STEPHAN GREGORY (58-01)
GUIVARC'H MAUD (58-01)	TAVITIAN PATRICK (58-01)
JACQUOT BRUNO (58-01)	TERRER ELODIE (58-01)
LABORDE GILLES (58-01)	TOSELLO ALAIN (58-01)
LAN ROMAIN (57-01)	

### **MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES**

BLANCHET ISABELLE (56-01)  
MENSE CHLOE (58-01)

## **ASSISTANTS HOSPITALIERS ET UNIVERSITAIRES**

AL AZAWI HALA (56-01)	HAHN-GOLETTI LARISSA (58-01)
ANTEZACK ANGELINE (57-01)	LIOTARD ALICA (58-01)
BACHET-DORISON DAMIENNE (56-01)	MANSUY CHARLOTTE (58-01)
BALLESTER BENOIT (58-01)	MARTIN WILLIAM (56-01)
BARBERO MAGALI (56-01)	MATTERA REMI (56-01)
BOYER ALEXANDRA (57-01)	MELLOUL SEBASTIEN (57-01)
CAMBON ISABELLE (56-01)	PARFU ANNE (58-01)
CASAZZA ESTELLE (56-01)	PASCHEL LAURA (58-01)
CASTRO ROMAIN (57-01)	PILLIOL VIRGINIE (58-01)
DAVID LAURA (56-01)	REPETTO ANDREA (58-01)
DEVICTOR ALIX (58-01)	ROMANET YVAN (57-01)
DODDS MELINA (58-01)	SANTUNIONE CHARLOTTE (58-01)
DRAUSSIN THIERRY (56-02)	SILVESTRI FREDERIC (58-01)
DUMAS CATHY (57-01)	VINAÏ MICHAEL (56-01)
HADJ-SAID MEDHI (57-01)	

## **ASSISTANT ASSOCIE DES UNIVERSITES**

LE FOURNIS CHLOE (57-01)

Intitulés des sections CNU :

- 56<sup>ème</sup> section : *Développement, croissance et prévention*
  - 56-01 *Odontologie pédiatrique et orthopédie dento-faciale*
  - 56-02 : *Prévention – Epidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale*
- 57<sup>ème</sup> section : *Chirurgie orale ; Parodontologie ; Biologie Orale*
  - 57-01 : *Chirurgie orale – Parodontologie – Biologie orale*
- 58<sup>ème</sup> section : *Réhabilitation orale*
  - 58-01 : *Dentisterie restauratrice – Endodontie – Prothèses – Fonction-Dysfonction – Imagerie – Biomatériaux*

L'auteur s'engage à respecter les droits des tiers, et notamment les droits de propriété intellectuelle. Dans l'hypothèse où la thèse comporterait des éléments protégés par un droit quelconque, l'auteur doit solliciter les autorisations nécessaires à leur utilisation, leur reproduction et leur représentation auprès du ou des titulaires des droits. L'auteur est responsable du contenu de sa thèse. Il garantit l'Université contre tout recours. Elle ne pourra en aucun cas être tenue responsable de l'atteinte aux droits d'un tiers.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL RUQUET

Vous nous avez fait le très grand honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse.

Nous sommes fiers de voir ce travail soumis à votre approbation.

Nous vous remercions également pour votre accessibilité et votre sympathie tout au long de notre formation clinique.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

A MONSIEUR LE DOCTEUR BERNARD-ERIC PRECKEL

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à notre Jury de Thèse.

Nous avons pu apprécier pendant ces quatre années passées en clinique, vos qualités professionnelles et humaines.

Nous vous remercions de votre pédagogie et de vos conseils.

A MONSIEUR LE DOCTEUR THOMAS GIRAUD

Nous vous remercions de faire l'honneur et le plaisir d'être parmi notre Jury de Thèse.

Nous vous remercions également pour la qualité de vos conseils et de votre intérêt porté à cette Thèse.

Veillez trouver dans ce travail la marque de notre profonde reconnaissance et sincère gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR IMAD ABOUT

Vous nous faites un grand honneur de diriger cette Thèse.

Nous vous remercions d'avoir encadré ce travail et d'avoir été disponible pour qu'il soit réalisé dans les meilleures conditions.

Vous avez guidé cette Thèse avec la compétence qui n'a d'égale que votre gentillesse.

Nous espérons avoir été digne de la confiance que vous nous avez accordée et que notre travail est à la hauteur de vos espérances.

# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE</b> .....	<b>2</b>
2.1. LE REMODELAGE OSSEUX .....	3
2.2. LA REPARATION OSSEUSE .....	6
<b>3. LE SUPPORT</b> .....	<b>9</b>
3.1. PROPRIETES .....	9
3.2. SUBSTITUTS OSSEUX D'ORIGINE NATURELLE .....	11
<b>3.2.1. AUTOGREFFES</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2.2. L'OS ALLOGENIQUE</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2.3. L'OS XENOGENIQUE</b> .....	<b>13</b>
3.3. SUBSTITUTS OSSEUX SYNTHETIQUES .....	13
<b>3.3.1. LES SUBSTITUTS A BASE DE PHOSPHATE DE CALCIUM</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3.2. HYDROGELS</b> .....	<b>14</b>
3.4. SUBSTITUTS OSSEUX COMPOSITES .....	15
<b>3.4.1. SUPPORTS COMPOSITES A BASE DE CERAMIQUE</b> .....	<b>17</b>
3.4.1.1. CERAMIQUE ET POLYMERES .....	17
3.4.1.2. CERAMIQUES COMPOSITES PLUS DENSES .....	17
<b>3.4.2. HYDROGELS HYBRIDES</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4.3. CELLULES GENETIQUEMENT MODIFIEES</b> .....	<b>18</b>
3.5. APPORT DE CELLULES DANS LE SUPPORT .....	18
<b>4. CELLULES SOUCHES POUR LA REGENERATION OSSEUSE</b> .....	<b>19</b>
4.1. CARACTERISTIQUES .....	20
<b>4.1.1. LES CELLULES SOUCHES ALLOGENIQUE</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1.2. IDENTIFICATION IN VITRO DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES</b> .....	<b>21</b>
4.2. SOURCES .....	23
<b>4.2.1. LES CELLULES SOUCHES INTRA-ORALES</b> .....	<b>24</b>
4.2.1.1. LES CELLULES SOUCHES PULPAIRES .....	25
4.2.1.2. LES CELLULES SOUCHES DE DENTS LACTEALES .....	26
4.2.1.3. LES CELLULES PROGENITRICES DU FOLLICULE DENTAIRE .....	27
<b>4.2.2. LES CELLULES SOUCHES EXTRA-ORALES</b> .....	<b>28</b>
4.2.2.1. POPULATIONS DE CELLULES STROMALES DERIVEES DE LA MOELLE OSSEUSE .....	28
4.2.2.2. POPULATIONS DE CELLULES STROMALES DERIVEES DU TISSU ADIPEUX .....	30
<b>4.2.3. CELLULES SOUCHES INDUITES PAR REPROGRAMMATION (OU CELLULES PLURIPOTENTES INDUITES) ....</b>	<b>31</b>
<b>5. ETUDES IN VITRO</b> .....	<b>33</b>
5.1. EXPANSION CELLULAIRE .....	34
5.2. DIFFERENCIATION CELLULAIRE .....	35
5.3. FORMATION D'ORGANOÏDE OSSEUX EX VIVO .....	36
<b>6. ETUDES IN VIVO</b> .....	<b>41</b>
6.1. SUR L'ANIMAL .....	41
<b>6.1.1. ETUDES SUR LES PETITS MAMMIFERES (SOUSIS, RATS)</b> .....	<b>41</b>
6.1.1.1. ETUDES AVEC CELLULES SOUCHES XENOGENIQUES .....	41
6.1.1.2. ETUDES AVEC CELLULES SOUCHES ALLOGENIQUES .....	45
<b>6.1.2. ETUDES SUR LES GRANDS MAMMIFERES (MOUTON, COCHON, LAPIN)</b> .....	<b>49</b>
6.1.2.1. ETUDES COMPARATIVES DU POTENTIEL OSTEOGENIQUE ENTRE CELLULES SOUCHES ISSUES DE MOELLE OSSEUSE OU DU TISSU ADIPEUX .....	49
6.1.2.2. ETUDES AVEC CELLULES SOUCHES AUTOLOGUES .....	50
6.2. SUR L'HOMME .....	51
<b>7. CONCLUSIONS</b> .....	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>I</b>

# FIGURES ET TABLEAUX

---

## FIGURES

Figure 1 :	Le remodelage osseux.....	3
Figure 2 :	Principaux facteurs contrôlant la différenciation ostéoblastique .....	4
Figure 3 :	Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique .....	5
Figure 4 :	La réparation osseuse .....	6
Figure 5 :	Triade de l'ingénierie tissulaire .....	8
Figure 6 :	Exemple de chirurgie pour augmentation osseuse .....	11
Figure 7 :	Facteurs implantés sur le site du défaut osseux influençant la réponse de l'hôte. ....	16
Figure 8 :	Illustration d'un échafaudage hybride composé d'un composant mécaniquement solide et d'une phase d'hydrogel .....	18
Figure 9 :	Division cellulaire à partir d'une cellule souche. ....	19
Figure 10 :	Localisation des cellules souches dentaires .....	24
Figure 11 :	Procédé d'extraction de la pulpe dentaire .....	25
Figure 12 :	Représentation schématique du traitement des cellules souches mésenchymateuses pour une utilisation autologue .....	34
Figure 13 :	Culture cellulaire sur support ostéoinductif 3D .....	37
Figure 14 :	Étapes fondamentales de la formation osseuse in vitro .....	38
Figure 15 :	Illustration schématique des bioréacteurs les plus couramment utilisés .....	39
Figure 16 :	Seringues stériles contenant 100 millions cellules stromales de la moelle osseuse humaine mélangées avec du phosphate de calcium biphasique (BCP) .....	41
Figure 17 :	Imagerie de bioluminescence .....	42
Figure 18 :	Différents types de réseaux des supports à base de phosphate de calcium et de collagène chargés de Dexaméthasone .....	43
Figure 19 :	Cultures cellulaire sur différents supports composites .....	44
Figure 20 :	Observation de la régénération osseuse des différents supports .....	46
Figure 21 :	Observation de la densité osseuse à 4 et 8 semaines .....	47
Figure 22 :	Photographies des étapes cliniques .....	53
Figure 23 :	Tomodensitométrie à faisceau conique (CBCT) .....	54
Figure 24 :	Étapes de la reconstruction mandibulaire .....	57
Figure 25 :	Photographie de l'état initial .....	59
Figure 26 :	Scanner mettant en évidence un améloblastome mandibulaire antérieur .....	59
Figure 27 :	Photographies intra opératoire .....	60
Figure 28 :	Photographie du protocole de greffe de cellules souches .....	61
Figure 29 :	Scanner à 10 mois post opératoire .....	62
Figure 30 :	Photographie de l'ensemble des étapes cliniques .....	64
Figure 31 :	Evolution dans le temps de la régénération osseuse à t0 et 6 mois .....	66

## TABLEAUX

Tableau 1 :	Différenciation ostéoblastique des cellules souches intra-orale .....	28
Tableau 2 :	Détails de 13 cas de malformations squelettiques cranio-maxillo-faciales traitées avec cellules souches adipeuses .....	56

# INTRODUCTION

---

L'incidence mondiale des troubles et affections osseuses ne cesse d'augmenter avec l'augmentation de l'espérance de vie, ainsi que des facteurs de risques tels que l'obésité ou le manque d'activité physique. Avec près de 2,2 millions d'interventions chirurgicales par an dans le monde, l'os fait partie des tissus les plus fréquemment greffés [1].

En odontologie, l'origine des lésions osseuses dites de taille critique peut être congénitale (malformation), infectieuse (ostéonécrose), traumatique ou encore tumorale (améloblastome). D'autre part, la perte des organes dentaire initie un processus de résorption continue de la crête alvéolaire. De plus, le port de prothèses ou leurs usures accélèrent souvent la perte du volume osseux.

Le traitement de ces défauts de taille critique, dont la régénération spontanée est impossible, requièrent des techniques de régénérations osseuses.

La reconstruction des défauts osseux reste cependant un défi clinique majeur. Le volume osseux résiduel minimal et la nature progressive du processus de résorption complique la régénération, et plus particulièrement à la mandibule. En effet, le maxillaire inférieur possède une vascularisation terminale avec un apport sanguin relativement limité et est soumise aux fonctions orales qui nuisent à la stabilité du greffon [2].

Actuellement, les praticiens ont à leur disposition de nombreux substituts osseux pour la régénération de défauts osseux importants des maxillaires, dont le développement est constant pouvant servir de support à l'ingénierie tissulaire.

Cette thèse a pour objectif de présenter les supports disponibles, et d'évaluer si la thérapie cellulaire à base de cellules souches est pertinente pour la régénération osseuse de défauts osseux critiques. Pour cela, des rappels sur la physiopathologie osseuse et les supports disponibles aujourd'hui seront présentés. Ensuite, les mécanismes nécessaires pour l'exploitation des cellules souches et leur apport dans les thérapeutiques étudiées seront présentée par l'intermédiaire d'études précliniques et cliniques.

# LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE

---

La connaissance de la biologie osseuse et de son développement est essentielle.

Le tissu osseux est composé à 70% d'une phase minérale (phosphate de calcium de structure apatite) et à 30% d'une phase organique, elle-même composée à 95% de collagènes de type I ainsi que d'autres protéines (protéoglycanes, glycoprotéines, et facteurs de croissance présent dans la matrice osseuse) et de cellules. Trois populations cellulaires sont caractéristiques du tissu osseux, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes [3].

Sa structure nanométrique est composée de fibres de collagènes dures et flexibles renforcées par de l'hydroxyapatite, lui conférant sa résistance à la compression et sa ténacité élevée.

On distingue le tissu osseux compact ou cortical pour les os courts, et le tissu osseux spongieux, retrouvé dans les parties internes des os plats et au niveau des alvéoles dentaires.

- ✓ Le tissu osseux cortical a une structure homogène, dure, dense, et ordonnée. Il est organisé autour d'un canal de Havers contenant du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins, lymphatiques, et nerveux, entouré de lamelles de fibres collagéniques. Dans ces lamelles se trouvent des lacunes accueillant des ostéocytes. Des canaux transversaux secondaires relient le périoste aux canaux de Havers. Ces canaux permettant les échanges vasculaires conférant une résistance maximale au tissu osseux en répartissant les forces de pression [3].
- ✓ Le tissu osseux spongieux est plus léger, moins compact et possède une structure irrégulière. Cet os est composé d'un réseau de travées qui s'enchevêtrent, individualisant des cavités contenant des cellules de la moelle osseuse. Les travées sont orientées le long des lignes de stress (compression) et renforcent la structure de l'os [3].

## 1. LE REMODELAGE OSSEUX

Le tissu osseux est en remodelage permanent, celui-ci est physiologique et sous l'influence de stimuli métaboliques, endocriniens, et mécaniques issus de son environnement. Ce remodelage est un cycle constant de résorption et de renouvellement [4]. Ce processus bien connu se déroule selon quatre grandes étapes (Figure 1) :

1. Activation,
2. Résorption,
3. Inversion,
4. Minéralisation.

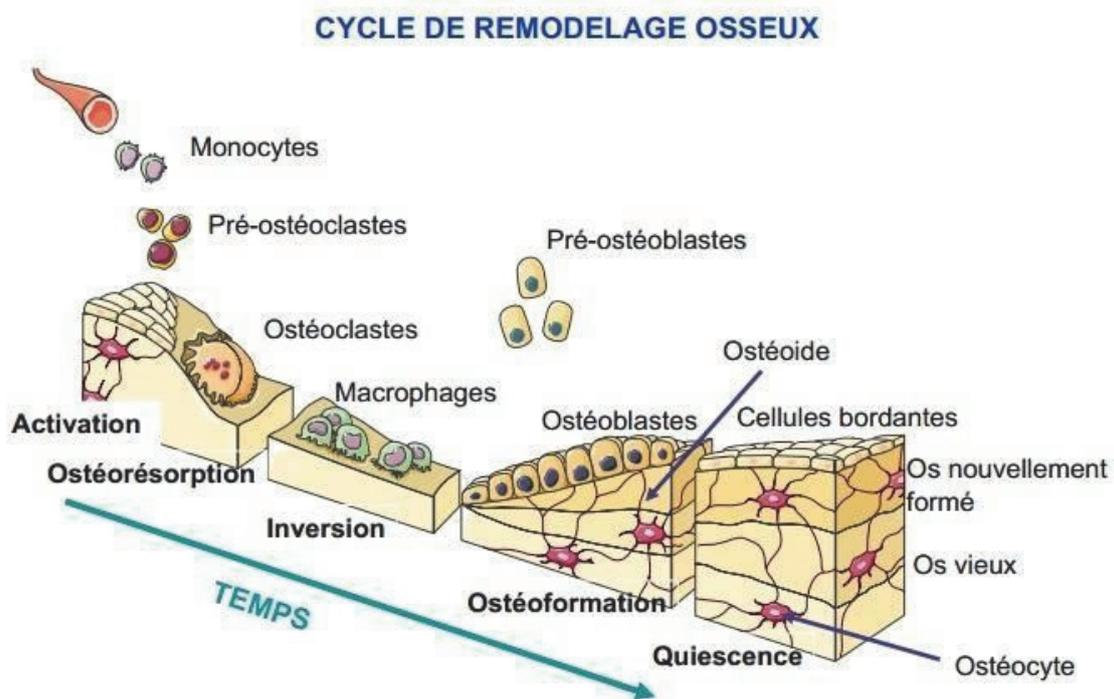


Figure 1 : Le remodelage osseux [4]

1. **Activation** : Les ostéocytes, présents dans la matrice osseuse sont à l'origine de l'activation du remodelage osseux par la réception et la transduction de stress mécanique via les filaments d'actine. De plus, l'action de certains protagonistes comme la parathormone, la prostaglandine E2 et la vitamine D3 permettent aussi aux ostéoclastes d'adhérer à la matrice [5].

2. **Résorption** : Les ostéoclastes sont des cellules à l'origine de la résorption osseuse. Elles ont pour origine les cellules précurseurs de la lignée des monocytes/macrophages. Ils vont proliférer et se différencier sur la surface osseuse à résorber.
  
3. **Inversion** : Au cours de la phase de résorption, la matrice dégradée libère des facteurs de croissance (FGF-2, TGF- $\beta$ , BMPs, IGF). Comme le montre Figure 2, leur libération permet d'agir sur la prolifération et différenciation des cellules ostéogéniques, les ostéoblastes [6]. Cette notion permet de comprendre l'interdépendance entre résorption et formation osseuse.

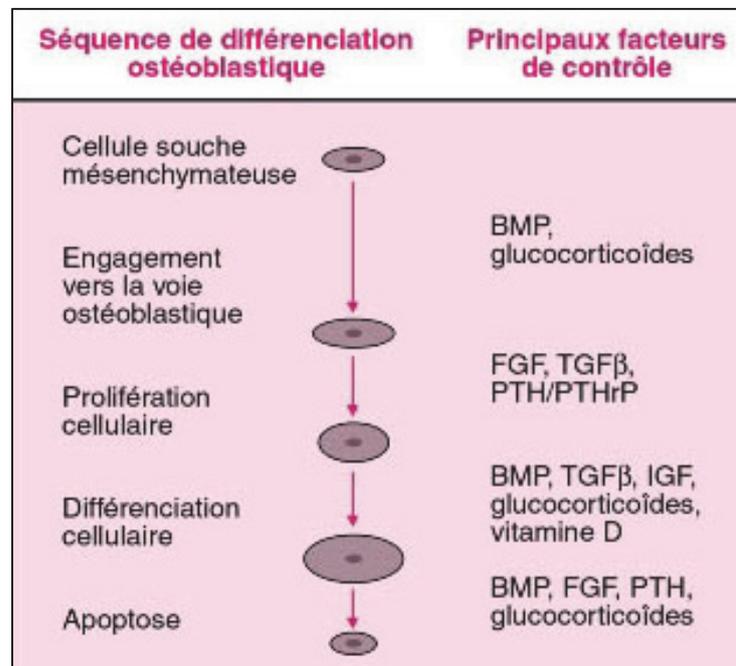


Figure 2 : Principaux facteurs contrôlant la différenciation ostéoblastique [6]

4. **Minéralisation** : Les ostéoblastes sont des cellules riches en organites. Ils permettent la sécrétion d'une matrice extracellulaire osseuse par la production du collagène et des protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine, les sialoprotéines osseuses. Ils synthétisent également des glycoprotéines et des protéoglycanes qui fixent des ions calcium intervenant dans la minéralisation de la matrice osseuse et la régulation de la croissance des hydroxyapatites. Ils présentent également une activité

phosphatase alcaline, précoce, amorçant la minéralisation de la matrice extracellulaire [6].

Le tissu osseux nouvellement formé va se déposer sur ces derniers qui vont devenir des ostéocytes.

Ainsi, les ostéoblastes provenant de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses multipotentes peuvent être évalués par plusieurs marqueurs ostéogéniques plus ou moins précoces. Les principaux marqueurs ostéoblastiques ont été synthétisés sur Figure 3.

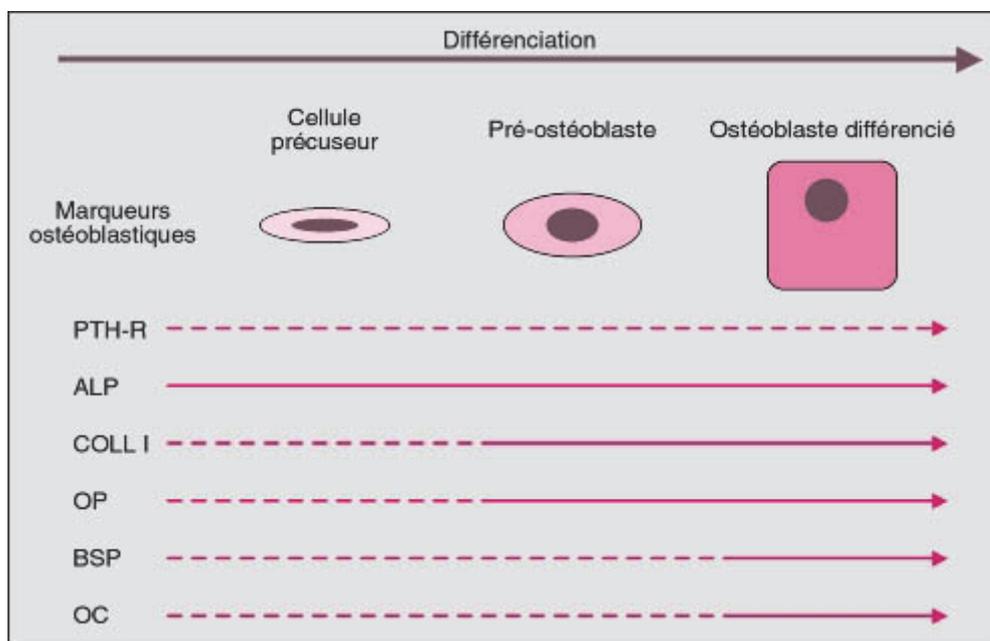


Figure 3 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique [6]

## .2. LA REPARATION OSSEUSE

Dans des conditions pathologiques, le tissu osseux possède un fort potentiel de réparation. Il se renouvelle dans des situations comme les fractures simples où il aboutit souvent à la réparation totale du tissu. Le tissu régénéré ne laisse pas de cicatrice et est souvent indiscernable de l'os sain. On parle de régénération *ad-integrum* (Figure 4).

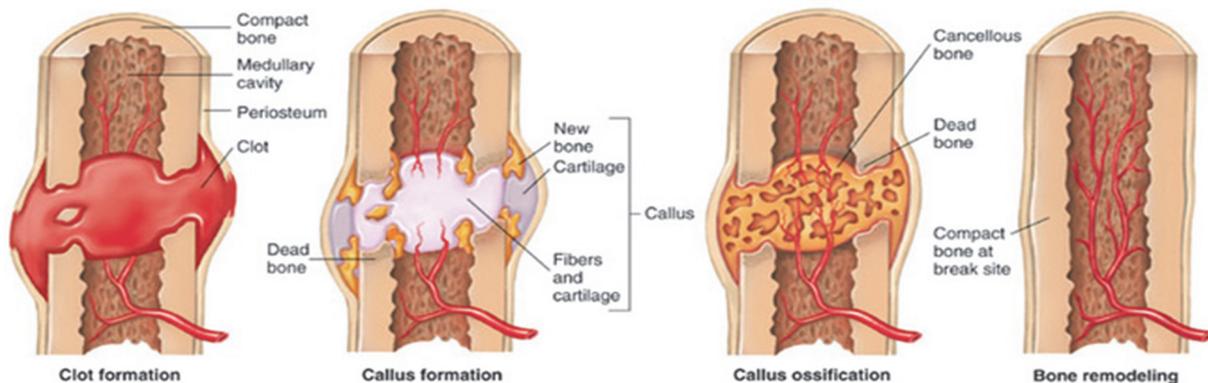


Figure 4 : La réparation osseuse [7]

En effet, lors d'une fracture simple, la réparation osseuse s'accompagne d'une cascade d'événements qu'on peut décrire en 3 principales étapes :

1. La déchirure des capillaires sanguins est à l'origine d'une réponse inflammatoire précoce. C'est une réaction de défense immunitaire qui a pour but le nettoyage du site. Un caillot se forme très rapidement. Différents intervenants comme les leucocytes, fibroblastes et monocytes infiltrent le site. Un tissu de granulation est alors développé. Une vasodilatation locale se produit qui a pour but l'évacuation des cellules mortes et des toxines, ainsi que l'apport et l'activation des éléments nécessaires à la cicatrisation tels que des molécules de signalisation (TNF- $\alpha$ , FGF, BMP, PPGF, VEGF..), nutriments, oxygène, et cellules [8].

Les pools de cellules souches mésenchymateuses situées au bord de la plaie vont coloniser le site, proliférer et se différencier en ostéoblastes matures permettant la régénération et la réparation du tissu osseux. Elles proviennent de quatre origines : la moelle osseuse, l'os cortical, le périoste, et les éléments tissulaires péri-osseux tels que la circulation sanguine ou les muscles adjacents [7].

2. A partir de 48h, c'est la phase de réparation. Les ostéoblastes, dérivés des cellules souches mésenchymateuses, sécrètent une matrice extracellulaire (substance ostéoïde fibreuse) au niveau du défaut. Ce néo-tissu osseux va progressivement se minéraliser entraînant la formation d'un cal osseux.
3. Environ 3 semaines après le traumatisme, c'est la phase de remodelage osseux. L'interface os-os va remanier son architecture afin que le nouvel os ne fasse qu'un avec le tissu osseux support. La durée et l'intensité des phénomènes associés à cette phase dépendent des contraintes mécaniques appliquées.

Dans des cas plus sévères, lorsque la taille du défaut est trop importante ou si des mouvements trop importants s'installent au niveau de la lésion, un tissu ostéoïde comble le défaut sans jamais se minéraliser <sup>[7]</sup>.

C'est dans le traitement de ces cas de défaut osseux de taille critique que les premières techniques d'autogreffes ont vu le jour, permettant au patient de régénérer partiellement l'os manquant, en utilisant un greffon osseux d'un autre site anatomique du patient. Cependant, ces interventions ont trouvé de nombreuses limites : la taille limitée du greffon et sa nécrose possible ou encore le préjudice esthétique et fonctionnel au niveau du site de prélèvement <sup>[9]</sup>.

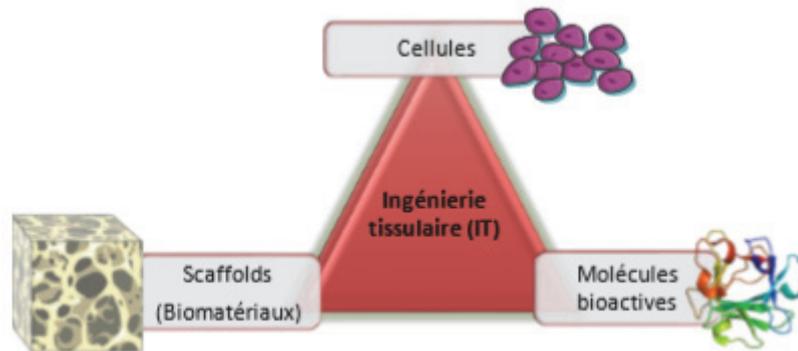
À la suite des échecs retrouvés sur les régénérations osseuses de ce type de défaut, d'autres techniques à partir de substituts osseux, seuls ou comprenant des facteurs de croissance ou des cellules osseuses, furent développées.

A partir de nos connaissances sur la biologie de la réparation et du développement osseux, l'ingénierie du tissu osseux a identifié certains aspects utiles à la réussite des chirurgies de régénération osseuse de taille critique <sup>[10]</sup> :

- ▶ L'utilisation de cellules souches pluri- ou multi-potentes,
- ▶ L'identification de gènes, facteurs de croissance, ou cascades de transduction qui médient la formation osseuse,
- ▶ Les interactions du greffon avec les tissus environnants,
- ▶ La promotion de la néovascularisation du tissu osseux nouvellement formé.

Ainsi, comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 5), les composants-clés pour la régénération osseuse au-delà d'un point critique, sont :

- ▶ Les biomatériaux,
- ▶ Les cellules,
- ▶ Les molécules de signalisation,
- ▶ La vascularisation.



**Figure 5 : Triade de l'ingénierie tissulaire <sup>[11]</sup>.**

# LE SUPPORT

---

Le support ou échafaudage représente l'environnement qui va permettre aux cellules différenciées de déposer un néo-tissu osseux qui sera entièrement intégré au tissu osseux de l'hôte. Il doit être stable pendant toute la phase de réparation osseuse.

Ils peuvent théoriquement être utilisés directement comme pièce de remplacement acellulaire, mais dans le cadre de défaut osseux de taille critique, leur utilisation en combinaison de cellules, souches ou ostéogéniques, ou des molécules de signalisation a été décrite dans le but d'améliorer ou d'accélérer la réparation osseuse.

## .1. PROPRIETES

Le support doit idéalement présenter des caractéristiques biologique et physique afin d'améliorer le potentiel ostéoinductif, angiogénique et les propriétés bioactives du greffon – tels que l'Interaction avec les cellules du site receveur (attachement, prolifération, différenciation) et l'Induction de la vascularisation [2].

Il doit ainsi posséder certaines **propriétés biologiques** :

- ▶ Il doit être biocompatible, c'est-à-dire qu'il ne doit pas interférer ou dégrader le milieu biologique dans lequel il est utilisé, biodégradable, pour permettre son remplacement par le nouveau tissu osseux, et perméable, pour favoriser les échanges nutritionnels et d'oxygène, la croissance cellulaire, la vascularisation et la minéralisation [1].
- ▶ Il doit aussi limiter les réactions inflammatoires chroniques, permettre l'adhésion et la rétention des cellules, et maintenir le phénotype cellulaire du site greffé.

Il lui faut aussi avoir certaines **propriétés physiques** :

Il doit fournir une résistance mécanique et une architecture proche de celle de l'os jusqu'à ce que le défaut soit régénéré. La topographie de surface micro- et nanométrique facilite la réparation osseuse <sup>[1]</sup>.

- ▶ La microporosité c'est-à-dire la taille des pores, et leurs interconnexions sont essentielles pour les propriétés ostéoconductrices du support <sup>[12]</sup>. Elle favorise la croissance et la migration cellulaire, le flux nutritif, la vascularisation, et une meilleure organisation spatiale pour la production d'une matrice extracellulaire. Les études <sup>[13]</sup> suggèrent qu'une taille des pores moyenne de 300µm permet une formation osseuse améliorée par rapport à des pores plus petits. Ils présentent une plus grande prolifération et différenciation ostéoblastique en raison d'une néovascularisation améliorée et d'un transport de masse d'oxygène et de nutriments facilités.
- ▶ La nanotopographie influe significativement l'ostéoinductivité du support. Des techniques, d'électro filage ou d'auto-assemblage moléculaire en nanotubes, simulent un réseau naturel des fibres de collagène sur l'échafaudage <sup>[14]</sup>. Elles permettent une augmentation de l'adhérence et de la prolifération des cellules, de l'activité de l'ALP, et une expression accrue des marqueurs de différenciation ostéoblastiques (RunX2, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse).

Actuellement, pour la régénération de défauts osseux de taille critique différents types de substituts osseux sont disponibles, on peut les classer en fonction de leur origine, à savoir les substituts osseux d'origine naturelle et d'origine synthétique.

## .2. SUBSTITUTS OSSEUX D'ORIGINE NATURELLE

### .2.1. Autogreffes

Les techniques d'autogreffe ont longtemps été considérées comme la référence en matière de régénération osseuse parce qu'elles sont histocompatibles, non immunogènes, et offrent des propriétés biologiques et mécaniques très intéressantes. Cependant, les résultats inconstants décrits dans le cadre de grands défauts ont fait émerger de nouveaux matériaux <sup>[15]</sup>.

Pour autant, ces substituts contiennent des cellules ostéoprogénitrices (ostéogénèse), des protéines morphogéniques osseuses (BMPs) et d'autres facteurs de croissances (ostéoinduction), et fournissent un support 3D poreux pour la régénération osseuse (ostéoconduction) puisque directement issues du patient. De plus, ces greffes osseuses sont vascularisées, ce qui améliore la gestion des défauts osseux de taille critique <sup>[16]</sup>.

Cependant, elles nécessitent un prélèvement sur le patient au niveau d'un site donneur et doivent être placées dans le même temps opératoire sur le site receveur, elles allongent donc le temps opératoire, créent une morbidité sur le site donneur, peuvent être à l'origine d'un préjudice esthétique, et sont disponibles en quantité limitée. Ceci implique qu'elles ne sont pas toujours réalisables pour des défauts osseux importants <sup>[20]</sup>.

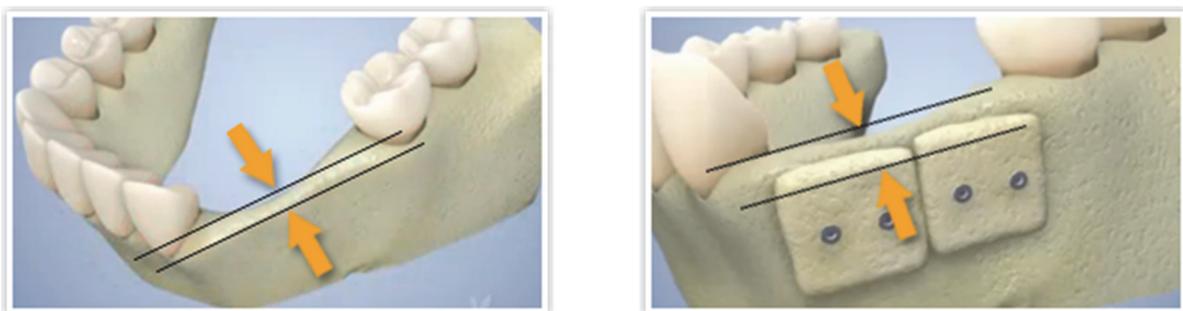


Figure 6 : Exemple de chirurgie pour augmentation osseuse <sup>[9]</sup>

Comme le montre le schéma ci-dessus (Figure 6), pour les augmentations transversales ou parfois verticales (en dehors de l'enveloppe osseuse) l'os cortical est découpé puis vissé à l'os résiduel.

L'os cortical immobilisé sert d'échafaudage naturel pour permettre le développement d'un nouvel os en son centre. L'os atrophique est percé pour augmenter l'afflux sanguin, les échanges et faciliter la cicatrisation. La lacune créée entre le greffon et l'os résiduel est comblée par de l'os autologue spongieux broyé, pouvant être combiné avec un apport d'un autre type de substitut osseux pour les plus gros défauts, réduisant ainsi la quantité de prélèvement autologue [17, 15].

## **.2.2. L'os allogénique**

L'os allogénique provient de donneurs de la même espèce. Il est disponible sous différentes formes (blocs usinés ou particuliers) et possède des propriétés ostéoinductives diminuées voire absentes et aucun composant cellulaire [18]. On distingue :

- ▶ L'os lyophilisé qui conserve les trames minérales et organiques ce qui lui conférerait des propriétés ostéoinductrices. Cependant ce type de substitut présente des risques d'immunoréactions ou de transmission d'agents infectieux.
- ▶ L'os déminéralisé qui permet la libération des protéines morphogéniques inductrices.
- ▶ L'os délipidé et déprotéinisé qui conserve seulement la trame minérale avec quelques résidus collagénique, et possède donc des propriétés ostéoconductrices.

L'intégration biologique des blocs est similaire aux greffons autogènes. Un coffrage avec un bloc cortico-spongieux est réalisé et la cavité est comblé avec de l'os particulier.

Ce matériau représente une alternative aux prélèvements osseux autologues. Il permet d'éviter des prélèvements osseux exo buccaux importants pour la reconstruction de défauts osseux critiques.

### **.2.3. L'os xénogénique**

L'os xénogénique provient d'une espèce animale différente de celle du receveur. En ce qui concerne les substituts disponibles pour l'homme, on retrouve principalement des substituts osseux d'origine bovine, porcine ou équine. De la même manière que pour l'os allogénique, ces substituts sont souvent déminéralisés et déprotéinés. Ils possèdent donc des propriétés ostéoconductrices.

Il est conditionné sous formes de particules, et est donc intéressant pour le comblement de défaut cloisonné. Les particules de 0,5 à 1 mm de diamètre présentent le meilleur potentiel ostéogénique *in vivo* [2].

## **.3. SUBSTITUTS OSSEUX SYNTHETIQUES**

Les substituts osseux synthétiques ont été développés car ils représentent une alternative aux substituts osseux d'origine naturelle en améliorant les propriétés physiques et biologiques du greffon et les réponses biologiques de l'hôte. De nombreux supports synthétiques ont démontré *in vitro* qu'ils favorisent la prolifération et la différenciation des cellules souches en ostéoblastes [19, 20].

Les premiers matériaux utilisés ont été les sulfates de calcium (plâtre) et les carbonates de calcium (issus de coraux), ainsi que les bioverres. Bien que ces deux derniers présentent des propriétés intéressantes, les substituts osseux à base de phosphates de calcium et de type hydrogels ont été développés par la suite présentant des propriétés biologiques encore améliorées. Dans le cadre de ce travail, ceux-ci sont uniquement présentés ci-dessous.

### **.3.1. Les substituts à base de phosphate de calcium**

Les phosphates de calcium sont présents en grande quantité dans les tissus minéralisés de l'organisme. C'est le cas des apatites, alors que d'autres phosphates de calcium peuvent en être les précurseurs au niveau biologique (phosphate tricalcique par exemple). C'est pourquoi ils ont été développés en tant que substituts sous forme de ciments et de céramiques denses ou poreuses.

Dans le cas des substituts de type supports, les céramiques seront plus appropriées. Ces matériaux possèdent une composition chimique similaire à la phase

minérale de l'os, et des modules élastiques et une résistance à la compression également proche à l'os cortical ou spongieux humain en fonction des formulations retrouvées [21].

Différentes présentations sont retrouvées, allant de bloc de volumes importants, d'autres plus réduits ou encore en granules ou poudres en fonction de l'indication clinique. Ce sont des matériaux bioactifs (à la différence de la zircone qui est inerte) qui permettent un nouveau dépôt osseux. Elles possèdent un grand potentiel de régénération osseuse et des propriétés ostéoinductrices démontrées dans plusieurs modèles animaux [21].

On retrouve notamment :

- ▶ Des phosphates pluri-calciques, comme le phosphate tricalcique en phase bêta ( $\beta$ -TCP).
- ▶ L'hydroxyapatite (HA), de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , qui est par ailleurs le constituant minéral majeur des tissus durs humains [6].
- ▶ Des substituts biphasiques de ces derniers, dites céramiques biphasées (BCP) qui sont un mélange en proportion variable d'hydroxyapatite et de  $\beta$ -TCP. Pendant de nombreuses années, le  $\beta$ -TCP a été utilisé seul ou en association avec des copeaux osseux autologues pour reconstruire le plancher du sinus ou faire des préservations d'alvéole après extraction [22]. Des études précliniques [21,23] ont montré que les céramiques TCP constituées de 20% d'HA et de 80% de  $\beta$ -TCP sont des matrices appropriées pour la culture de cellules souches mésenchymateuses in vitro et la formation osseuse in vivo. Par ailleurs il est à noter que les formulations biphasiques permettent également de moduler la cinétique de résorption du substitut et sa dissolution.

### **.3.2. Hydrogels**

Les hydrogels sont des structure 3D chargées en eau (>90%) et qui présentent des chaînes de polymères dans leurs matrices. Ils sont capables, avec les interactions des fluides corporels, d'adopter la topographie du défaut et de délivrer des agents bioactifs. De plus, ils sont non immunogènes et biodégradables.

On retrouve parmi les polymères les plus utilisés :

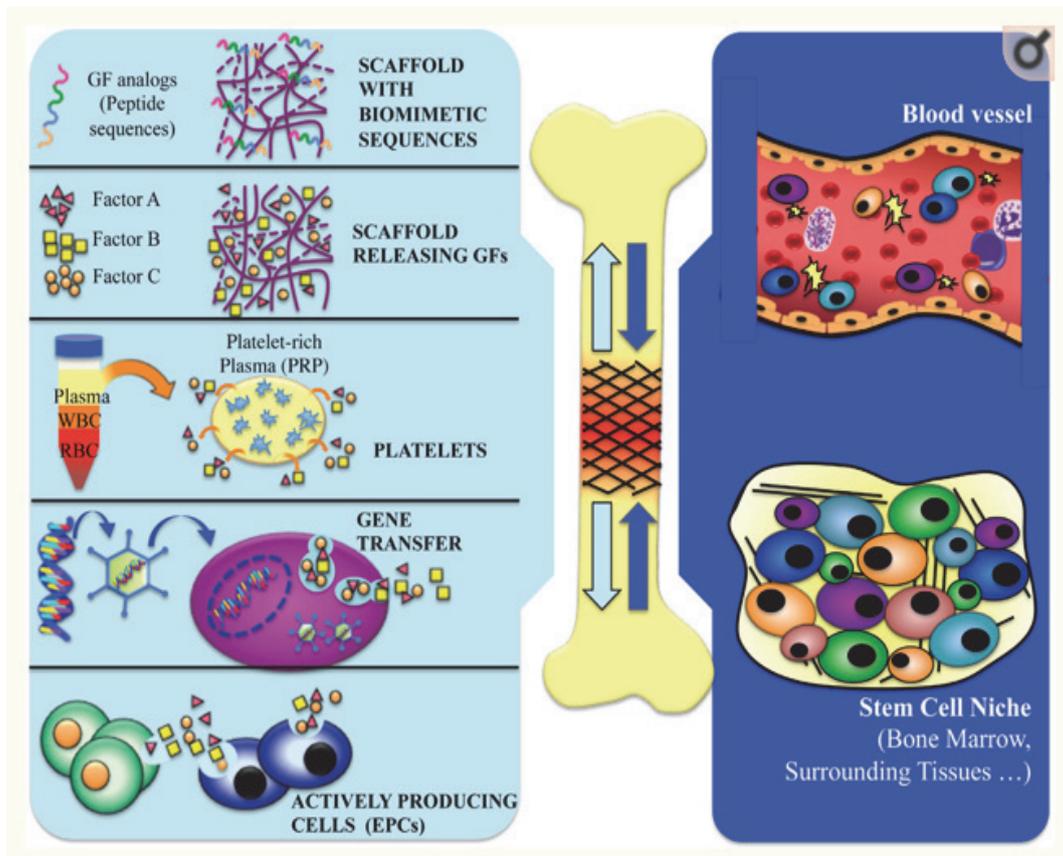
- ▶ Le collagène
- ▶ L'alginate
- ▶ Le chitosane

Le chitosane est un dérivé naturel dont la structure initiale est proche des glycosaminoglycanes présents naturellement dans la matrice extra cellulaire. Il est dégradé en oligosaccharides non toxiques. C'est un polymère biodégradable, et favorisant la prolifération cellulaire <sup>[24]</sup>. En effet, un hydrogel composé de polymères de glucose et d'une enzyme qui hydrolyse ce dernier permet de jouer un rôle significatif dans la survie cellulaire le temps qu'une néovascularisation du greffon se produise <sup>[25]</sup>.

#### .4. SUBSTITUTS OSSEUX COMPOSITES

De plus en plus d'études sont consacrées aux substituts osseux artificiels dotés de propriétés biologiques pour la réparation de défauts osseux de grande taille.

Ce sont des céramiques ou des hydrogels synthétiques auquel on peut y incorporer facteurs de croissance, peptides, polymères, cellules génétiquement modifiées, ou nanoparticules, pouvant améliorer la réponse de l'hôte <sup>[26]</sup>. Ces facteurs pouvant améliorer la régénération osseuse sont schématisés sur la Figure 7 ci-dessous.



**Figure 7 : Les facteurs implantés sur le site du défaut osseux influencent la réponse de l'hôte. Ils améliorent le recrutement cellulaire et la vascularisation, et ainsi la régénération osseuse [26]**

Un support libérant certains signaux morphogéniques (protéines osseuses, facteurs de croissance, plasma) améliore la migration des cellules souches de l'hôte vers le site greffé, la différenciation cellulaire vers le type phénotypiquement souhaitable et la néovascularisation [27, 11].

Par exemple, des études [28, 29] sur les rats et les lapins, ont montré que l'utilisation d'un peptide synthétique pro-inflammatoire TP508, améliore la régénération osseuse *in vivo* en activant les voies de signalisation de la réparation osseuse.

Plusieurs études [30] ont démontré chez le chien et d'autres modèles animaux, les effets positifs de l'activation de deux récepteurs de prostaglandine dans la guérison de défauts segmentaires de taille critique.

## **.4.1. Supports composites à base de céramique**

### **.4.1.1. Céramique et polymères**

Ces matériaux composites capitalisent les avantages de matériaux céramiques, et de divers polymères (acide lactique (PLA), acide lactique et glycolique (PLGA), collagène). Ils ont une bonne malléabilité, un pouvoir hémostatique grâce aux collagènes, et une biodégradation réglable. Cependant, ils présentent une faible résistance mécanique, comparable aux os spongieux humains <sup>[31]</sup>.

Leurs résultats ont démontré une formation osseuse améliorée *in vitro* et *in vivo*, supérieure aux résultats obtenus lorsqu'ils sont utilisés séparément <sup>[8]</sup>.

En utilisation directe, ils n'intéressent donc que les défauts cloisonnés. Mais, ils peuvent être utilisés dans le cadre d'ingénierie osseuse *in vitro* afin de promouvoir une ostéogénèse ou une angiogénèse <sup>[32]</sup>.

### **.4.1.2. Céramiques composites plus denses**

L'incorporation de bioverres, de nanotubes de carbone ou de particules métalliques ou d'alliages de magnésium affectent positivement les propriétés mécaniques les rendant proches des os corticaux humains <sup>[33]</sup>. En fonction de leur taille et de leur distribution, ces supports composites améliorent la minéralisation de la matrice osseuse.

## **.4.2. Hydrogels hybrides**

Les hydrogels peuvent être combinés avec des peptides pour former un réseau de nanofibres. Et, peuvent ensuite être hybridés avec un échafaudage poreux mécaniquement solide pour améliorer ses capacités de régénération osseuse (Figure 8).

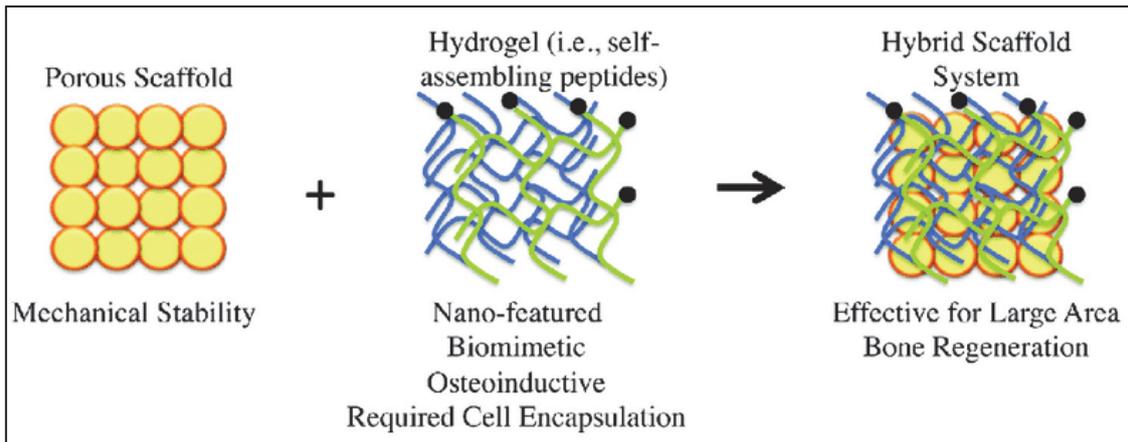


Figure 8 : Illustration d'un échafaudage hybride composé d'un composant mécaniquement solide et d'une phase d'hydrogel <sup>[34]</sup>

#### .4.3. Cellules génétiquement modifiées

L'incorporation de cellules génétiquement modifiées dans le support pourrait permettre de délivrer des protéines osseuses ou pro-inflammatoire directement au niveau du site de greffe, favorisant ainsi la régénération osseuse et la réponse de l'hôte <sup>[35]</sup>.

#### .5. APPORT DE CELLULES DANS LE SUPPORT

La présence de cellules osseuses en quantité suffisante directement sur le support au moment de l'implantation va permettre d'entamer rapidement le processus de réparation osseuse et d'orienter facilement le phénotype cellulaire des cellules souches que l'hôte va recruter et qui vont proliférer au niveau de la greffe.

Il est aussi possible, d'incorporer des cellules souches au moment de l'implantation qui vont se différencier en fonction de leur environnement <sup>[11]</sup>.

# CELLULES SOUCHES POUR LA REGENERATION OSSEUSE

---

On retrouve dans un organisme 2 types de cellules : les cellules souches et les cellules spécialisées. Une cellule souche est une cellule capable de se multiplier en gardant le même patrimoine génétique. C'est-à-dire qu'elle est capable en même temps de s'auto-renouveler et de donner naissance à des cellules différenciées (Figure 9).

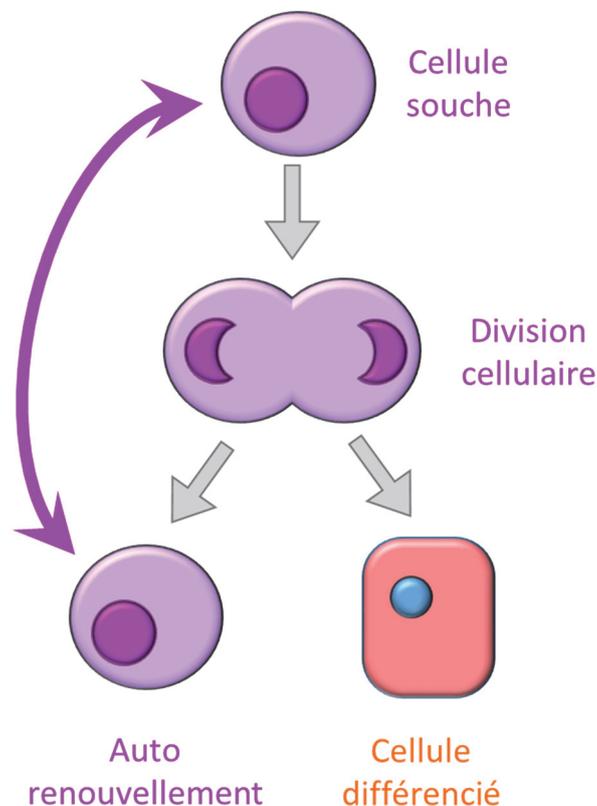


Figure 9 : Division cellulaire à partir d'une cellule souche.

Les cellules souches mésenchymateuses se retrouvent dans la majorité des tissus adultes où elles participent au renouvellement des tissus endommagés. Elles restent quiescentes dans des niches, et se divisent si elles sont activées par une perte cellulaire afin de maintenir une homéostasie tissulaire. Ces cellules présentent une déformabilité augmentée qui facilite leur migration à travers les tissus <sup>[36]</sup>.

Des cellules souches ont été isolées à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique et du cordon ombilical, de la membrane synoviale, de dents temporaires, de pulpe dentaire, des fluides amniotiques, du tissu adipeux, du cerveau, de la peau, du cœur, et des reins [37].

L'utilisation de cellules souches a récemment été reconnue comme une alternative prometteuse aux cellules spécialisées, en raison de leur potentiel prolifératif élevé et leur capacité à résister aux conditions de congélation, permettant une expansion *in vitro* pour obtenir un nombre cellulaire cliniquement pertinent [19].

## .6. CARACTERISTIQUES

Les cellules souches sont préservées dans les tissus à un stade indifférencié et sont capables d'auto-renouvellement. Elles sont identifiables par la présence ou l'absence de divers marqueurs membranaires de différenciation (clusters de différenciation, CD) [38].

Elles sont négatives pour le CD34, CD45, CD14, CD11a, CD19, et HLA-DR et positives pour le STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD146, et CD44. A ce jour, aucun marqueur unique n'a été mis en évidence. Cette absence de spécificité rend leur caractérisation et leur isolement plus difficiles [38].

Elles possèdent également des propriétés paracrines anti-inflammatoires et anti-apoptotiques [36]. Lorsqu'elles sont dans un environnement inflammatoire, elles produisent des cytokines anti-inflammatoires permettant de protéger les tissus environnants.

### .6.1. Les cellules souches allogénique

Les cellules souches possèdent des capacités immunosuppressives très intéressantes, notamment pour une utilisation allogénique lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser les cellules du patient par manque de biodisponibilité ou de temps. Ceci a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* [39].

Bartholomew et coll [39] ont procédé à une réaction lymphocytaire dans laquelle des cellules souches mésenchymateuses de babouin étaient co-cultivées avec des

leucocytes d'un sang périphérique allogénique. Ils ont pu observer que les cellules souches mésenchymateuses ont supprimé la prolifération des leucocytes.

Par ailleurs, des essais cliniques ont montré que les cellules souches mésenchymateuses allogéniques dérivées de la moelle osseuse peuvent être administrées en toute sécurité à l'homme sans susciter une réaction d'immunodéficience cliniquement pertinente [39].

Dans cette méta-analyse [39], Lorkeers et coll déclarent qu'aucune réaction immunitaire sérieuse n'a été signalée dans aucune des études et qu'il n'y a eu aucun impact sur la sécurité et l'efficacité.

Des études plus approfondies ont révélé que les cellules souches mésenchymateuses éludent le système immunitaire par le biais de multiples mécanismes :

- ▶ Absence de marqueurs de surface antigénique,
- ▶ Suppression de la prolifération des lymphocytes T,
- ▶ Inhibition de l'activation de cellules tueuses (NK),
- ▶ Arrêt de la maturation des plasmocytes (cellules B), et des cellules dendritiques.

La thérapie par cellules souches allogéniques offre l'avantage de pouvoir utiliser des cellules dérivées de jeunes donneurs sains, éliminant les comorbidités associées aux pathologies que peut présenter le patient receveur.

Ces cellules allogéniques sont cultivées et conservées dans des banques de cellules souches afin qu'elles soient disponibles rapidement.

## **.6.2. Identification in vitro des cellules souches mésenchymateuses**

La Société Internationale sur la Thérapie Cellulaire (ISCT) a établi des critères d'identification des cellules souches mésenchymateuses *in vitro* [40] :

- ▶ Posséder des capacités d'adhérer in vitro au plastique et former des amas de colonies cellulaires fibroblastiques. En effet, dans des conditions de culture la morphologie polygonale ou fusiforme de ces cellules leur confère cet aspect.

- ▶ Présenter de nombreuses intégrines jouant un rôle important dans leur mobilité cellulaire.
- ▶ Exprimer plus de 95% des marqueurs de surface des cellules conjonctives CD90, CD73 et CD105.
- ▶ Être négatives (moins de 2%) aux marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, aux molécules de surface HLA de classe II, et à ceux de la lignée hématopoïétique.
- ▶ Être capables, dans des conditions de cultures standard *in vitro*, de se différencier en lignée mésodermique c'est à dire au moins en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. Cette plasticité est notre base pour l'ingénierie tissulaire.

Les propriétés des cellules souches mésenchymateuses permettent de faire croître un nombre cliniquement pertinent de cellules *in vitro*, et de les spécialiser en cellules ostéogéniques.

Après implantation *in vivo*, elles améliorent les réponses de l'hôte pour la cicatrisation osseuse. C'est-à-dire que dans un premier temps, elles favorisent les molécules de signalisation pro-inflammatoire, la multiplication cellulaire et le recrutement cellulaire dans les tissus environnants. Dans un second temps, lorsque l'environnement du greffon est favorable, les cellules souches mésenchymateuses vont se différencier en ostéoblastes et cellules endothéliales afin de permettre respectivement une néoformation osseuse et une vascularisation indispensable à celle-ci <sup>[41]</sup>.

Cependant, les cellules souches mésenchymateuses présentent des potentialités variables selon l'âge, l'état de santé général du patient, et leurs sources de prélèvement. En effet, elles diffèrent dans leur potentiel de différenciation et dans leur profil d'expression génique. Cette différence doit être prise en considération lors du choix d'une source cellulaire <sup>[42]</sup>.

## .7. SOURCES

De nombreuses sources sont disponibles pour l'obtention de cellules souches chez l'homme, cependant des impératifs ont été définis pour guider le choix de la source, notamment dans le cadre du développement de substituts osseux <sup>[36]</sup> :

- ▶ La possibilité d'utiliser des cellules autologues ;
- ▶ La disponibilité et la facilité de récolte du tissu source avec une morbidité minimale ;
- ▶ Le temps et le prix du prélèvement ;
- ▶ La reproductibilité de l'isolation cellulaire et des protocoles de purification ;
- ▶ Les caractéristiques et l'homogénéité des populations cellulaires isolées ;
- ▶ La possibilité d'une expansion cellulaire *in vitro* ;
- ▶ Le potentiel de différenciation en cellule ostéogénique ;
- ▶ La maintenance du phénotype ou du potentiel de différenciation après implantation *in vivo* ;
- ▶ La sécurité des cellules *in vivo* ;
- ▶ La possibilité d'automatiser les protocoles de culture cellulaire ;
- ▶ Le développement de mesures de contrôle qualité pour les cellules et la génération de tissus.

Ainsi, différentes sources sont disponibles pour la régénération osseuse, d'une part des cellules souches intra-orales et d'autre part des cellules souches extra-orales.

### .7.1. Les cellules souches intra-orales

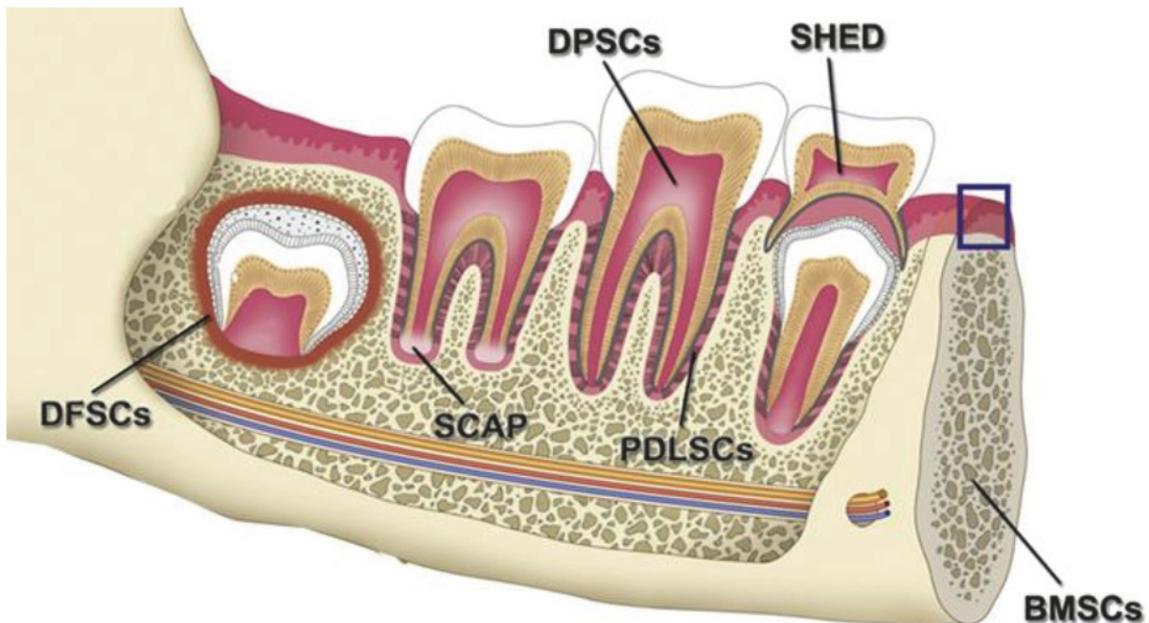


Figure 10 : Localisation des cellules souches dentaires <sup>[43]</sup>

De façon schématique, ces cellules souches, synthétisées sur Figure 10, peuvent être classées en familles :

- ▶ de type pulpaire, comprenant les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs : Dental Pulp Stem Cells), des dents de lait exfoliées (SHED : Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth) et de la papille apicale (SCAP : Stem Cell from Apical Papilla).
- ▶ de type parodontal, avec les cellules progénitrices du follicule dentaire (DFPCs : Dental Follicle Precurseurs Cells), les cellules souches ligamentaire (PDLSCs : PerioDontal Ligament Stem Cells) et gingivales (GSCs : Gum Stem Cells).
- ▶ de type osseux, avec les cellules souches mésenchymateuse de la moelle osseuse des maxillaires (BMMSCs : Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells), et les progéniteurs mésenchymateux du périoste (PSCs : Periosteum Stem Cells).

### .7.1.1. Les cellules souches pulpaire

Elles ont été découvertes en 1990, par Fitzgerald, lors de ses travaux de recherche sur les cellules de type fibroblastiques. Cependant, c'est Gronthos et son équipe qui furent les premiers à les avoir identifiées et nommées en tant que cellules souches de la pulpe dentaire, après une étude comparative avec des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse.

Les pulpes issues de dents saines ou de dents incluses sont des sources potentielles de cellules souches de la pulpe dentaire. Cependant, il est nécessaire de noter que la pulpe se rétracte avec les années ou présente parfois des signes de dégénérescence. Ainsi les dents cariées ou issues de patients d'âge avancé ne sont pas à utiliser.

Elles représentent un réservoir important et accessible de cellules souches adultes et possèdent un potentiel thérapeutique similaire à celui des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse.

Les pulpes sont généralement extraites de dents définitives incluses, sous muqueuses afin de réduire au maximum les risques de contaminations bactériennes. Le praticien devra conserver la dent intacte et entière. Après extraction, la dent sera nettoyée puis conservée dans une solution stérile d'antibiotiques (pénicillines et streptomycines). Le tout sera conditionné et acheminé au laboratoire de recherche ou de bio-banque.



Figure 11 : Procédé d'extraction de la pulpe dentaire <sup>[43]</sup>

La dent est ensuite coupée à l'aide d'un disque diamanté à la jonction émail/cément, pour récupérer la pulpe. Il est à noter que la production de chaleur et de contraintes mécaniques risque d'endommager une partie de la pulpe. Enfin, la pulpe est décontaminée, découpée en fragments de 0,5 à 2 mm<sup>3</sup>, et digérée à l'aide d'enzymes, permettant la libération des cellules et la destruction des structures extracellulaires.

Les cellules souches de la pulpe dentaire sont ensuite isolées soit par sélection de colonies après multiplication, soit par adhésion au plastique, soit par une méthode d'isolement immuno-magnétique à l'aide d'anticorps anti-STRO-1 [44].

Les cellules souches de la pulpe dentaire sont fortement prolifératives et affichent une activité immunosuppressive typique des cellules souches mésenchymateuses [43].

*In vitro*, le potentiel de différenciation ostéogénique de ces dernières a été démontré et implique l'administration d'un milieu ostéogénique.

*In vivo*, en fonction du lieu d'implantation, elles se différencient en odontoblastes, ostéoblastes ou chondrocytes pour produire respectivement de la dentine, de l'os ou du cartilage.

Par exemple, dans un rapport d'études [26] : La transplantation de cellules souches pulpaire seules dans des défauts osseux de rats a généré des tissus osseux fonctionnels contenant des ostéocytes. D'autre part, l'implantation de cellules souches de pulpe dentaire autologue de lapin sur un support composite céramique/PLGA implanté en sous-cutanée, a formé un tissu hautement minéralisé.

#### .7.1.2. Les cellules souches de dents lactéales

Ces cellules souches multipotentes post-natales peuvent être facilement isolées et cultivées *ex vivo*. Leur récupération s'effectue de la même manière à partir d'un tissu pulpaire caméral de dents temporaires. Il est possible de conserver ces cellules dans une bio-banque.

Elles se distinguent d'autres types de cellules souches par <sup>[42]</sup> :

- ▶ Un plus grand potentiel de prolifération par rapport aux cellules souches de la pulpe dentaire adulte,
- ▶ Une signature pro-angiogénique plus prononcée que d'autres cellules souches mésenchymateuses comme les cellules souches adipeuses,
- ▶ Lors d'une implantation *in vivo*, elles sont capables de se différencier en cellules ostéogéniques. De plus, elles possèdent un fort potentiel pour le recrutement des cellules ostéogéniques de l'hôte, et l'induction de la formation osseuse.

#### .7.1.3. Les cellules progénitrices du follicule dentaire

Les cellules progénitrices du follicule dentaire peuvent être isolées à partir de dents de sagesse incluses ou à l'état de germe, rendant cette source réaliste en termes d'accessibilité.

*In vivo*, le follicule dentaire contient des cellules souches capables de former le parodonte, à savoir le ligament parodontal, le ciment et l'os alvéolaire.

*In vitro*, elles peuvent se différencier en ostéoblastes, cémentoblastes, chondrocytes et adipocytes, myoblastes et neurones lors d'une mise en culture appropriée.

	Différenciation ostéoblastique <i>in vitro</i>	Formation osseuse <i>in vitro</i>
Cellules souches de la pulpe dentaire	+	+
Cellules souches de la pulpe de dents temporaires	+	+
Cellules souches du ligament dentaire	+	+
Cellules souches du follicule dentaire	+	+
Cellules souches de la papille apicale	+	-
Cellules souches de la moelle osseuse	+	+

**Tableau 1 : Différenciation ostéoblastique des cellules souches intra-orale <sup>[45]</sup>**

Le Tableau 1 nous montre qu'*in vitro*, les cellules souches intra-orales sont toutes capables de se différencier en ostéoblaste grâce au milieu de culture.

*In vivo*, la majorité des cellules souches dentaires peuvent former de l'os naturellement.

Ceci montre le fort potentiel ostéogénique de ces cellules souches. Cependant, il n'existe que très peu d'étude clinique de régénération osseuse à partir de ces sources.

## **.7.2. Les cellules souches extra-orales**

Les cellules souches de la moelle osseuse (BM-MSCs : Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) et les cellules souches adipeuses (ASCs : Adipose Stem Cells) sont les cellules mésenchymateuses d'origine extra-orale les plus étudiées.

### **.7.2.1. Populations de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse**

Leur présence au sein de la moelle osseuse a été mise en évidence par Friedenstein en 1974. Elles furent la première source de cellules progénitrices utilisées pour les régénérations faciales.

La moelle osseuse est depuis longtemps reconnue comme une source de cellules progénitrices/souches mésenchymateuses multipotentes avec potentiel de réparation osseuse [46]. Le micro-environnement de la moelle osseuse constitue la niche la plus utilisée de cellules souches mésenchymateuses du corps humain.

L'aspiration de moelle osseuse (fréquemment issue de la crête iliaque pour des raisons de disponibilité) est une technique hautement invasive. Les concentrés d'aspirats de moelle osseuse contiennent un mélange de cellules souches mésenchymateuses, de cellules progénitrices endothéliales, de cellules souches hématopoïétiques, de plaquettes, de lymphocytes, et de granulocytes. Chacun de ces composants joue un rôle dans le processus de régénération osseuse [47].

Le prélèvement permet de ne récupérer qu'un nombre très réduit de cellules souches mésenchymateuses. La proportion de cellules indifférenciées parmi les cellules de moelle osseuse est de 2,3%, et parmi ces cellules indifférenciées seulement 10% sont des cellules souches [48]. Elles nécessitent donc une expansion cellulaire si l'on souhaite isoler ces cellules souches mésenchymateuses.

Les chercheurs ont observé une diminution du nombre de ces cellules ainsi que de leurs capacités de prolifération et de différenciation avec l'âge des patients.

Dans des conditions de culture *in vitro*, statique ou dynamique, les études soutiennent que les cellules souches dérivées de moelle osseuse humaine ont un potentiel ostéogénique supérieur à celui des cellules souches adipeuses humaines [49].

- ▶ Zhang et coll. ontensemencé des cellules souches adipeuses humaines et des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine sur un support tridimensionnel composite à base de polycaprolactone (PLC) et de phosphate tricalcique et les ont cultivées dans des milieux ostéo-inducteurs. Ils ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine présentaient un potentiel ostéogénique supérieur notamment par davantage de production de calcium et une expression plus élevée des gènes ostéogéniques par rapport aux cellules souches adipeuses humaines.
- ▶ Les stimuli mécaniques sont également connus pour réguler l'ostéogénèse des cellules souches. Park et coll ont démontré que la compression hydraulique augmente significativement l'ostéogénèse des cellules souches

mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse humaine, par rapport aux cellules souches adipeuses. Ceci a été évalué par une augmentation de la production de matrice extracellulaire (os, sialoprotéine, ostéopontine, collagène de type I) et une augmentation de l'expression des gènes spécifiques ostéogéniques.

Ces cellules ont été utilisées dans plusieurs études cliniques et précliniques [50, 51, 52, 53, 54] impliquant la transplantation de substituts osseux avec des cellules souches indifférenciées, ou induites en lignée ostéogénique.

#### .7.2.2. Populations de cellules stromales dérivées du tissu adipeux

Le tissu adipeux est une source abondante de cellules progénitrices/souches mésenchymateuses autologue. Il est facilement accessible et relativement simple à récolter (faible morbidité liée à son prélèvement) et très abondant dans l'organisme (10 à 20% du poids corporel d'un l'homme adulte).

Pour isoler les populations de cellules stromales dérivées du tissu adipeux, on utilise les dépôts adipeux sous-cutanés avec une procédure peu invasive, la lipoaspiration.

L'isolement des cellules souches adipeuses inclue la centrifugation du lipo-aspirat, la digestion de sa matrice par des enzymes collagénases. Ainsi, les cellules souches seront facilement accessibles par adhérence au plastique [55].

La fréquence des cellules souches dans le tissu adipeux est de 100 à 500 fois supérieure à celle des cellules souches dans la moelle osseuse [26]. La disponibilité de cette source cellulaire évite une congélation relativement coûteuse.

Cette source quasi inépuisable, permet aussi une utilisation directement après purification. Il est possible de préparer des produits osseux directement à partir des cellules souches isolées. La mise en œuvre d'une greffe osseuse en une étape est attrayante. Dans cette approche, la récolte tissulaire, l'isolement cellulaire, l'ensemencement cellulaire sur un support et son implantation pourraient être réalisés en quelques heures, sans culture cellulaire *ex vivo*.

Les cellules souches adipeuses présentent un fort potentiel ostéogénique, une capacité proliférative plus élevée et de plus faibles niveaux de sénescence que les cellules souches dérivées de la moelle osseuse [56, 49].

- ▶ Monaco et coll. [49] ont mené une étude sur les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse de porc. Il a démontré que lors de la différenciation ostéogénique tardive, les cellules souches adipeuses avaient une meilleure capacité d'angiogénèse par rapport aux cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse. L'angiogénèse améliore la survie des cellules souches, mais est aussi indispensable pour le processus d'ostéogénèse.

De plus, plusieurs études [57, 53, 58] rapportent l'utilisation clinique et préclinique de ces cellules pour la préparation de substituts osseux :

- ▶ Par exemple, Muller et coll. ont démontré la formation de tissus vascularisés avec une coloration positive de la sialoprotéine osseuse et de l'ostéocalcine 8 semaines après l'implantation de cellules souches adipeuses dans un défaut important de souris 3 heures après la récolte.
- ▶ Pieri et son équipe ont eux aussi utilisé des cellules souches adipeuses autologues lors d'une régénération osseuse orofaciale et mise en place d'implants sur le lapin.

### **.7.3. Cellules souches induites par reprogrammation (ou cellules pluripotentes induites)**

Les cellules souches autologues ne peuvent pas toujours être utilisées.

En 2006, un chercheur japonais, Shinya Yamanaka, a réussi à reprogrammer une cellule différenciée en une cellule souche induite via l'induction d'une expression « forcée » de 4 gènes spécifiques.

Ces cellules souches induites ont d'abord été produites à partir de fibroblastes de souris [59]. En 2007, il réussit à convertir des cellules somatiques humaines grâce à une méthode similaire, l'administration rétrovirale de quatre facteurs de

transcription <sup>[60]</sup>. Ces cellules souches humaines induites possèdent la morphologie, l'expression génique, les antigènes de surface, le potentiel de différenciation *in vitro* et la pluripotence des cellules souches embryonnaires humaines. Yamanaka a reçu en 2012 le prix Nobel de Médecine.

En septembre 2014, a eu lieu le premier essai thérapeutique chez l'homme, mais les études cliniques utilisant des cellules souches induites prennent du temps. Le problème est que ces cellules ont tendance à être instables et à dégénérer en cellules cancéreuses. Il apparaît primordial de développer des méthodes d'induction non virales. Par ailleurs, la mémoire épigénétique inhérente à la cellule de départ peut influencer le potentiel de différenciation et la fonctionnalité *in vivo*. Des recherches supplémentaires dans ce domaine sont nécessaires afin de déterminer les meilleures conditions pour la génération de cellules souches pluripotentes induites <sup>[61]</sup>.

## ETUDES *IN VITRO*

---

Bien que les cellules souches mésenchymateuses puissent sembler une excellente option thérapeutique pour améliorer la régénération osseuse d'un défaut de taille critique, plusieurs problèmes liés à leur utilisation ont été identifiés <sup>[62]</sup> :

- ▶ Leur doublement de population (passage cellulaire) excessif est associé à leur sénescence,
- ▶ Le potentiel de différenciation ostéogénique *in vitro* et l'efficacité de la formation osseuse *in vivo* diminuent significativement avec l'âge du donneur,
- ▶ Il existe un manque de connaissance sur les marqueurs communs des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de sources différentes.

Le traitement des cellules souches mésenchymateuses pour une utilisation clinique autologue est schématisé sur Figure 12.

L'isolement, l'expansion et l'implantation des cellules souches mésenchymateuses doivent être menés dans le cadre de bonnes pratiques de fabrication, parfois à des endroits distincts <sup>[63]</sup>.

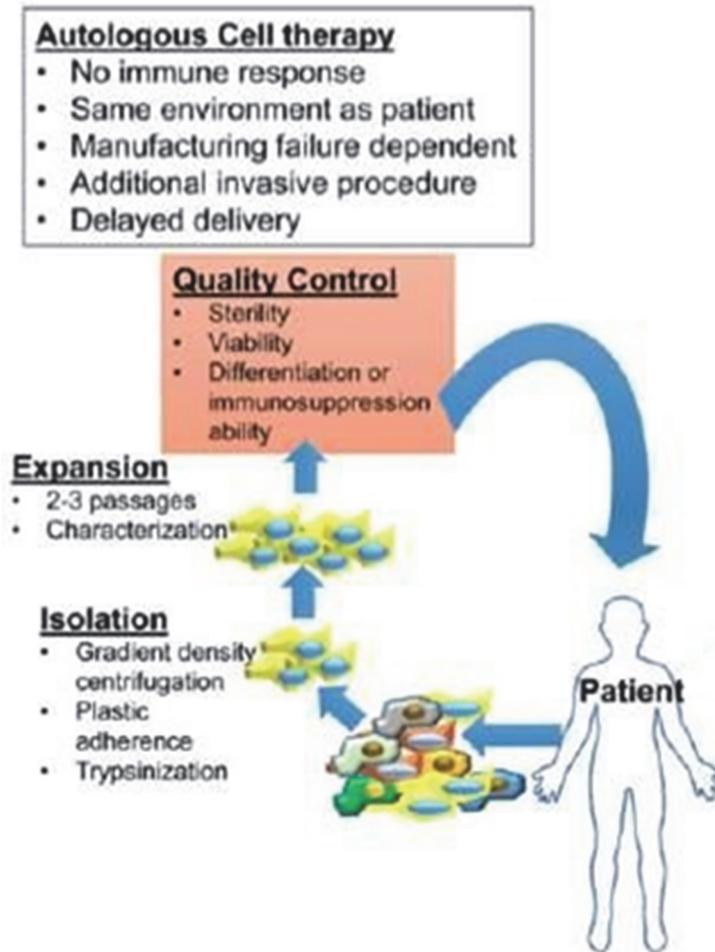


Figure 12 : Représentation schématique du traitement des cellules souches mésenchymateuses pour une utilisation autologue [39]

## 1. EXPANSION CELLULAIRE

Afin d'éviter de trop importantes lésions au niveau du site donneur, la quantité de tissu récolté pour l'isolation cellulaire doit être minimale.

C'est pourquoi après isolation, dès que le nombre de cellules souches mésenchymateuses obtenues n'est pas pertinent pour une utilisation clinique, on réalise des « passages en culture », c'est à dire qu'on réalise des sous-cultures afin d'accroître nombre de cellules souches indifférenciées disponibles. Pour cela, les cellules souches isolées sont étendues in vitro. Dès qu'elles sont sur le point de remplir toute la surface de culture, elles sont collectées et cultivées à nouveau. Un passage peut durer des semaines en fonction des conditions de cultures ou de l'organisme du donneur (état de santé, âge) [62].

Dans la majorité des cas, pour un usage clinique, les cellules souches mésenchymateuses sont étendues pour 2 à 5 passages au maximum. Environ 4 à 6 semaines sont nécessaires pour l'expansion cellulaire avant le traitement possible du patient. On utilise majoritairement du sérum fœtal bovin pour l'expansion *in vitro* de cellules souches pour induire une régénération osseuse [64]. Mais il présente un risque de transmission de maladies zoonotiques ou à prions, qui peuvent induire une réponse immunitaire déclenchée par ces protéines xénogéniques. C'est pourquoi, l'option d'utiliser un sérum humain ou synthétique avec des facteurs de croissance ou des milieux sans sérum est explorée comme alternative [65].

La variabilité de la formation des colonies et les conditions de culture nécessaires pour maintenir la capacité proliférative des cellules souches mésenchymateuses ont conduit à la création d'une lignée de cellules souches humaines allogéniques universelles « prêtes à l'emploi » [39]. Bien qu'elles présentent un phénotype faiblement immunogénique, l'utilisation de médicament immunosuppresseur semble nécessaire.

## .2. DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Lorsqu'on obtient un nombre cliniquement pertinent de cellules souches mésenchymateuses, soit on les utilise directement en les implantant directement sur un support ostéoinducteur, soit on utilise un milieu ostéogénique pour induire une différenciation ostéoblastique de ces cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses prédifférenciées en lignée ostéogénique avant implantation accélèrent la réparation des défauts et l'ostéointégration éventuelle du substitut osseux *in vivo*, en fournissant une population ostéogénique plus mature, capable de former de l'os immédiatement [66].

Plusieurs études [52, 58, 67, 68, 69, 70] ont démontré qu'il était possible d'établir un système reproductible pour la différenciation ostéogénique *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses humaines.

Ce milieu comprend du sérum fœtal de veau, avec :

- ✓ Du  **$\beta$ -glycérophosphate** qui induit la formation de collagène et la minéralisation.
- ✓ De l'**acide ascorbique** (vitamine C) qui est utilisé dans la synthèse du collagène.
- ✓ Des **glucocorticoïdes**, qui réduisent la prolifération cellulaire et stimulent la différenciation cellulaire. Plus particulièrement, la dexaméthasone qui est un inducteur ostéogénique de faible poids moléculaire, de puissance élevée, et de longue durée d'action [52, 59].

Cette étape d'ostéoinduction peut être améliorée par la présence de facteurs de croissance (comme l'application brève de BMP-2) ou de nanoparticules d'hydroxyapatite [71, 72, 73]. La multiplication de facteurs de croissance osseux favorise l'ostéogénèse et active d'autres protéines responsables de la formation osseuse [72]. Cependant, il faut optimiser et maîtriser la dose requise pour une cicatrisation prédictible, déterminer un transporteur approprié, et développer des formules abordables.

### .3. FORMATION D'ORGANOÏDE OSSEUX *EX VIVO*

Les cellules souches ostéogéniques sont combinées à un support tri-dimensionnel rugueux, plus ou moins ostéoinductif, et pourront former un organoïde osseux *ex vivo* ou être directement implanté.

Dans une étude [74], voulant reconstruire des os d'ingénierie tissulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse de lapin sur de l'os partiellement déprotéiné provenant de porc frais, les auteurs ont conclu que la meilleure densité *in vitro* d'ensemencement de cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse était de  $5 \cdot 10^6$  cellules par mL, et que le moment optimal pour la transplantation *in vivo* se situait le 6<sup>ème</sup> jour.

Dans une autre étude [75], l'utilisation de supports de collagène présentant une porosité contrôlée, une interconnexion et une résistance mécanique élevée, hybridés à des nanoparticules de phosphate de calcium à libération contrôlée de dexaméthasone, a montré une bonne biocompatibilité et différenciation ostéogénique

de cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse humaine en culture tridimensionnelle (Figure 13).

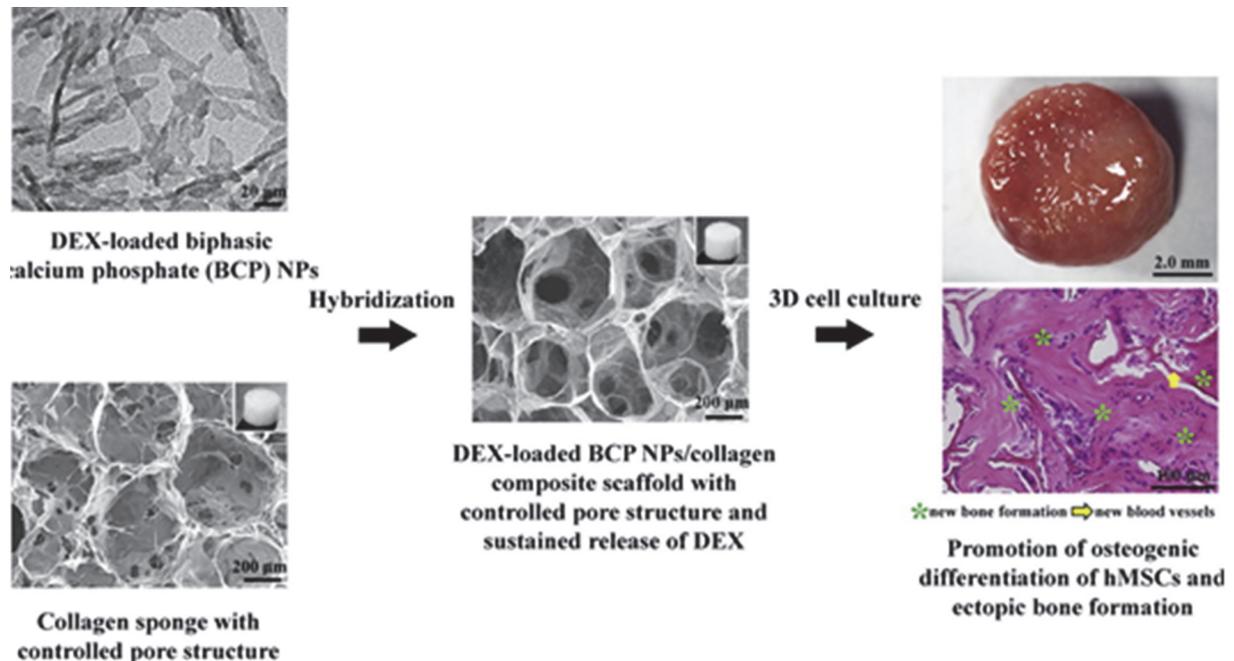
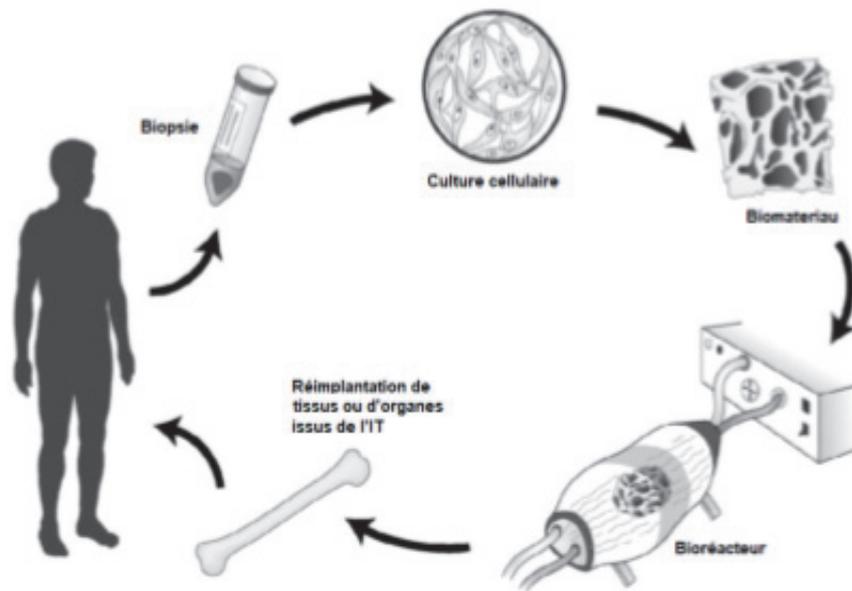


Figure 13 : Culture cellulaire sur support ostéoinductif 3D [75]

L'implantation sous-cutanée de ces matrices sur des souris a démontré qu'elles facilitaient la régénération osseuse des tissus osseux ectopiques. Ils exercent des effets synergiques sur la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses présentes sur le site greffé et sur la formation de vaisseaux sanguins dans l'os régénéré. Ces supports présentent un fort potentiel pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

Pour la formation d'un organoïde osseux *in vitro*, l'utilisation de systèmes de culture dans un bioréacteur permet une fabrication automatisée et standardisée de tissus avec des coûts de production réduits pour construire des structures cellulaires tridimensionnelles (Figure 15). Ces dispositifs permettent d'obtenir un développement homogène des tissus osseux à des tailles cliniquement pertinentes de l'ordre du millimètre et au-delà [24].

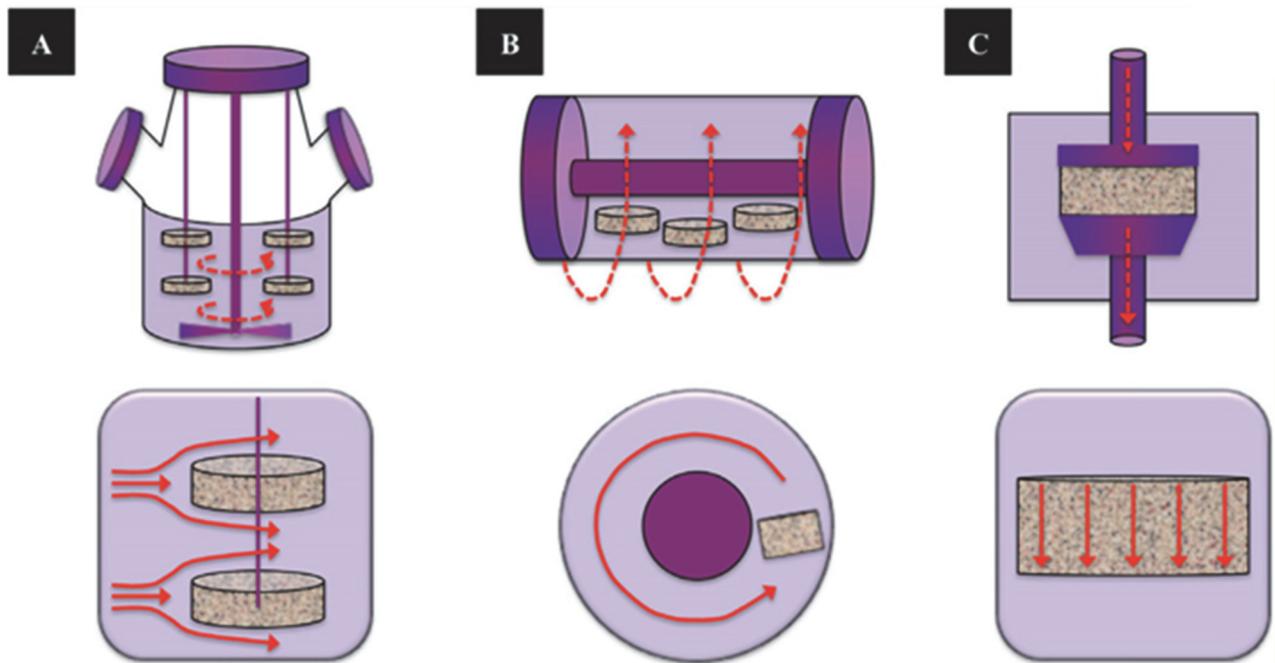


**Figure 14 : Etapes fondamentales de la formation osseuse in vitro** [24].

Les bioréacteurs permettent une perfusion des nutriments tout au long de la construction et une formation osseuse améliorée *in vitro*.

Plusieurs types, représentés Figure 15, ont été étudiés à des fins d'ingénierie tissulaire osseuse :

- ▶ Bioréacteurs par flacons agités,
- ▶ Bioréacteurs rotatifs,
- ▶ Bioréacteurs de perfusion.



*Les flèches rouges montrent le mouvement du milieu de culture obtenu.  
Bioréacteur (A) Par flacon agité, (B) rotatif, et (C) de perfusion.*

**Figure 15 : Illustration schématique des bioréacteurs les plus couramment utilisés [76]**

Le système de bioréacteur par flacons agités est plus performant que la culture statique. Il y a une augmentation de la prolifération des cellules ostéogéniques, de l'expression des marqueurs ostéoblastiques, et de la minéralisation par rapport à la culture statique. Cependant, la couche cellulaire superficielle est dense et entrave l'apport en oxygène et en nutriments dans les cellules résidant en profondeur.

Dans le système rotatif, les échafaudages cellulaires sont en suspension et reçoivent un flux laminaire constant, ces échafaudages grandissent de manière concentrique, mais sont limités par leur densité. Si celle-ci est plus importante que l'eau ces supports cellulaires vont tomber au centre du bioréacteur.

Les bioréacteurs à base de perfusion continue permettent le transport de masse, nutriments et oxygène dans tout l'échafaudage. La suspension cellulaire circule à travers les pores de l'échafaudage, ce qui permet un dépôt cellulaire dans toute la construction. Ces constructions montrent une augmentation de la distribution des cellules ostéogéniques, de la prolifération, de la différenciation, et du dépôt de la matrice extra cellulaire minéralisée, et de la densité dans l'ensemble de l'échafaudage [49]. Les bioréacteurs de perfusion permettent une meilleure uniformité

de distribution cellulaire et une efficacité de formation osseuse plus élevée. Ils semblent plus pertinents pour la reconstruction d'organoïde osseux de grande taille.

Dans une étude <sup>[76]</sup>, il a été comparé la durée de culture de cellules souches mésenchymateuses humaines sous perfusion sur la formation osseuse *in vivo*.

Après 7 jours sous perfusion, on a constaté une augmentation de la néovascularisation par rapport à celles cultivées pendant 1 jour.

Après 14 jours de perfusion, on a observé 8 semaines après implantation, un plus grand volume osseux, une densité minérale, et une présence de collagène et de marqueurs ostéoblastiques plus élevé par rapport aux échafaudages sous perfusion pendant 7 jours.

Ces données démontrent que la culture de cellules souches mésenchymateuses humaines sous perfusion pendant au moins 14 jours *in vitro* améliore la quantité et la qualité de la formation osseuse *in vivo*.

Bien que les bioréacteurs soient un outil efficace pour améliorer la formation osseuse, de bonnes pratiques de fabrication sont nécessaires avant d'être considérées comme cliniquement applicables. La conception de bioréacteurs qui accueillent l'ensemencement cellulaire, l'expansion *in vitro*, et la culture de perfusion sont nécessaires pour plus d'efficacité. Il faudra aussi réduire les risques de sécurité associés à la manutention et aux transferts de constructions entre des bioréacteurs distincts pour la production d'une construction osseuse cliniquement pertinente.

# ETUDES *IN VIVO*

## .1. SUR L'ANIMAL

Les études pré-cliniques sur les modèles animaux permettent de tester des supports innovants, différentes sources de cellules souches, de les combiner avec des signaux moléculaires, et d'analyser la réponse *in vivo*.

### .1.1. Etudes sur les petits mammifères (souris, rats)

#### .1.1.1. Etudes avec cellules souches xénogènes

Dans une étude <sup>[51]</sup> sur les souris, des cellules souches mésenchymateuses xénogènes dérivées de moelle osseuse de donneur humains, ont été incorporées 1 heure dans des granules de phosphate de calcium biphasique (BCP) (hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP) (Figure 16), puis implantées dans des défauts osseux crâniens de taille critique.

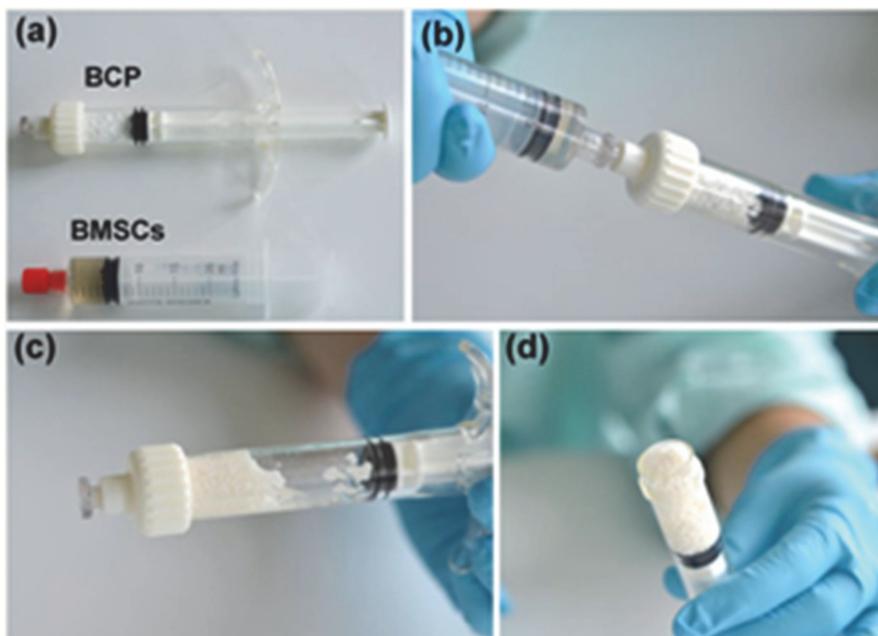


Figure 16 : Seringues stériles contenant 100 millions cellules stromales de la moelle osseuse humaine mélangées avec du phosphate de calcium biphasique (BCP) <sup>[51]</sup>

La viabilité et la distribution des cellules humaines implantées ont été évaluées Figure 17, ainsi que la capacité de la greffe à régénérer l'os manquant.

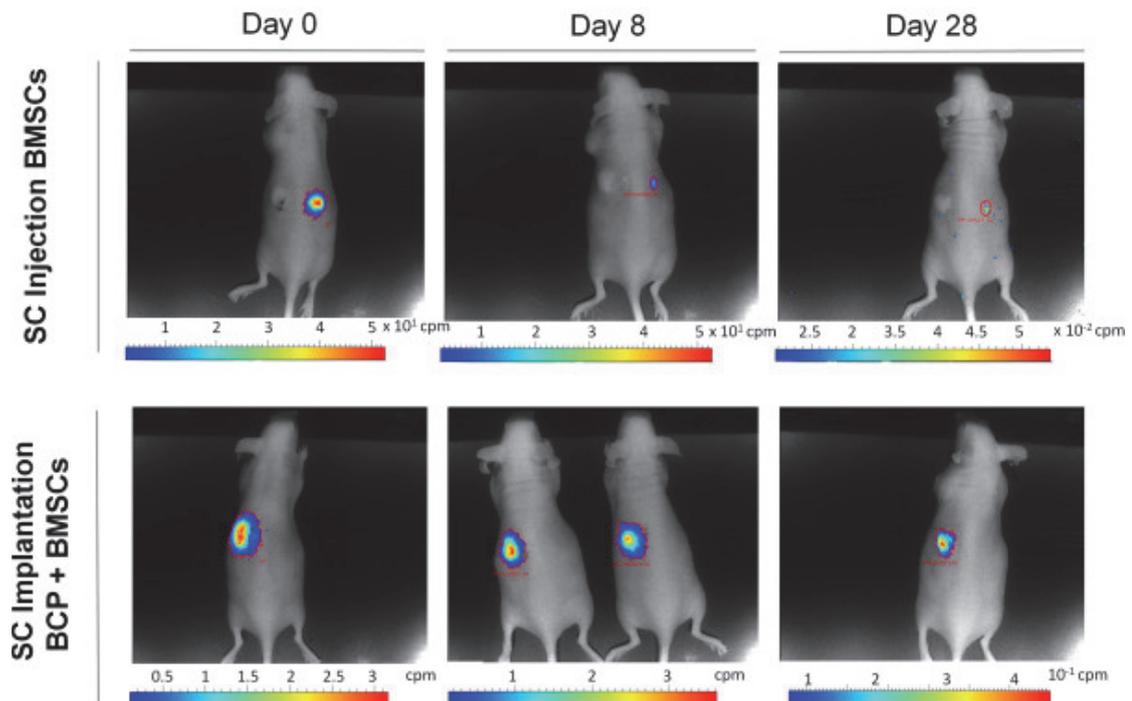


Figure 17 : Imagerie de bioluminescence [51]

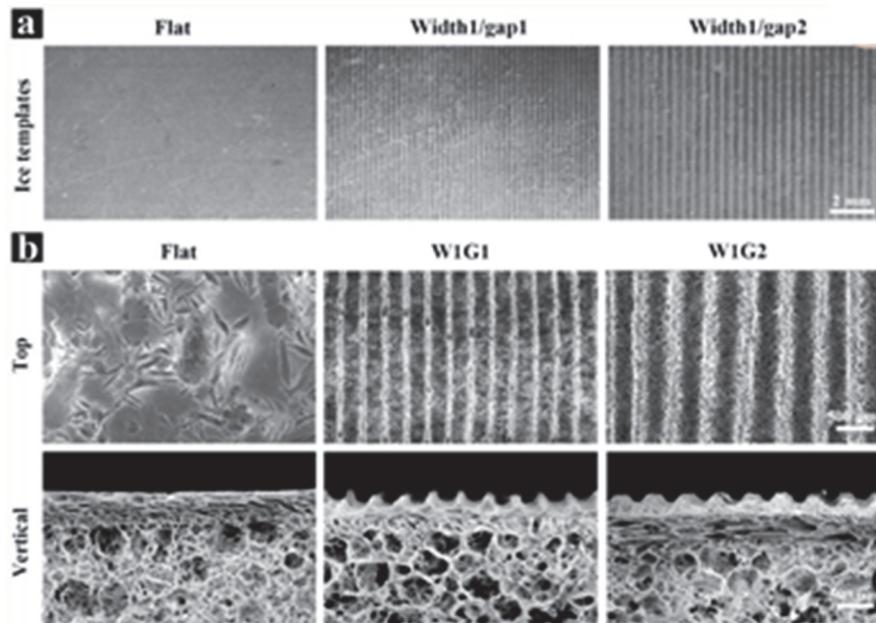
En haut : Groupe témoin ayant reçu le phosphate de calcium biphasique (BCP) seul sur le côté dorsal gauche et une injection sous cutanées (SC) des cellules stromales de moëlle osseuse sur leur côté dorsal droit.

En bas : Groupe expérimental ayant reçu des injections sous cutanées de BCP incorporé avec des cellules stromales issues de moëlle osseuse.

Les résultats par bioluminescence ont montré une perte significative du nombre initial des cellules transplantées après 28 jours d'implantation, seulement 1,5% étaient encore présentes.

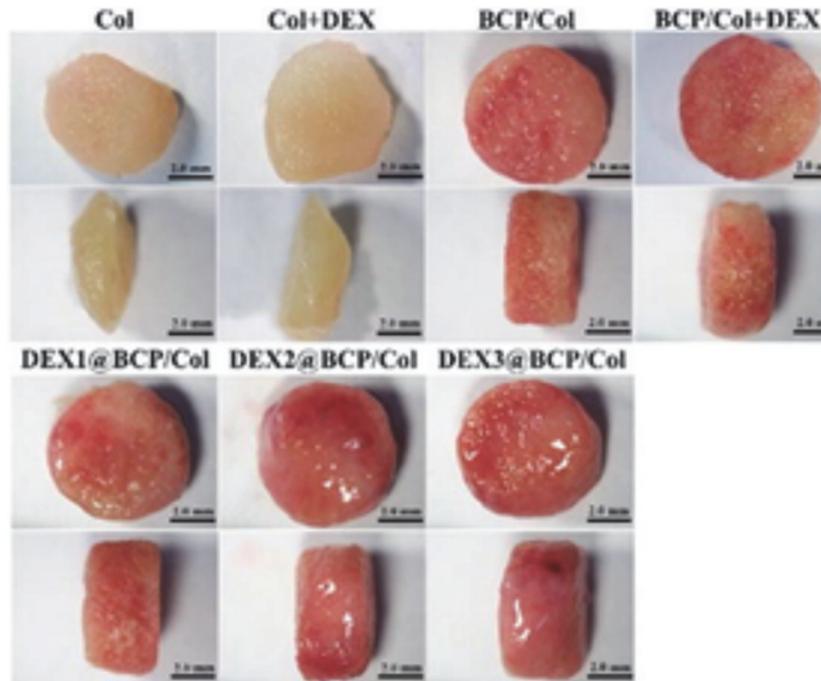
Après huit semaines, on observe un os minéralisé mature dans les défauts crâniens critiques et sur des sites ectopiques. Les implants étaient constitués principalement de cellules hôtes, mais on retrouve toujours des cellules humaines attachées aux granules de BCP et incorporées dans des lacunes ostéocytaires de la nouvelle matrice osseuse.

Dans une autre étude <sup>[67]</sup> réalisée sur la souris, des cellules souches mésenchymateuses xénogènes de moelle osseuse humaine ont étéensemencées sur des supports à base de phosphate de calcium biphasé et de collagène chargés de Dexaméthasone (DEX-BCP-Col). En plus de leurs caractéristiques otéoinductrices, les supports présentent différents types de réseaux « gorgés », des surfaces poreuses et une bonne interconnectivité (Figure 18).



**Figure 18 : Différents types de réseaux des supports à base de phosphate de calcium et de collagène chargés de Dexaméthasone <sup>[67]</sup>**

Ces échafaudages composites ont été utilisés pour la culture de cellules souches afin d'étudier leurs effets sur l'ostéogenèse par culture *in vitro* (Figure 19) et implantation *in vivo*.



**Figure 19 : Cultures cellulaires sur différents supports composites** [67]

*In vitro*, les cellules souches ont bien adhéré aux grands pores sphériques de chaque échafaudage. Les cellules se propagent largement avec de nombreux filopodes. Ces résultats ont indiqué que ces supports sont propices à l'adhésion et la propagation des cellules.

*In vivo*, 8 semaines après implantation, l'os nouvellement formé n'était pas réparti de la même manière selon les implants. Il était limité dans les régions périphériques des implants plats alors qu'il était réparti dans toutes les régions des implants « gorgés ». L'analyse des marqueurs ostéogéniques a montré que le facteur de croissance VEGF, l'ostéocalcine (OCN), les protéines BMP-2, le collagène de type I, et la sialoprotéine osseuse 2 sont présents de manière plus homogène pour les échafaudages « gorgés ». L'échafaudage présentant le degré ostéogénique le plus élevé est celui qui présente le plus de « gorges ».

Les résultats suggèrent que les « gorges » dans les échafaudages composites DEX-BCP-Col stimulent l'ostéogénèse. Ces échafaudages composites constituent un support utile pour la régénération de tissus osseux de taille importante [77, 67]. Cependant, en raison de leur faible résistance mécanique, il est nécessaire de passer par une étape de prolifération et de différenciation cellulaire *in vitro* ou de trouver un moyen pour stabiliser le greffon.

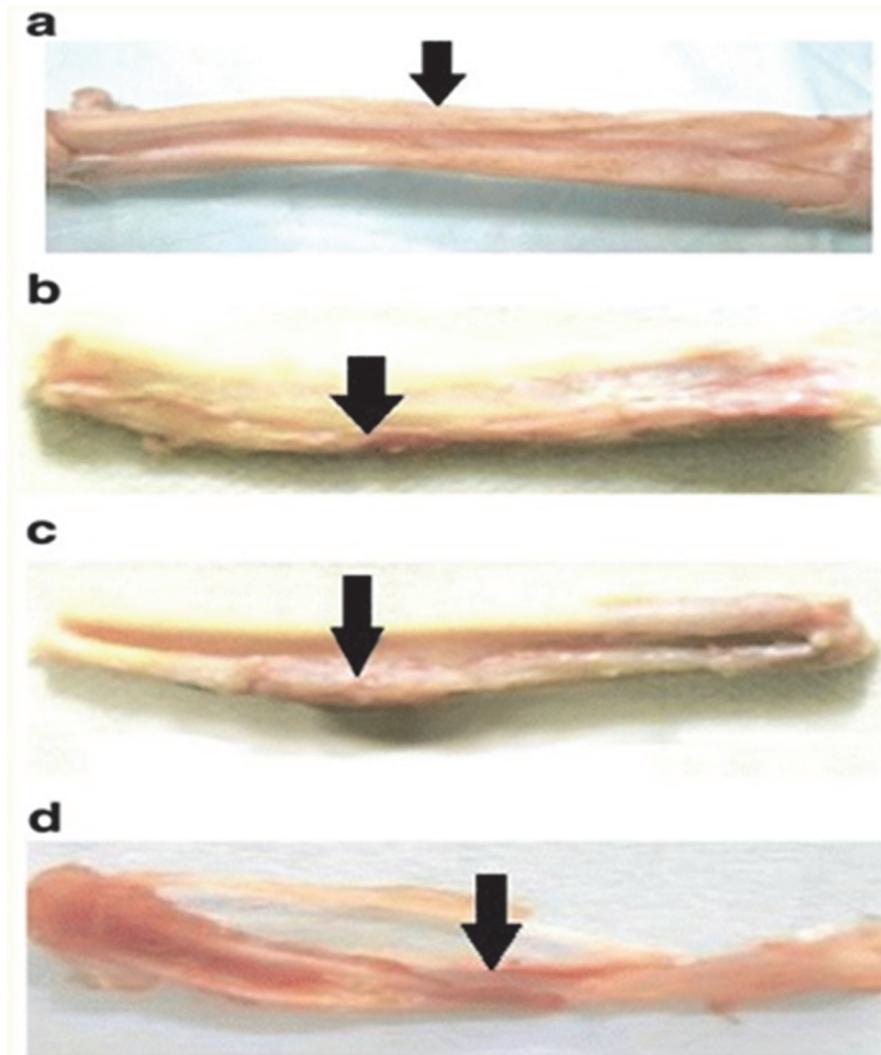
### .1.1.2. Etudes avec cellules souches allogéniques

Les anomalies crâniennes de taille critique chez le rat ont été étudiés <sup>[71]</sup> sur quatre groupes, permettant d'évaluer des implants de cellules souches mésenchymateuses allogéniques dérivées de la moelle osseuse, seuls ou combinés avec une matrice osseuse déminéralisée. Un groupe de contrôle négatif, un groupe avec le support seul, un autre avec les cellules souches allogéniques, et un dernier groupe combinant support et cellules.

A la semaine 12, la régénération osseuse a été évaluée par analyses radiographiques et immunohistochimie. Le groupe avec association cellules souches et matrice osseuse déminéralisée a révélé le meilleur potentiel ostéoinductif. Les groupes, support seul ou cellules souches seules, se sont révélés avec un potentiel ostéogénique semblable mais supérieur au groupe de contrôle.

Dans une autre étude <sup>[57]</sup>, un défaut osseux de 4 mm de long a été créé chirurgicalement sur des radius de rats. Puis une greffe de cellules souches allogéniques dérivées de tissu adipeux et d'os xénogène déprotéinisé de lapin a été réalisée et évaluée. Les rats ont été divisés en quatre groupes : deux supports osseux combinés aux cellules souches adipeuses avec et sans différenciation ostéogénique, un groupe de contrôle avec de l'os xénogène seul, et un groupe témoin où les défauts n'étaient remplis d'aucun matériau.

La réparation du défaut osseux a été évaluée par observation globale (Figure 20), examen radiologique (Figure 21), et analyses histologiques.



**Figure 20. Observation de la régénération osseuse des différents supports** <sup>[57]</sup>

Comme le montrent la figure ci-dessus :

- ▶ Dans le groupe des cellules souches différenciées en ostéoblastes (a), au bout de 8 semaines, l'os implanté était difficile à reconnaître.
- ▶ Dans le groupe des cellules souches adipeuses non différenciées (b), à 8 semaines, le défaut osseux était rempli d'un grand nombre de tissus osseux et la connexion était solide, mais l'implant était clairement identifiable.
- ▶ Dans le groupe sans cellules souches (c), à 8 semaines, l'implant et le défaut n'étaient pas unis et formaient une articulation épaisse et peu solide.
- ▶ Et dans le groupe témoin (d), il y avait un tissu kératinisé, toujours en cours de cicatrisation entre les deux extrémités du défaut.



Figure 21 : Observation de la densité osseuse à 4 (1) et 8 (2) semaines <sup>[57]</sup>

Au niveau radiologique, comme le montre la figure ci-dessus :

- ▶ Le groupe des cellules souches ostéogéniques (a) a montré une amélioration surprenante de la densité du cal osseux dès 4 semaines (a1). A 8 semaines (a2), les os étaient bien connectés, une cavité médullaire est apparue, et le défaut osseux était presque impossible à détecter.
- ▶ Le groupe des cellules souches adipeuses (b) a montré à 8 semaines (b2) que les os corticaux étaient en train d'être remodelés, et la cavité médullaire commençait à se connecter avec l'os cortical. Mais le défaut était toujours évident.
- ▶ Dans le groupe de contrôle sans cellules souches (c), même à 8 semaines (c2) aucune cavité médullaire n'apparaissait.

- ▶ Dans le groupe témoin sans greffe (d), des cals de très faible densité ont été observés (d1, d2).

Les valeurs de densité sont similaires dans les groupes de cellules souches adipeuses avec ou sans différenciation, ce qui révèle que l'os xénogène associé aux cellules souches améliore le processus d'ostéogénèse. Ces deux groupes ont entamé leur remodelage osseux. De plus, les protéines ostéogéniques contenues dans des matériaux dérivés des os, ou la matrice osseuse nouvellement formée induisent la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses autologues autour du défaut. Le groupe de contrôle sans cellules (c), était toujours en réparation avec une densité osseuse en légère augmentation. Le groupe témoin vide (d), a aussi formé naturellement une petite quantité d'os, mais n'a pas vraiment pu réparer et ponter le défaut segmentaire. En 8 semaines, aucune nécrose, infection ou épanchement n'ont été observés dans les tissus environnants, et les supports xénogènes se sont combinés naturellement aux tissus mous environnants sans formation d'enveloppe.

Ainsi, les cellules souches adipeuses allogènes et l'os xénogène sont compatibles, avec, tout au plus, un léger rejet immunitaire. Le système de pores maillé en 3D de l'os fournit suffisamment d'espace pour la culture, la croissance, la différenciation ostéoblastique, et la sécrétion de matrice extracellulaire.

L'utilisation combinée support osseux xénogène ou synthétique et cellules souches allogéniques ou xénogénique, fournit de bons résultats dans la reconstruction osseuse cranio-faciale critique. De plus, leur combinaison favorise davantage la régénération osseuse.

Bien que les essais précliniques avec des supports implantés et des cellules souches mésenchymateuses se soient avérées efficaces pour accélérer la réparation osseuse dans des défauts de taille critique, la recherche sur les petits animaux ne donne pas de résultats pertinents en raison de différences majeures de taille de greffon. Les grands modèles animaux doivent généralement être utilisés.

## **.1.2. Etudes sur les grands mammifères (mouton, cochon, lapin)**

### **.1.2.1. Etudes comparatives du potentiel ostéogénique entre cellules souches issues de moelle osseuse ou du tissu adipeux**

Niemeyer et coll. <sup>[49]</sup> ont créé un défaut de taille critique dans le tibia de moutons. Ils ont implanté une éponge de collagène avec des cellules souches mésenchymateuses adipeuses ou dérivées de moelle osseuse dans le défaut, et un troisième groupe avec éponge de collagène et cellules souches adipeuses mélangées avec un plasma riche en plaquettes (PRP).

26 semaines après implantation, l'analyse radiologique a révélé une formation osseuse plus élevée pour le groupe des cellules souches dérivées de la moelle osseuse par rapport aux cellules souches adipeuses. Cependant, le groupe PRP avec cellules souches adipeuses a montré une formation osseuse similaire à celle du groupe des cellules souches dérivées de la moelle osseuse.

Leur conclusion a abordé la capacité ostéogénique inférieure des cellules souches adipeuses par rapport à celles dérivées de la moelle osseuse, mais qu'elle peut être compensée par l'addition de plasma. Il serait donc nécessaire d'induire les cellules souches adipeuses en lignée ostéogénique.

Cependant, Kang et coll. <sup>[49]</sup> ont implanté du  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) et des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse ou des cellules souches adipeuses dans des défauts de radius canins. 20 semaines après implantation, ils ont trouvé une guérison similaire. Ils considèrent que les cellules souches adipeuses peuvent remplacer les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse pour la reconstruction osseuse clinique.

De plus, Stockmann et coll. <sup>[49]</sup> ont étudié les défauts osseux corticaux crâniens de porc et l'implantation d'un échafaudage de collagèneensemencé soit par des cellules souches adipeuses soit des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse. Ils ont aussi démontré que la nouvelle formation osseuse n'était significativement pas différente en fonction des populations cellulaires étudiées.

### .1.2.2. Etudes avec cellules souches autologues

Dans une étude de Gjerde et coll. <sup>[52]</sup>, le modèle de mini-porcs a permis d'évaluer l'efficacité des cellules souches mésenchymateuses autologues pour la régénération de défauts critiques mandibulaires. Après une anesthésie générale, des prélèvements de moelle osseuse ont été réalisés, les cellules souches mésenchymateuses ont été isolées, caractérisées, et l'expansion cellulaire a été réalisée. Dans le même temps, une arête alvéolaire étroite a été créée par l'avulsion de dents et l'ablation d'os afin de simuler une situation pathologique.

Après l'expansion des cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse, les cellules ont étéensemencées sur des granules de phosphate de calcium biphasique (BCP) (hydroxyapatite et  $\beta$ -TCP) pendant 1 heure et implantées dans les défauts. Deux mois plus tard, des implants dentaires ont été posés dans l'os nouvellement formé et des biopsies ont été réalisées. La biopsie a révélé que les granules ont été incorporés dans la nouvelle matrice osseuse.

Ces données démontrent le potentiel ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses autologues combinées avec des granules de phosphate de calcium, et fournissent des informations précliniques cruciales dans un grand animal sur la reconstruction d'os alvéolaire gravement résorbé.

Dans une autre étude sur des lapins <sup>[53]</sup>, l'association de cellules souches adipeuses en différentes quantités, sur un support d'os xénoène bovin déprotéiné et d'une matrice en titane préformée a amélioré la formation osseuse et l'ostéointégration implantaire dans un modèle de régénération osseuse guidée verticale sur des défauts osseux crâniens.

Après 1 mois, les matrices en titane ont été enlevées et un implant en titane a été placé dans chaque site augmenté. Encore un mois après les biopsies et analyses radiologique indiquent que les groupes avec des cellules souches adipeuses ont montré une formation et densité osseuse significativement plus importante, ainsi qu'un contact os-implant plus élevé par rapport au groupe de contrôle avec support seul.

Ainsi, les expériences sur les modèles animaux ont montré que l'utilisation de cellules souches mésenchymateuse pour une régénération osseuse critique semble pertinente. Elles augmentent la concentration cellulaire et les précurseurs ostéoblastiques sur le site à régénérer, et facilitent la cicatrisation osseuse du patient. Ainsi, le pourcentage d'os régénéré est plus important.

La technique de granules synthétiques ou xénogéniques avec un coffrage en titane semble reproductible et prévisible, cependant les recherches sur la formation d'organoïde osseux *ex-vivo* doivent être poursuivies.

## .2. SUR L'HOMME

Les essais sur l'homme ont commencé sur des petits échantillons et prennent du temps. En effet, il est indispensable d'évaluer la sécurité, la reproductibilité, et le rapport bénéfice/risque de ces nouvelles techniques.

Dans un essai clinique randomisé <sup>[47]</sup>, les auteurs ont étudié la faisabilité et comparé la transplantation de cellules souches par rapport à la régénération osseuse guidée seule.

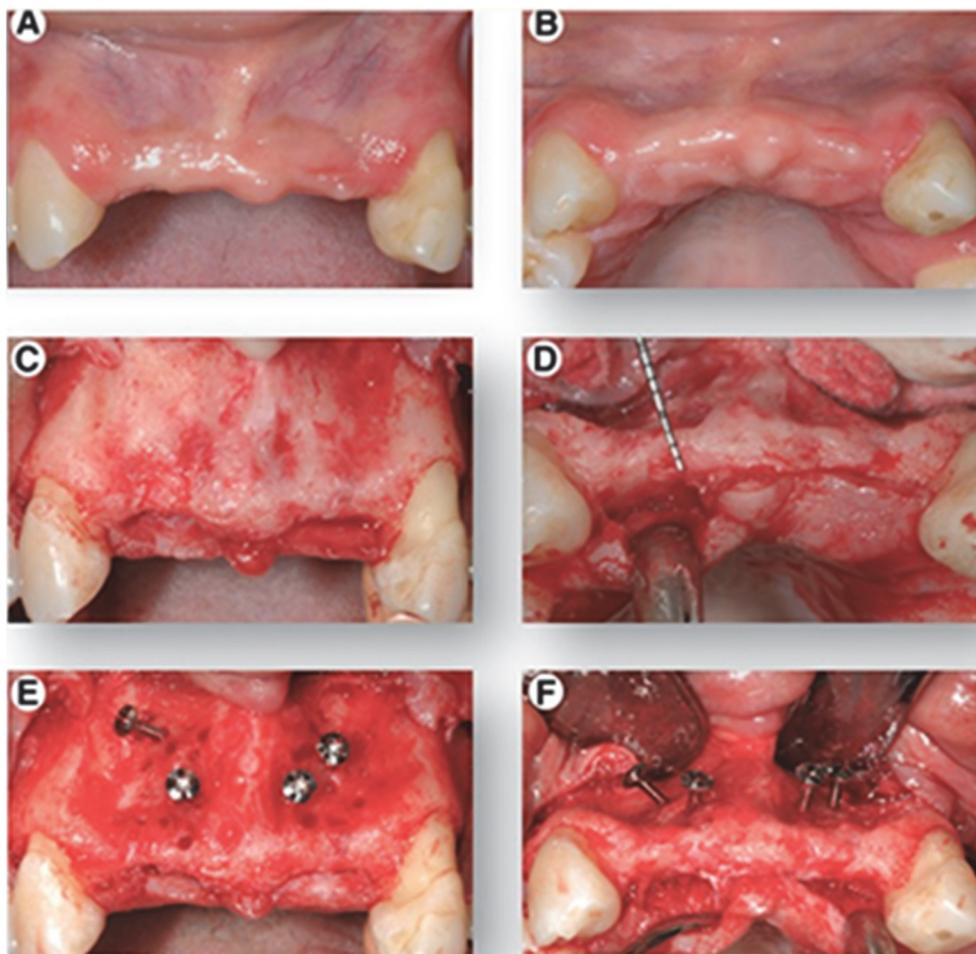
Vingt-quatre patients présentaient des défauts localisés des maxillaires. L'évaluation clinique et radiologique a eu lieu à 6 semaines post opératoire. A 12 semaines des implants ont pu être posés chez tous les patients et une biopsie osseuse a été récoltée. Les mesures cliniques, radiologiques, et histologiques ont démontré que la thérapie cellulaire accélérât la régénération osseuse alvéolaire par rapport au traitement de régénération osseuse guidée. De plus, la thérapie cellulaire a réduit significativement le besoin de greffes secondaire au moment du placement de l'implant. A un an post opératoire aucun événement indésirable grave lié à l'étude n'a été rapporté.

Ainsi, la transplantation de cellules souches pour le traitement d'anomalies osseuses alvéolaires semble sûre au niveau biologique et permet d'accélérer la régénération osseuse.

Dans une étude [79], la thérapie cellulaire a permis la reconstruction d'un maxillaire supérieur d'un patient qui a perdu des dents et 75% de son tissu osseux de soutien à la suite d'une blessure.

Une population mixte autologues de cellules dérivées de la moelle osseuse et de cellules souches mésenchymateuses a étéensemencée sur des granules de  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP). La survie cellulaire pendant ce processus était élevée lorsque les cellules étaient incubées avec le  $\beta$ -TCP pendant 30 minutes.

Les étapes cliniques sont présentées dans la Figure 22 suivante :



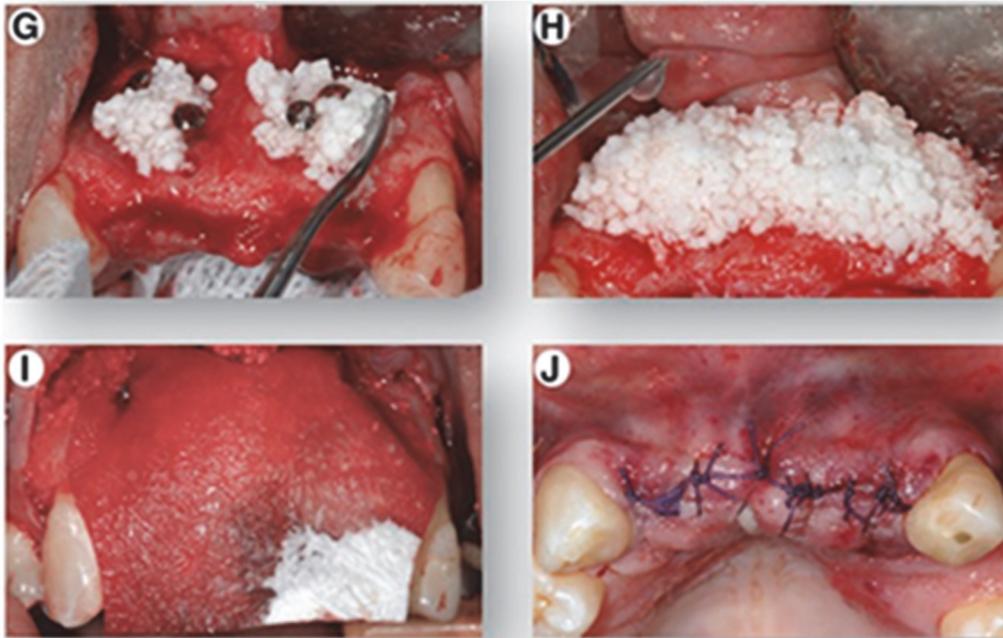


Figure 22 : Photographies des étapes cliniques [79]

*Etat clinique initial montrant des défauts sévères de crête alvéolaire de tissus durs et mous de la mâchoire supérieure, de face (A) et de dessus (B).*

*Elévation d'un lambeau de pleine épaisseur, les images montrent une crête alvéolaire gravement déficiente, mesurant cliniquement une largeur de seulement 2 à 4 mm de face (C) et de dessus (D). → Vue de face (E) et de dessus (F) du placement des vis d'ostéosynthèse pour la préparation du site osseux pour recevoir la greffe.*

*(G) Placement du matériau ( $\beta$ -TCP ensemencé avec les cellules 30 minutes avant le placement à température ambiante) dans le défaut. (H) Application supplémentaire de la suspension cellulaire après le placement de la greffe sur le site receveur.*

*(I) Mise en place d'une membrane résorbable pour stabiliser et contenir la greffe à l'intérieur du site du receveur. (J) Vue de dessus de la fermeture primaire du lambeau.*

Quatre mois après la thérapie cellulaire, une tomодensitométrie (Figure 23) et une biopsie osseuse ont été effectuées, et des implants oraux ont été placés pour soutenir une prothèse dentaire. Les analyses cliniques, radiographiques et histologiques ont confirmé que dès 4 mois, la thérapie cellulaire a régénéré 80% de la carence initiale de l'os maxillaire avec un nouvel os suffisamment vascularisé et minéralisé pour placer des implants oraux de manière stable.

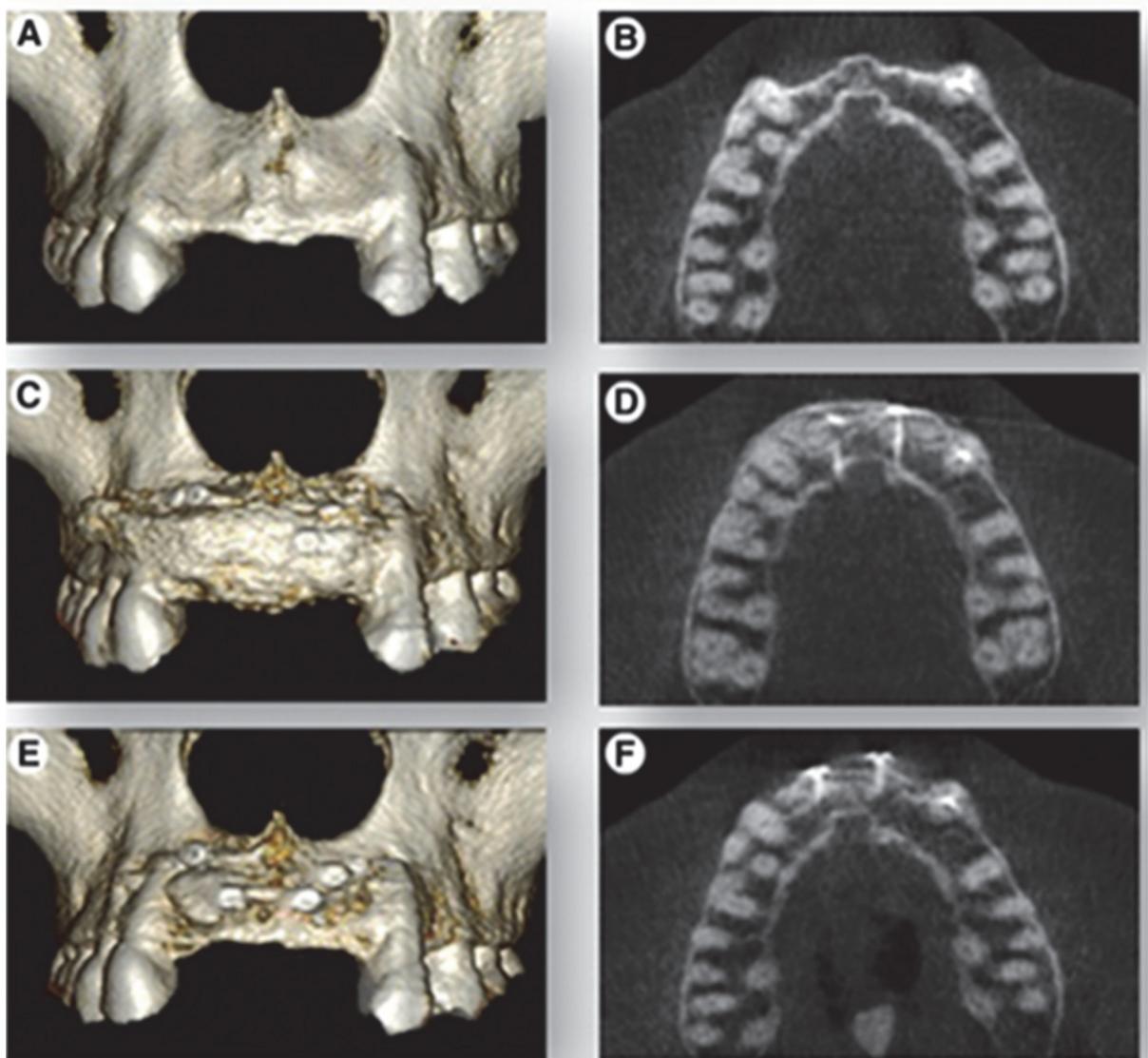


Figure 23 : Tomodensitométrie à faisceau conique (CBCT) <sup>[80]</sup>

*(A, B): la situation clinique initiale présentée en reconstruction 3D et en coupe axiale montre un déficit osseux initial important.*

*(C, D): immédiatement après la greffe cellulaire, il y a une pleine restauration de la largeur de la crête.*

*(E, F): les images montrent une résorption de l'ordre de 25% de la greffe à 4 mois et une régénération globale nette de 80% de la carence initiale en largeur de crête.*

La réadaptation fonctionnelle et esthétique du patient a été complétée avec succès par la mise en place d'une prothèse dentaire 6 mois après le placement de l'implant.

Ce protocole clinique a utilisé une approche fondée sur des données sur la transplantation cellulaire à partir d'aspirat de moëlle osseuse et la thérapie utilisant des cellules souches autologues. Ce rapport clinique sert de base solide pour développer des études plus étendues en utilisant cette approche pour le traitement d'un plus grand nombre de patients afin d'évaluer davantage l'efficacité et la faisabilité.

Une méta-analyse <sup>[58]</sup> a examiné les rapports de 13 cas de malformations crâniennes faciales et maxillaires traités avec des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux autologue. Ces études ont été synthétisées Tableau 2.

Les cellules souches ont été récoltées à partir de la paroi abdominale, isolées et cultivées ex vivo avec du sérum autologue. La période d'expansion des cellules a varié de 10 jours à un mois en fonction du volume du défaut, de la quantité de graisse récoltée, et du taux de croissance cellulaire.

Les cellules souches ont ensuite étéensemencées sur des supports synthétiques de bioverres bioactifs hybridés avec protéines (BAG) ou de phosphate tricalcique ( $\beta$ -TCP) <sup>[79]</sup>. Dans le cas des défauts mandibulaires, il a été additionné des protéines morphogéniques osseuses humaines (BMP-2).

Le temps de suivi variait de 12 à 52 mois.

Case no.	Demographics: gender/age	Defect site	Defect size (cm)	Cell culture period	$\beta$ -TCP vs. BAG	Scaffold volume	BMP dose	Implanted (ASCs per ml)	Containment mesh	Complications	Follow-up
1	F 44	Frontal sinus	2.3 × 1.0 (depth, 0.5)	11 days	BAG Biogran	32 ml	None	5,600,000 (175,000)	None	None	24 months
2	M 36	Frontal sinus	5.3 × 3.8 (depth, 1.2)	10 days	BAG BonAlive	32 ml	None	4,020,000 (125,625)	None	None	49 months until exitus because of acute pancreatitis
3	M 58	Frontal sinus	6.3 × 2.5 (depth, 1.1)	4 weeks	BAG BonAlive	12 ml	None	4,320,000 (360,000)	None	None	37 months
4	F 60	Frontal cranium	6.5 × 6.5	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	110 ml	None	4,140,000 (37,637)	Titanium outer layer	None	52 months
5	M 59	Parietal cranium	10 × 8	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	80 ml	None	8,712,000 (108,900)	Resorbable outer layer	Outer titanium mesh added	48 months
6	M 63	Temporal cranium	8 × 6.5	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	80 ml	None	3,982,500 (49,781)	Resorbable bilayer	Mild marginal resorption	44 months
7	F 75	Parietal cranium	5.5 × 3	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	20 ml	None	7,821,000 (391,050)	Resorbable bilayer	Abdominal donor site hematoma	41 months
8	F 55	Frontal cranium	10 × 10	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	100 ml	None	2,812,500 (28,125)	Resorbable outer layer, titanium inner layer	Recurrence at resection margin	36 months
9	M 55	Mandible chin	10.0	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	40 ml	12 mg	10,000,000 (250,000)	Titanium	None	51 months
10	F 50	Mandible ramus/body	8.5	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	40 ml	12 mg	16,000,000 (400,000)	Titanium	None	29 months
11	M 43	Mandible body	6.0	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Granules	25 ml	12 mg	4,720,000 (188,800)	Titanium	None	27 months
12	F 50	Nasal septum	0.9 × 0.8	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Strip	2.5 × 2.5 × 3.0 (1.9 ml)	None	3,110,000 (1,636,842)	None	None	28 months
13	F 44	Nasal septum	0.5 × 0.5	3 weeks	$\beta$ -TCP ChronOS Strip	2.5 × 2.5 × 3.0 (1.9 ml)	None	8,287,500 (4,361,842)	None	Continued picking and graft removed	12 months

Tableau 2 : Détails de 13 cas de malformations squelettiques cranio-maxillo-faciales traitées avec cellules souches adipeuses [58]

Trois patients avec des améblastomes récurrents nécessitant une résection mandibulaire segmentaire âgés de 43 à 55 ans, et présentant des défauts après résection allant de 6 à 10 cm de long ont suivi une procédure de reconstruction avec planification chirurgicale assistée par ordinateur 3 semaines après récolte de tissu adipeux. Les étapes de planification, chirurgie, et d'évaluation radiologique post-opératoire d'un des patients est visible Figure 24.

Un coffrage de mailles en titane sur mesure a été réalisé et implanté avec des cellules souches adipeuses, des granules de  $\beta$ -TCP, et des protéines ostéoinductives (BMP-2).

❖ **Cas n°1 :**

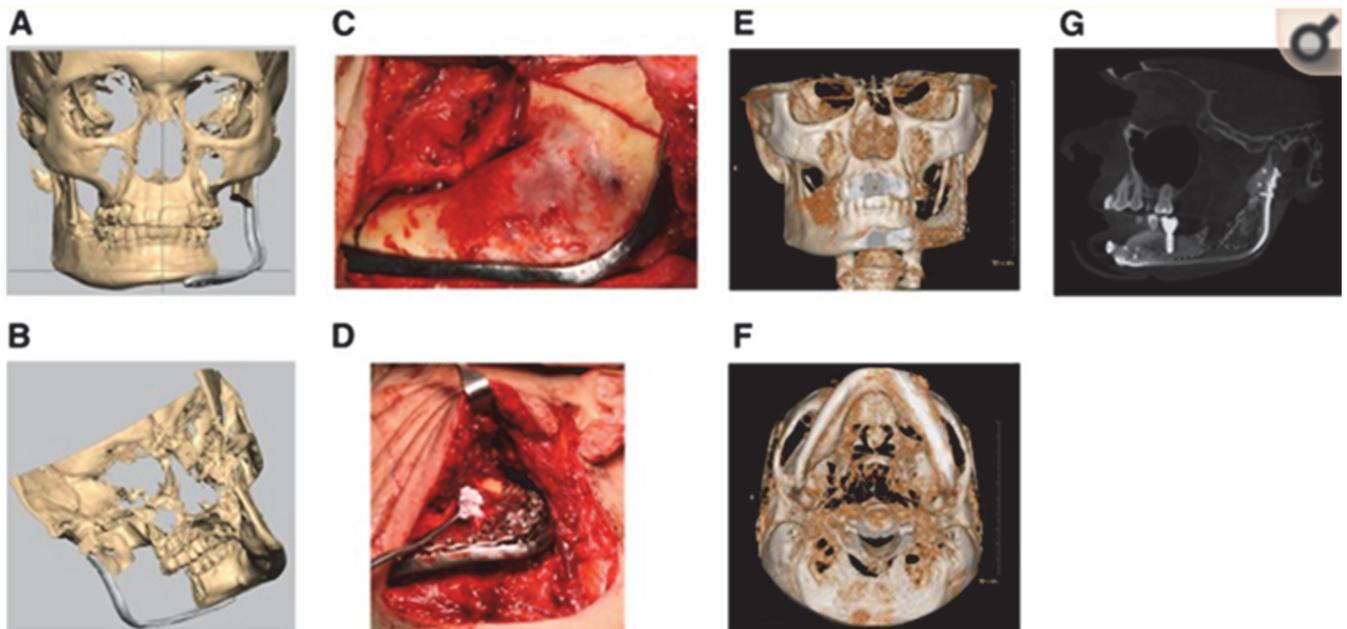


Figure 24 : Étapes de la reconstruction mandibulaire [54]

(A) et (B) : Planification préopératoire virtuelle avec une image de type reconstruction 3D générée par ordinateur du patient, montrant la plaque de reconstruction sur la zone prévue pour la résection.

(C) : Photographie opératoire montrant la plaque de reconstruction en position et les lignes de résection mandibulaire.

(D) : Photographie opératoire de la mise en granulaire de phosphate de calcium ( $\beta$ -TCP) avec les cellules souches adipeuses et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP-2) sous le maillage en titane.

(E) et (F) : Tomodensitométrie tridimensionnelle 1 an postopératoire, vue antérieure et basilaire.

(G) : Tomodensitométrie montrant la reconstruction mandibulaire restaurée avec un implant dentaire fonctionnel ostéointégré.

### ❖ Cas n°2 :

Un améloblastome mandibulaire antérieur a nécessité la section antérieure de cette dernière. Le scanner a permis la fabrication d'une plaque en titane afin de reconstituer l'anatomie du menton. Dix mois après sa mise en place et son remplissage tissulaire avec des granules de  $\beta$ -TCP, BMP-2, et des cellules souches adipeuses autologues, des implants dentaires ont été placés dans le site greffé, permettant la récolte de tissu osseux. L'examen histologique et son analyse ont confirmé la viabilité et la nature de ce nouveau tissu osseux.

Les résultats cliniques et radiologiques ont montré que la reconstruction a réussi à combler de gros défauts mandibulaires (8,2 cm de long de moyenne), avec une guérison sans incident. L'utilisation du facteur de croissance (BMP-2) a pu avoir facilité la différenciation ostéogénique des cellules souches adipeuses et l'ossification. Support, signaux et cellules ont agi en synergie pour produire une construction bien ossifiée [80].

Les trois patients ont été suivis après leur reconstruction mandibulaire basée sur les cellules souches adipeuses entre 27 et 51 mois. Deux des trois patients ont opté pour la reconstruction avec des implants. Sept implants ont été placés chez ces deux patients. Six implants se sont ostéo-intégrés avec succès et ont pu être mis en fonction masticatoire.

Ces résultats offrent une perspective prometteuse pour le traitement de défauts mandibulaires critiques. Ces traitements ne nécessitent pas de formation osseuse ectopique et permettent une réhabilitation implantaire.

Dans une autre étude [70], un jeune patient de 14 ans présentant un améloblastome mandibulaire antérieur (Figure 25, Figure 26) a été traité avec des cellules souches de pulpe dentaire.

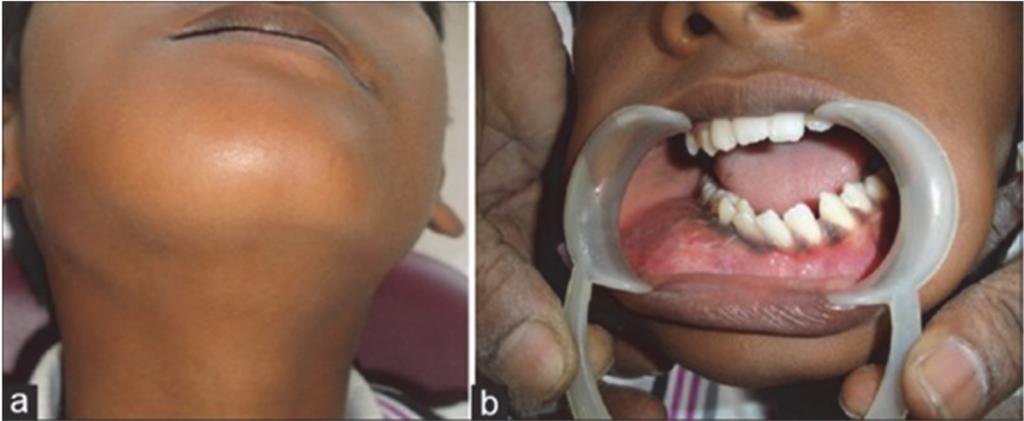


Figure 25 : Photographie de l'état initial [70]

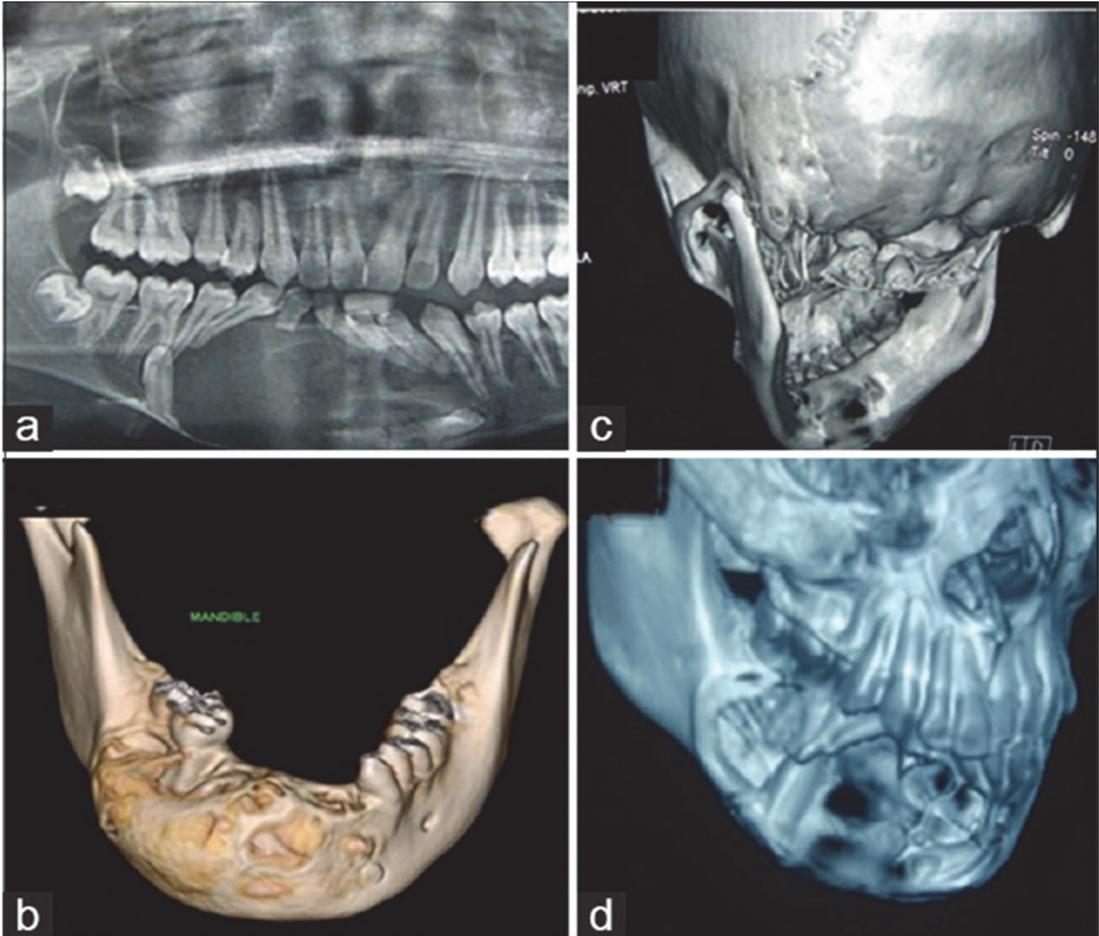


Figure 26 : Scanner mettant en évidence un améloblastome mandibulaire antérieur [70]

Après marsupulanisation et extractions dentaires antérieures, 4,5 millions de cellules souches de la pulpe dentaire de la dent 14 ont pu être récolté. Après expansion, 20 millions de cellules souches ont pu être transplanté au moment de la chirurgie.

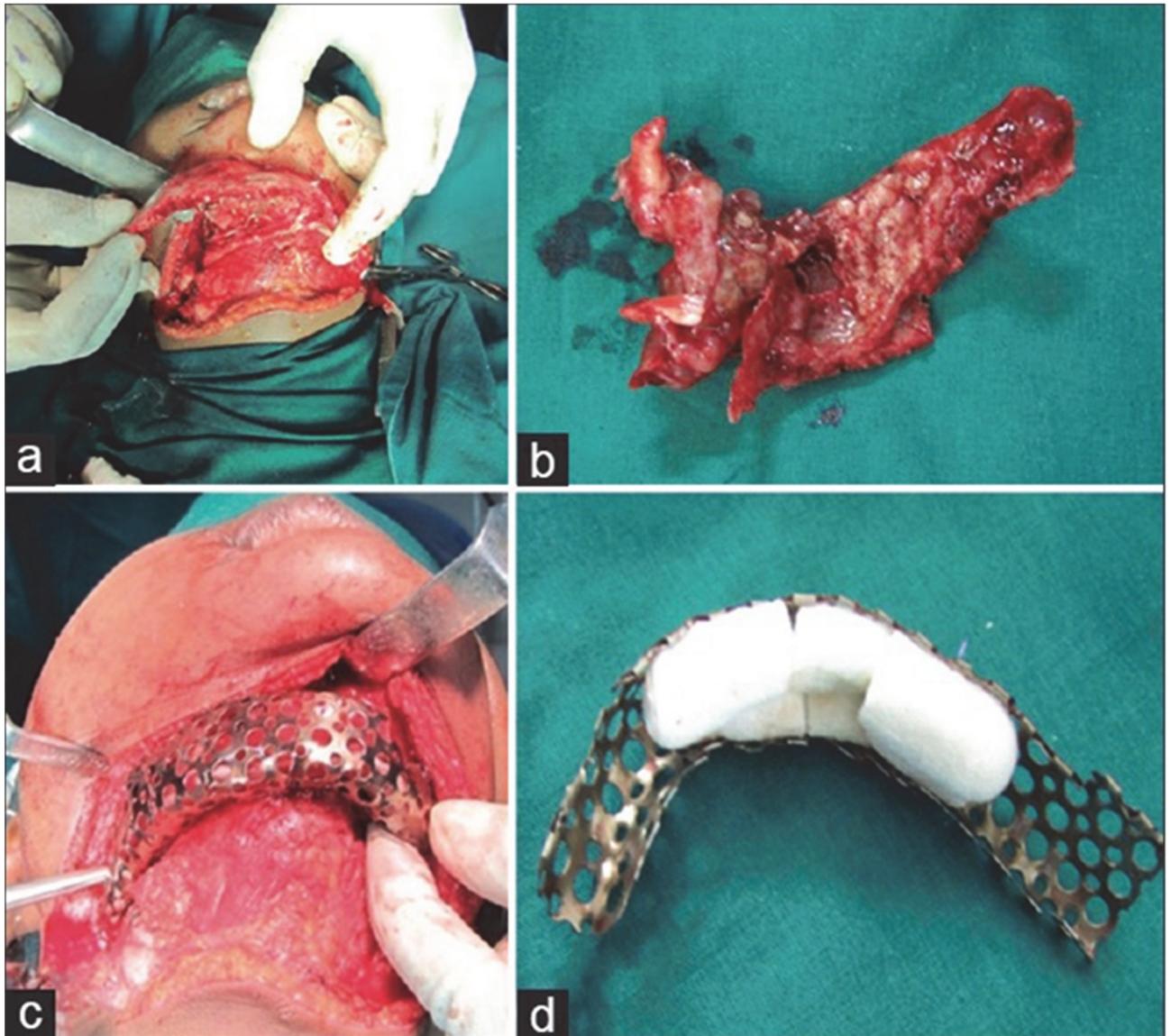


Figure 27 : Photographies intra opératoire [70]

Lors de l'intervention, la région mandibulaire allant de la dent 46 à 33 fut retiré et cureté (Figure 27 a et b), et une maille en titane réalisé sur mesure fut essayé (Figure 27 c).

Avant de placer la maille, cinq supports stérile synthétique de  $\beta$ -tricalcium phosphate mesurant 2,5 cm de long ont été préparé (Figure 27 d).

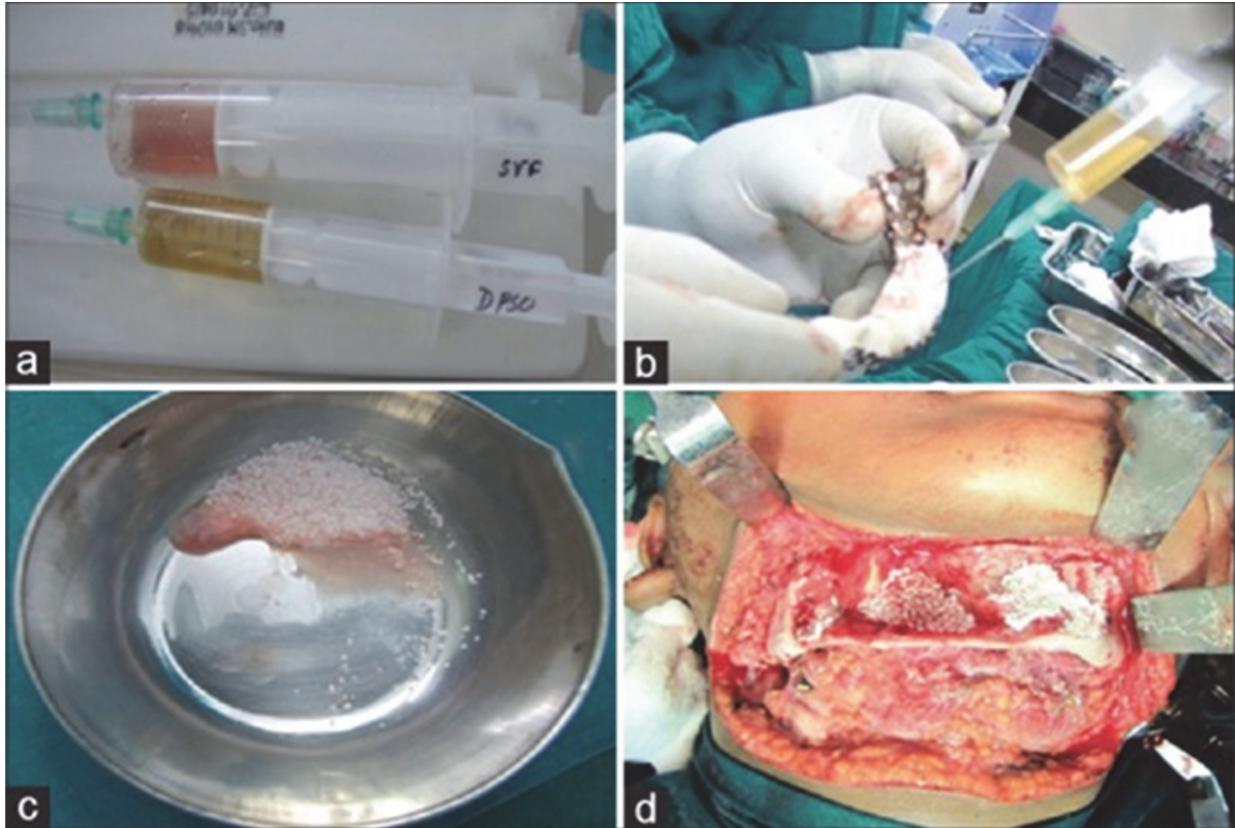


Figure 28 : Photographie du protocole de greffe de cellules souches <sup>[70]</sup>

20 millions de cellules souches dentaire et 45 millions de cellules contenu dans un prélèvement de plasma sanguin ont été introduit dans ces supports (Figure 28 a et b). Après placement de la maille, elle a été recouverte par des granules de phosphate tricalcium mixées avec une préparation riche en fibrine issu du prélèvement de plasma (Figure 28 c et d).

Un mois après l'intervention, une partie de la maille fut exposé, du côté lingual en regard des dents 34 35. Environ 1 cm de greffe a été enlevé. Après éviction de la partie exposé, deux supports synthétiques avec du plasma ont été placé afin de maximiser les chances de guérison.

Dix mois après l'intervention un scanner a été réalisé afin de constater la régénération osseuse (Figure 29).

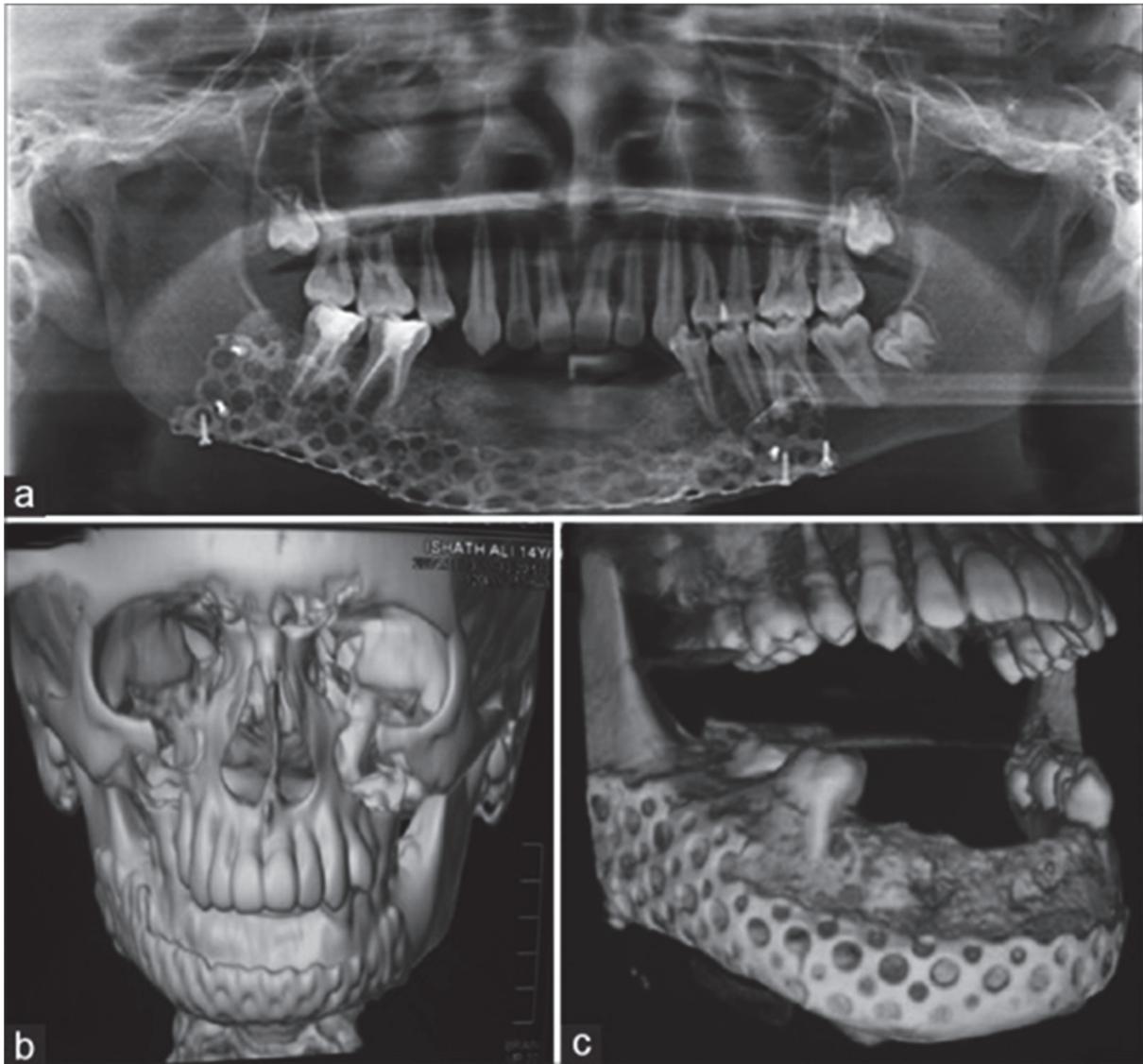


Figure 29 : Scanner à 10 mois post opératoire [70]

Ce cas a permis de démontrer le potentiel ostéogénique des cellules souches issus de la pulpe dentaire, combiné avec des cellules issues du plasma, pour la régénération de défauts majeur mandibulaire. Cependant, il est nécessaire d'élargir les rapports de cas, pour étudier les futures implications et le potentiel de cette technique.

Dans une autre étude <sup>[54]</sup>, la thérapie cellulaire a aussi induit la régénération d'os mandibulaires gravement atrophiés :

Les patients étaient âgés de 18 à 80 ans. Il leur manquait une ou plusieurs dents de la région postérieure de la mandibule depuis plus de 6 mois, et ils possédaient une largeur de crête alvéolaire dans la région édentée ne dépassant pas 4,5 mm. Pour les patients sélectionnés une tomographie par ordinateur à faisceau conique (CBCT) a été réalisée à l'instant t0.

Chez les 13 participants, des aspirats de moelle osseuse ont été prélevés de la crête iliaque sous anesthésie locale. Un total de 15 à 20 ml d'aspirat de moelle osseuse de chaque patient a été prélevé et envoyé au centre de fabrication de cellules en Allemagne (Institute for Clinical Transfusion Medicine et Immunogenetics (IKT)) qui dispose d'une licence de production pour les cellules souches mésenchymateuses d'aspirations de moelle osseuse, utilisant les bonnes pratiques de fabrication. Une expansion cellulaire a ensuite été réalisée en 2 passages. La viabilité des cellules souches mésenchymateuses a été évaluée. Les cellules ont ensuite été mises en suspension dans une solution saline physiologique de qualité clinique pour être conditionnées dans des seringues stériles en doses de 5 mL, et renvoyées au lieu de l'essai clinique, dans les 24 heures suivantes. Deux expansions ont été arrêtées au passage 0 car la quantité de cellules était insuffisante pour permettre une expansion. Cette variabilité peut constituer une étape limitante de la procédure, mais peut être surmontée en augmentant le nombre de cellules récoltées ou en développant des méthodes d'identification des cellules pertinentes avant le début de la culture.

### Procédures cliniques :

Les patients ont reçu 1 g d'amoxicilline par voie orale une heure avant l'opération.

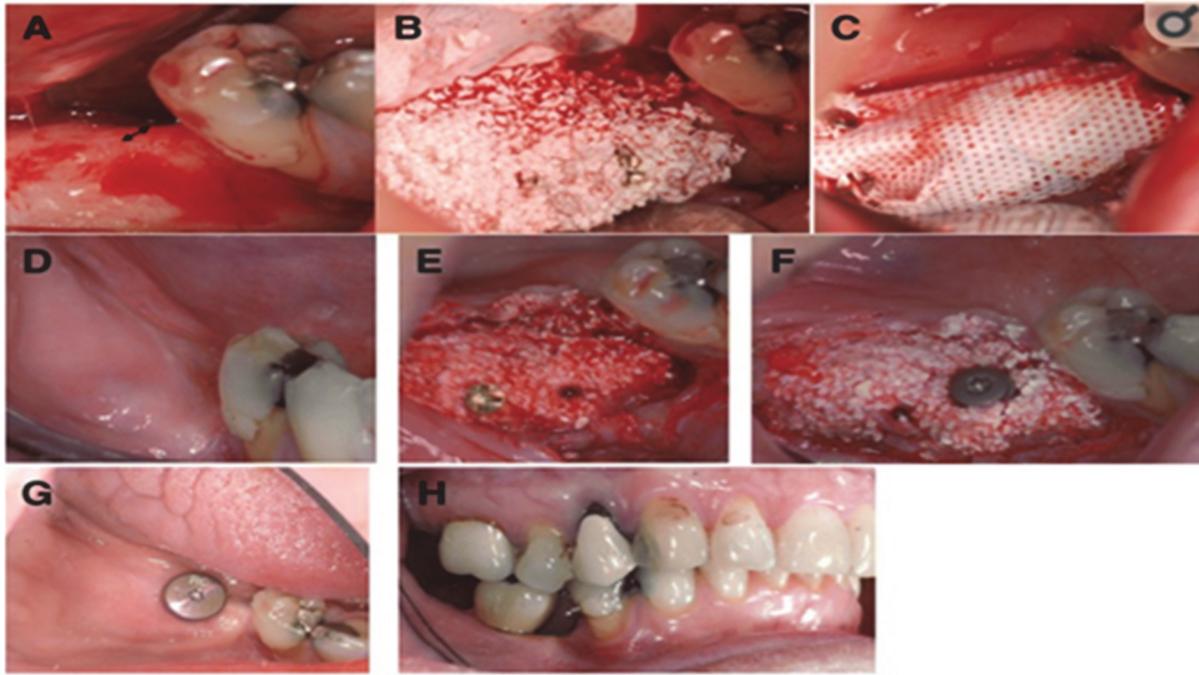


Figure 30 : Photographie de l'ensemble des étapes cliniques <sup>[54]</sup>

Comme le montrent les photographies per-opératoires Figure 30 ci-dessus :

1. Un lambeau a été soulevé et l'os cortical a ensuite été perforé d'une petite fraise ronde afin d'améliorer le flux sanguin et de faciliter la pénétration vasculaire dans les biomatériaux (A).
2. Des membranes de polytétrafluoroéthylène (PTFE) renforcées de titane et non résorbables ont ensuite été fixées à l'os sous-jacent par des mini-vis afin de créer des parois pour une augmentation osseuse verticale et horizontale. Et un mélange de BCP (comprenant 20% d'HA et 80% de  $\beta$ -TCP, sous la forme de granules de 0,5 – 1 mm de diamètre) et de cellules souches mésenchymateuses propre à chaque patient a été placé sur la crête alvéolaire (B). Les cellules souches mésenchymateuses ont été attachées aux granules de BCP dans des seringues avec un délai de contact de 60 min.

3. La greffe a été recouverte par une membrane (C), et les lambeaux muco-périostés.
4. Les patients ont été rappelés pour un examen clinique à 1, 2 et 4 mois (D) et des analyses CBCT ont été effectuées 4 et 6 mois après l'opération pour déterminer si les sites étaient prêts pour l'installation d'implants.
5. Avant la pose de l'implant, des biopsies osseuses ont été pratiquées pour évaluer par histologie la formation du nouvel os et la membrane a été retirée (E).
6. Le pilier a été réalisé 2 mois après la pose de l'implant (G) et une couronne vissée a été montée 2 à 4 semaines plus tard (H).

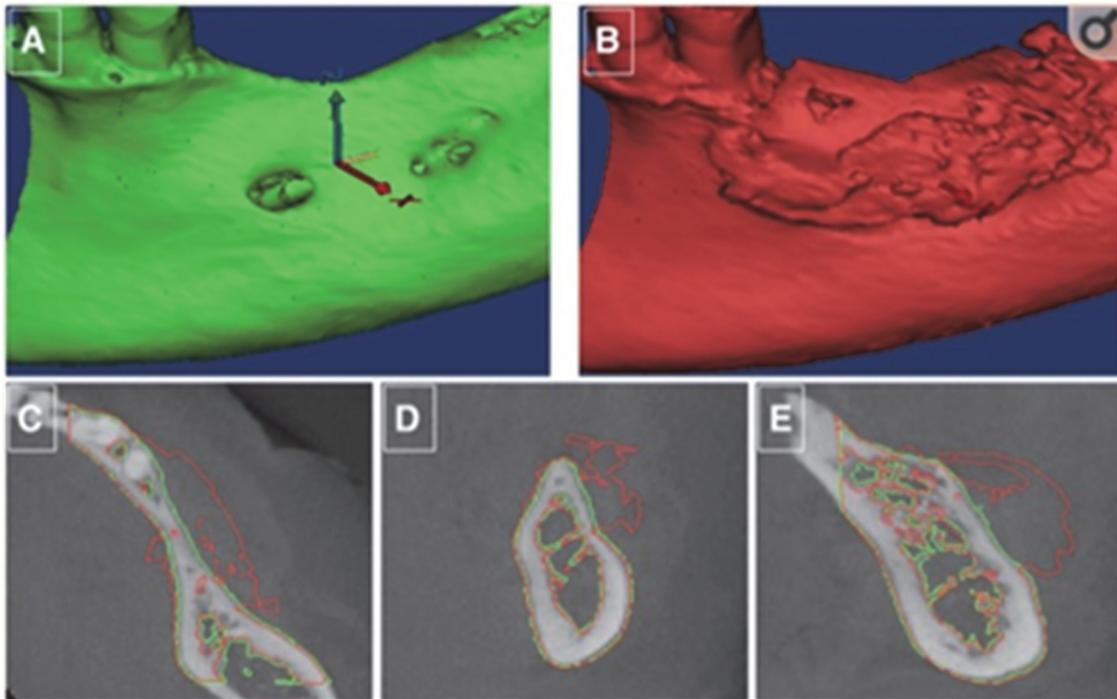
L'analyse histologique a révélé que les granules de BCP étaient bien intégrés avec le dépôt de tissu osseux nouvellement formé. Les échantillons de biopsies prélevés 4 à 6 mois après l'augmentation montraient une nouvelle formation osseuse importante, avec un apport sanguin abondant et sans cellules inflammatoires. Les granules de BCP ont démontré une dégradation et une dissolution continues, avec la présence de cellules multinucléées, des ostéoclastes et macrophages. Le temps de résorption de l'échafaudage BCP peut aller jusqu'à 2 ans.

Les principaux résultats de l'essai ont été la sécurité et la faisabilité de la procédure. Les 11 patients ont guéri sans problème de la zone augmentée, sans aucune infection locale. Aucun événement indésirable ne s'est produit pendant la période d'essai. Chez cinq patients, la membrane en PTFE a été exposée mais a été retirée sans incident 7 à 8 semaines après l'augmentation.

Tous les patients étaient satisfaits des résultats esthétiques et fonctionnels et aucun événement indésirable n'a été rapporté ou observé.

Un patient a signalé des douleurs modérées après une augmentation et après le retrait de la membrane exposée. Les autres patients n'ont signalé qu'une douleur mineure après l'opération. Tous les patients ont déclaré qu'ils recommanderaient cette procédure à d'autres personnes présentant un état clinique similaire.

Les résultats cliniques et radiologiques (Figure 31) montrent une guérison osseuse, une largeur et un volume osseux accrus. L'augmentation de la largeur et du volume de la crête alvéolaire était statistiquement significative. Le volume moyen des os a augmenté de 1 cm<sup>3</sup>.



**Figure 31 : Evolution dans le temps de la régénération osseuse à t0 (en vert) et 6 mois (rouge) <sup>[54]</sup>**

*Comme le montrent les reconstructions 3D, l'os greffé peut facilement être distingué de l'os résiduel par sa structure (en rouge sur le CBCT). La quantité de nouvel os a fortement été influencée par la position de la membrane. Les granules restés à l'extérieur du compartiment formé par la membrane n'induisent pas la formation d'os. Ce qui soutient l'importance de la membrane dans la formation osseuse.*

Les résultats secondaires étaient l'ostéointégration de l'implant dentaire et la fonction de la restauration prothétique, qui ont été validées par les valeurs de résonance magnétique. Tous les patients ont reçu des implants et des prothèses.

De plus, les tissus mous recouvrant la greffe présentaient une gencive kératinisée plus importante. La muqueuse kératinisée résorbée est connue pour ne pas se régénérer. Il apparaît donc que les cellules utilisées pour régénérer l'os ont également un effet positif paracrine sur les tissus mous voisins et contribuent à la cicatrisation des plaies.

L'utilisation de l'approche cellules souches / biomatériaux a favorisé une augmentation horizontale et une augmentation verticale. Le biomatériau seul n'aurait pas permis de combler les défauts osseux. Le pontage a été réalisé avec des combinaisons cellules souches mésenchymateuses / BCP.

La capacité intrinsèque des cellules souches mésenchymateuses à former de l'os rend l'essai reproductible et sûr, car les cellules n'ont pas été manipulées. Cependant, l'effet positif par « prédifférenciation » ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses pendant les phases d'isolement et d'expansion ne peut être exclu. De plus, aucun facteur de croissance ni stimulant n'a été utilisé sur les cellules avant l'implantation.

En raison des petites cohortes et du temps de suivi, les résultats prometteurs de ces études cliniques doivent être interprétés avec prudence. Des études plus poussées sont justifiées, avec des populations plus importantes et des périodes de suivi plus longues. De plus, d'autres axes de recherches nécessitent d'être éclairés, comme l'utilisation de cellules prédifférenciées, de signaux, voire de sources cellulaires allogéniques.

Néanmoins, ces résultats permettent l'élaboration de stratégies de médecine régénérative améliorées pouvant avoir un impact direct et positif sur de grands groupes de patients.

# CONCLUSIONS

---

La régénération osseuse n'est pas seulement basée sur des principes de développement cellulaire ou moléculaire, elle est aussi guidée par la biomécanique. La structure et la résistance mécanique de l'os varient selon les contraintes statiques ou dynamiques appliquées. Le plus grand défi est peut-être de développer des supports poreux, mécaniquement solides qui permettent la vascularisation et son intégration à l'hôte. À l'heure actuelle, la grande majorité des supports mécaniquement forts ont montré une régénération osseuse périphérique en raison du manque de vascularisation.

A ce jour, on essaie de favoriser la vascularisation et la formation osseuse en incorporant des facteurs de croissance dans les supports ou au travers de cellules génétiquement modifiées qui libèrent des molécules angiogéniques, anti-inflammatoires, ou ostéogéniques.

Bien que de nombreuses stratégies impliquant la thérapie cellulaire aient fait l'objet d'enquêtes précliniques, jusqu'à présent, seuls quelques-unes sont approuvées pour une utilisation clinique. Il s'agit principalement d'intervention à un seul composant impliquant cellules, facteurs ou biomatériaux.

Pour que l'ingénierie osseuse devienne une réalité clinique, elle doit incorporer les technologies récentes qui utilisent tous les composants nécessaires (c.-à-d. les supports, les cellules et les facteurs de croissance) pour une régénération osseuse réussie. Ces technologies qui comprennent plus de composants peuvent avoir plus de difficulté à obtenir une approbation réglementaire. De plus, elles représentent des coûts de fabrication élevés et sont spécifiques au patient.

Des méthodes plus efficaces d'isolement cellulaire, d'ensemencement et de culture doivent être développées afin de rationaliser le processus d'ingénierie et de réduire les risques associés aux manipulations pendant la période précédant l'implantation.

Les bioréacteurs peuvent combiner ces trois étapes et ouvrir la voie à une ingénierie des tissus osseux plus sûre et plus efficace. Ce support comprenant cellules et signaux ostéogéniques pourrait être combiné à l'impression d'un coffrage cortical 3D afin d'optimiser la régénération osseuse *in vivo*.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- 1 : Le B., Nurcombe V., Cool S. van Blitterswijk C., de Boer J., LaPointe V. (2018). « The components of bone and what they can teach us about regeneration. » *Materials*. 11(1): 14
- 2 : Rodan G., Martin T. (2000). « Therapeutic approaches to bone diseases. » *Sciences*. 289(5484) : 1508-1514
- 3 : Poirier, J. (2002). *Histologie : les tissus*. 2ème éd. France: Masson, Paris.
- 4 : Nakamura, H. (2007). "Morphology, function, and differentiation of bone cells". *J. hard tissue biology*. 16(1): 15-22
- 5 : Atkins, G., Findlay, D. (2012). "Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take". *Osteoporos Int*. 23(8): 2067-2079
- 6 : Marie, P. (2001). « Différenciation, fonction, et contrôle de l'ostéoblaste ». *Med. Scie*. 17(12)
- 7 : Gomez-Barrena E., Rosset P., Lozano D., Stanovici J., Ermthaller C., Gerbhard F. (2015). « Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. » *Bone*. 70: 93-101
- 8 : Mercado-Pagan A., Stahl A., Shanjani Y., Yang Y. (2015). « Vascularization in bone tissue engineering constructs. » *Ann. Biomed. Eng*. 43: 718-729
- 9 : Kinaci A., Neuhaus V., Ring D. (2014). « Trends in bone graft use in the United States. » *Orthopedics*. 37(9): e783-e788
- 10 : Dimitriou R., Jones E., McGonagle D., Giannoudis P. (2011). « Bone regeneration: current concepts and future directions. » *BMC Med*. 9: 66
- 11 : Peschanski, M. (2016) « Thérapie cellulaire: greffer des cellules souches pour soigner durablement. » Dossier d'information. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-cellulaire/>
- 12 : Faia-Torres A., Charnley M., Goren T., Guimond-Lischer S., Rottmar M., Maniura-Weber K., et al. (2015). « Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: a surface-roughness gradient study. » *Acta Biomater*. 28: 64-75
- 13 : Zan X., Sitasuwan P., Feng S., Wang Q. (2016). « Effect of roughness on in situ biomineralized CaP-collagen coating on the osteogenesis of mesenchymal stem cells. » *Langmuir*. 32(7): 1808-1817
- 14 : Zhou C., Hong Y., Zhang X. (2013). « Applications of nanostructured calcium phosphate in tissue engineering. » *Biomater. Sc*. 1(10): 1012-1028
- 15 : Sakkas A., Wilde F., Heufelder M., Winter K., Schramm A. (2017). « Autogenous bone grafts in oral implantology is it still a gold standard? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. » *Int. J. Implant. Dent*. 3(1): 23

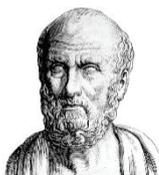
- 16 : Chiapasco M., Casentini P., Zaniboni M. (2009). « Bone augmentation procedures in implant dentistry. » *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 24: 237-259
- 17 : Gronthos S. (2004). *Reconstruction of human mandible by tissue engineering.* *Lancet.* 364(9436): 735-736
- 18 : Calori G., Mazza E., Colombo M., Ripamonti C. (2011). « The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? » *Injury.*42: S56-S63
- 19 : Songtao, S. (2016). « Oral and Craniofacial Reconstruction Using Mesenchymal Stem Cells. » California's Stem Cell Agency. <https://www.cirm.ca.gov/our-progress/awards/oral-and-craniofacial-reconstruction-using-mesenchymal-stem-cells>
- 20 : Huang Y., Zhou G., Zheng L., Liu H., Niu X., Fan Y. (2012). « Micro/nano sized hydroxyapatite directs differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells towards an osteoblast lineage. » 4(7): 2484-2490
- 21 : Kesiredy V., Kasper F. (2016). « Approaches for building bioactive elements into synthetic scaffolds for bone tissue engineering. » *J. Mater. Chem. Biol. Med.* 4(42): 6773-6786
- 22 : Arinze T., Tran T., McAlary J., Daculsi G. (2005). « A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem cell induced bone formation. » *Biomaterials.* 26(17): 3631-3638
- 23 : Kon E., Muraglia A., Corsi A. (2000). « Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheep long bones. » *J. Biomed. Mater. Res.* 49(3): 328-337
- 24 : Palomino C. (2019). *Hydrogels injectables et éponges à base de complexe polyelectrolytes (chitosane/polymère de cyclodextrine) pour une application en ingénierie tissulaire osseuse.* Thèse.
- 25 : Rajan A., Eubanks E., Edwards S., Aronovich S., Travan S., Rudek I., et al. (2014). « Optimized cell survival and seeding efficiency for craniofacial tissue engineering using clinical stem cell therapy. » *Stem Cells Transl. Med.* 3(12): 1495-1503
- 26 : Amini A., Laurencin C., Nukavarapu S. (2012). « Bone tissue engineering: recent advances and challenges. » *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40(5): 363-408
- 27 : James A., LaChaud G., Shen J., Asatrian G., Nguyen V., Zhang X., et al. (2016). "A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2." *Tissue Eng. Part B. Rev.* 22(4): 284-297
- 28 : Li X., Wang H., Touma E., Qi Y., Rousseau E., Quigg R., et al. (2007). « TP508 accelerates fracture repair by promoting cell growth over cell death. » *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364(1): 187-193
- 29 : Sheller M., Crowther R., Kinney J., Yang J., Di Jorio S., Breunig T., et al. (2004). « Repair of rabbit segmental defects with the thrombin peptide, TP508. » *J. Orthop. Res.* 22(5): 1094-1099
- 30 : Paralkar V., Borovecki F., Ke H., Cameron K., Lefker B., Grasser W., et al. (2003). « An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(11): 6736-6740

- 31 : Dozza B., Lesci I., Duchi S., Della Bella E., Martini L., Salamanna F., Falconi M., Cinotti S., Fini M., Lucarelli E., Donati D. (2017). « When size matters: differences in demineralized bone matrix particles affect collagen structure, mesenchymal stem cell behavior, and osteogenic potential. » *J. Biomed. Mater. Res.* 105(4): 1019-1033
- 32 : Yamamura N., Sudo R., Ikeda M., Tanishita K. (2007). « Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells. » *Tissue Eng.* 13: 1443-1453
- 33 : Lu W., Ji K., Kirkham J., Yan Y., Boccaccini A., Kellett M., Jin Y., Yang X. (2014). « Bone tissue engineering by using a combination of polymer/bioglasss composites with human adipose-derived stem cells. » *Cell Tissue Res.* 356(1): 97-107
- 34 : Igwe J., Mikael P., Nukavarapu S. (2012). « Design, fabrication and in vitro evaluation of novel polymer hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering. » *J. Regen. Med. Tissue Engin.*
- 35 : Tang D., Tare R., Yang L., Williams D., Ou K., Oreffo R. (2016). « Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. » *Biomaterials.*83: 363-382
- 36 : Ajaykumar V., Paul S., Songtao S., Murugan R. (2015). *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences.* Academic Press.
- 37 : Ho A., Wagner W., Franke W. (2008). « Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparation. » *Cytotherapy.* 10(4): 320-30
- 38 : Pittenger M., Mackay A., Beck S., Jaiswal R., Douglas R., Mosca J. (1999). « Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. » *Science.* 284(5411): 143-7
- 39 : Karantalis V., Schulman I., Balkan W., Hare J. (2015). « Allogenic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. » *Circ Res.* 116(1): 12-25
- 40 : Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. (2006). « Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. » *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy.* 8(4): 315-317
- 41 : Laino G., Graziano A., d'Aquino R., Pirozzi G., Lanza V., Valiante S. (2006). « An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. » *J. Cell Pysiol.* 206(3): 693-701
- 42 : Egusa H., Sonoyama W., Nishimura M., Atsuta I., Akiyama K. (2012). « Stem cell in dentistry – Part 1: Stem cell sources. » *J. Prosthodont Res.* 56(3): 151-65
- 43 : Cuisinier R. (2016). *L'utilisation des cellules souches dentaire : une avancée médicale à fort potentiel ?* Thèse.
- 44 : Stanko P., Kaiserova K., Altanero V., Altaner C. (2014). « Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. » *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov.* 158(3): 373-80
- 45 : Kawashima N. (2012). « Characterization of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? » *Arch Oral Biol.* 57(11): 1439-58

- 46 : Kaigler D., Pagni G., Park C., Braun T., Holman L., Yi E., et al. (2013). « Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial. » *Cell Transplant.* 22(5): 767-777
- 47 : Lee K., Chan C., Patil N., Goodman S. (2009). « Cell therapy for bone regeneration, bench to bedside. » *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* 89(1): 252-263
- 48 : Yang M., Zhang H., Gangolli R. (2014). « Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering. » *Curr Stem Cell Res Ther.* 9(3): 150-61
- 49 : Liao H., Chen C. (2014). « Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. » *World J. Stem Cells.* 6(3): 288-95
- 50 : Kandal S., Ozmen S., Uygur S., Yagci M., Kayhan H., Elmas C., Arac M., Celebi C. (2016). « Effects of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix on cranial bone healing. » *Ann. Plast. Surg.* 77(2): 249-254
- 51 : Brennan M., Renaud A., Amiaud J., Rojewski M., Schrezenmeier H., Heymann D., et al. (2014). « Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. » *Stem Cell Res. Ther.* 5(5): 114
- 52 : Gjerde C., De Santi D., Dominici M., Zanotti G., Hellem S., Piccinno S., Burns J., Murgia A., Candini O., Krampera M., Nocini P., Addis A., Amiaud J., Layrolle P., Mustafa K., Veronesi E. (2017). « Autologous porcine bone marrow mesenchymal cells for reconstruction of a resorbed alveolar bone: a preclinical model in mini-pigs. » *Int. J. Stem Cell Res. Ther.* 4(2): 1-11
- 53 : Pieri F., Lucarelli E., Corinaldesi G., Aldini N., Fini M., Parrilli A. (2010). « Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. » *Biomaterials.* 31(13): 3527-35
- 54 : Gjerde C., Mustafa K., Hellem S., Rojewski M., Gjengedal H., Yassin M., Feng X., Skaale S., Berge T., Rosen A., Shi X., Ahmed A., Gjertsen B., Schrezenmeier H., Layrolle P. (2018). « Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. » *Stem Cell Res. Ther.* 9: 213
- 55 : Cao F., Liu T., Xu Y., Xu D., Feng S. (2015). « Culture and properties of adipose-derived mesenchymal stem cells: characteristics in vitro and immunosuppression in vivo. » *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(7): 7694-7709
- 56 : Hicok K., Du Laney T., Zhou Y., Halvorsen Y., Hitt D., Cooper L. (2004). « Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. » *Tissue Eng.* 10(3-4): 371-80
- 57 : Liu J., Zhou P., Long Y., Huang C., Chen D. (2018). « Repair of bone defects in rat radii with a composite of a allogenic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone. » *Stem Cell Res. Ther.* 9: 79
- 58 : Sandor G., Numminen J., Wolff J., Thesleff T., Miettinen A., Tuovinen V., et al. (2014). « Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. » *Stem Cells Transl. Med.* 3(4): 530-540

- 59 : Takahashi K., Yamanaka S. (2006) *L'induction de cellules souches pluripotentes de souris embryonnaires et adultes par cultures avec facteurs définis*. Cell. Sou. Plu. Ind. vol. 126, n°4, p.663
- 60 : Takahashi K., Tanabe M., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007). *L'induction de cellules souches pluripotentes adultes de fibroblastes humains par des facteurs définis*. Cell. Sou. Plu. Ind. vol. 131, n°5, p.861-872
- 61 : Yu J., Vodyanik M., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J., Tian S. (2007). « Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells. » *Science*. 318(5858): 1917-20
- 62 : Bettina L. (2009). *Adult stem cell for clinical cell therapy: characterization and optimization of in vitro culture conditions of adult stem cells for clinical cell therapy*. Tampere Univ Pr.
- 63 : Veronesi E., Murgia A., Caselli A., Grisendi G., Piccinno M., Rasini V., et al. (2014). « Transportation conditions for prompt use of ex vivo expanded and freshly harvested clinical-grade bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for bone regeneration. » *Tissue Eng. Part C. Methods*. 20(3): 239-251
- 64 : Friedenstein A., Piatetzky-Shapiro I., Petrakova K. (1966). « Osteogenesis in transplants of bone marrow stem cells. » *Development*. 16(3): 381-90
- 65 : Xia X., Li H., Wang Z., Xu R., Fu Y., Zhang X., et al. (2011). « Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. » *Cell Biol. Int.* 35(6): 639-643
- 66 : Delorme B., Charbord P. (2007). « Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. » *Methods Mol Med*. 140: 67-81
- 67 : Chen Y., Li J., Kawazoe N., Chen G. (2017). « Preparation of dexamethasone-loaded calcium phosphate nanoparticles for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. » *J. Mater. Chem. B*. 5: 6801-6810
- 68 : Jaiswal N., Haynesworth S., Caplan A., Bruder S. (1997). « Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. » *J. Cell Biochem*. 64(2): 295-312
- 69 : Raynaud C., Rafii A. (2013). « The necessity of a systematic approach for the use of mesenchymal stem cells in the clinical setting. » *Stem Cells Int*. 2013: 892340
- 70 : Sandor G., Tuovinen V., Wolff J., Patrikoski M., Jokinen J., Nieminen E., et al. (2013). « Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice level adipose stem cells for bone regeneration. » *J. Oral Maxillofac. Surg*. 71(5): 938-950
- 71 : Yang X., Li Y., Liu X. (2017). « The stimulatory effect of silica nanoparticles on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. » *Biomed. Mat*. 12(1)
- 72 : Marie P.J. (2008). « Transcription factors controlling osteoblastogenesis. » *Arch. Biochem. Biophys*. 473(2): 98-105

- 73 : Liu Y., Wang G., Cai Y. (2009). « In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particules on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. » *J. Biomed. Mat. Res. Part A.* 90(4): 1083-1091
- 74 : Han X., Liu L., Wang F., Zhao X., Zhao D., Dai X., Li Y. (2012). « Reconstruction of tissue-engineering bone with bone marrow mesenchymal stem cells and partially deproteinized bone in vitro. » *Cell Biol. Int.* 36(11): 1049-1053
- 75 : Chen Y. Kawazoe N., Chen G. (2017). « Preparation of dexamethasone-loaded biphasic calcium phosphate nanoparticles/collagen porous composite scaffolds for bone tissue engineering. » *Acta Biomater.* 67: 341-353
- 76 : Mitra D., Whitehead J., Yasui O., Leach J. (2017). « Bioreactor culture duration of engineered constructs influences bone formation by mesenchymal stem cells. » *Biomater.* 146: 29-39
- 77 : Ying C., Shangwu C., Naoki K., Guoping C. (2018). « Promoted angiogenesis and osteogenesis by dexamethasone-loaded calcium phosphate nanoparticles/collagen composite scaffolds with microgrooved networks. » *Sci Rep.* 8: 14143  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6147787>
- 78 : Marcacci M., Kon E., Moukhachev V., Lavroukov A., Kute pov S., Quarto R., et al. (2007). « Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 years outcome of a pilot clinical study. » *Tissue Eng.* 13(5): 947-955
- 79 : Thesleff T., Lehtimaki K., Niskakangas T., Huovinen S., Mannerstorm B., Miettinen S., et al. (2017). « Cranioplasty with adipose-derived stem cells, beta-tricalcium phosphate granules and supporting mesh: six years clinical follow-up results. » *Stem Cells Transl. Med.* 6: 1576-1583
- 80 : Vural A., Odabas S., Korkusuz P., Yar Saglam A., Bilgic E., Cavusoglu T., Piskin E., Vargel I. (2017). « Cranial bone regeneration via BMP-2 encoding mesenchymal stem cells. » *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45(3): 544-550
- 81 : Caplan and al. (2007). « Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. » *J. Cell Physiol.* 213(2): 341-52
- 82 : Wang H., Li Y., Zuo Y., Li J., Ma S., Cheng L. (2007). « Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nanohydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. » *Biomater.* 28(22): 3338-3348
- 83 : Osugi M., Katagiri W., Yoshimi R., Inukai T., Hibi H., Ueda M. (2012). « Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. » *Tissue Eng. Part A.* 18(13-14): 1479-1489



## SERMENT MEDICAL

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'HIPPOCRATE.

Je promets et je jure, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine Dentaire.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

J'informerai mes patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des connaissances pour forcer les consciences.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois déshonoré et méprisé de mes confrères si j'y manque.



COHEN Gabriel – Les cellules souches pour induire la régénération osseuse.

Th. : Chir. dent. : Marseille : Aix-Marseille Université : 2019

Rubrique de classement : Recherche Odontologique

Résumé :

Les thérapeutiques de régénération osseuses sont fréquentes à la suite de lésions traumatiques, infectieuses ou tumorales. A ce jour, en chirurgie orale, les techniques de régénération osseuse sont efficaces mais peuvent s'avérer limitées en cas de défauts osseux dits de taille critique. C'est pourquoi, en parallèle du développement de supports à la régénération (substituts osseux), de nombreuses études ont été menées dans le cadre de la thérapie cellulaire et notamment par l'inclusion de cellules souches à ces biomatériaux. Dans un premier temps, des rappels sur la physiologie du tissu osseux ainsi que sur les substituts osseux disponibles seront brièvement présentés. Par la suite, les différentes cellules souches candidates à ces thérapeutiques ainsi que leurs sources seront présentées. Dans un second temps, les études disponibles sur l'obtention et l'utilisation des cellules souches seront présentées. Enfin, les travaux récents *in vivo* réalisés sur différents modèles animaux mais aussi chez l'homme seront décrits afin d'évaluer l'apport de cette approche cellulaire sur les thérapeutiques osseuses dans le domaine odontologique, combinant biomatériaux et cellules souches.

Mots-clés : Cellules souches, Régénération osseuse, Défauts osseux critique, Substituts osseux

COHEN Gabriel – Stem cells for bone regeneration induction.

Abstract :

Bone regeneration therapies are common procedures after traumatic, infectious or pathological bone loss. Although bone regeneration techniques are currently effective, their success is limited in critical size defects. That's why, in parallel to the development of supports for regeneration (bone substitutes), numerous studies have been conducted in the context of cell therapy, particularly by including stem cells to these biomaterials. An overview on the physiology of bone tissue as well as available bone substitutes will be briefly presented. Then, candidate stem cells and their sources will be presented. A description of studies on stem cell obtention techniques and their application will be presented. Finally, studies carried out on different animal models and humans will be described, in order to evaluate the benefit of this cellular approach in bone therapeutics in the dental field, combining biomaterials and stem cells.

MeSH : Stem cells, Bone regeneration, Critical bone disease, Bone substitutes.

Adresse de l'auteur :

Chemin de Cardeline

13790 Chateauneuf-le-Rouge