



**HAL**  
open science

# L'ingénierie tissulaire : implication des cellules souches dans la régénération osseuse

Camille Rodde

► **To cite this version:**

Camille Rodde. L'ingénierie tissulaire : implication des cellules souches dans la régénération osseuse. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03806069

**HAL Id: hal-03806069**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03806069v1>**

Submitted on 7 Oct 2022

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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

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

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**ACADÉMIE DE NANCY - METZ**  
**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ D'ODONTOLOGIE DE LORRAINE**

**ANNÉE 2021**

**N° [11601C]**

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement le : 11 mars 2021

par

**Camille RODDE**  
**Née le 10 mars 1994 à Metz (Moselle)**

**L'ingénierie tissulaire : Implication des cellules souches  
dans la régénération osseuse**

Composition du jury :

Président :

Pr. Éric MORTIER

Membre :

Dr. Marin VINCENT

Directeur de thèse :

Dr. Bérengère PHULPIN

Co-directeur de thèse :

Dr. Sébastien CLERC

**ACADÉMIE DE NANCY - METZ**  
**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ D'ODONTOLOGIE DE LORRAINE**

**ANNÉE 2021**

**N° [11601C]**

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement le : 11 mars 2021

par

**Camille RODDE**  
**Née le 10 mars 1994 à Metz (Moselle)**

**L'ingénierie tissulaire : Implication des cellules souches  
dans la régénération osseuse**

Composition du jury :

Président :

Pr. Éric MORTIER

Membre :

Dr. Marin VINCENT

Directeur de thèse :

Dr. Bérengère PHULPIN

Co-directeur de thèse :

Dr. Sébastien CLERC

*« Par délibération en date du 11 septembre 1972, la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propre à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation »*

Président : Professeur Pierre MUTZENHARDT

Doyen : Professeur Jean-Marc MARTRETTE

Vice-Doyens : Dr Céline CLEMENT – Dr Rémy BALTHAZARD – Dr Anne-Sophie VAILLANT

Membres Honoraires : Dr L. BABEL – Pr. S. DURIVAUX – Pr A. FONTAINE – Pr G. JACQUART – Pr D. ROZENCWEIG - Pr ARTIS

Doyens Honoraires : Pr J. VADOT, Pr J.P. LOUIS

<b>Département odontologie pédiatrique</b> <b>Sous-section 56-01</b>	Mme	<b>JAGER Stéphanie</b>	Maître de conférences *
	M.	PREVOST Jacques	Maître de conférences
	Mme	HERNANDEZ Magali	Maître de conférences *
	M.	HAINAUT Raphaël	Assistant
	Mme	HILT Léa	Assistante
	Mme	HOMBOURGER Morgane	Assistante
<b>Département orthopédie dento-faciale</b> <b>Sous-section 56-01</b>	M.	<b>VANDE VANNET Bart</b>	Professeur des universités *
	Mme	SENG Marilyne	Assistante *
	Mme	TRAN Mai-Linh	Assistante
<b>Département prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale</b> <b>Sous-section 56-02</b>	Mme	<b>CLÉMENT Céline</b>	Maître de conférences *
	M.	BAUDET Alexandre	Enseignant univ. – praticien attaché*
	Mme	CAIONE Mariette	Assistante
<b>Département parodontologie</b> <b>Sous-section 57-01</b>	M.	<b>AMBROSINI Pascal</b>	Professeur des universités *
	Mme	BISSON Catherine	Maître de conférences *
	M.	JOSEPH David	Maître de conférences *
	M.	LACH Patrick	Assistant
	Mme	ROCCHI Léa	Assistante
<b>Département chirurgie orale</b> <b>Sous-section 57-01</b>	M.	VEYNACHTER Thomas	Assistant *
	Mme	<b>GUILLET-THIBAUT Julie</b>	Maître de conférences *
	M.	BRAVETTI Pierre	Maître de conférences
	Mme	KICHENBRAND Charline	Maître de conférences *
	Mme	PHULPIN Bérengère	Maître de conférences *
	M.	CLERC Sébastien	Assistant*
	Mme	DE VERBIZIER Charlotte	Assistante
<b>Département biologie orale</b> <b>Sous-section 57-01</b>	Mme	PEREIRA Laure	Assistante
	M.	<b>YASUKAWA Kazutoyo</b>	Maître de conférences *
	M.	MARTRETTE Jean-Marc	Professeur des universités *
	Mme	EGLOFF-JURAS Claire	Maître de conférences *
	M.	LOISON-ROBERT Ludwig	Maître de conférences *
<b>Département dentisterie restauratrice, endodontie</b> <b>Sous-section 58-01</b>	M.	<b>MORTIER Éric</b>	Professeur des universités *
	M.	ENGELS-DEUTSCH Marc	Professeur des universités *
	M.	AMORY Christophe	Maître de conférences
	M.	BALTHAZARD Rémy	Maître de conférences *
	M.	VINCENT Marin	Maître de conférences*
	Mme	DAVRIL Jeanne	Assistante *
	M.	GIESS Renaud	Assistant *
	M.	GRABER Clément	Assistant
<b>Département prothèses</b> <b>Sous-section 58-01</b>	M.	<b>DE MARCH Pascal</b>	Maître de conférences
	Mme	CORNE Pascale	Maître de conférences *
	M.	SCHOUVER Jacques	Maître de conférences
	Mme	VAILLANT Anne-Sophie	Maître de conférences *
	M.	CIESLAK Steve	Assistant
	Mme	GERBER Caroline	Assistante *
	Mme	PRINTZ Elodie	Assistante
	M.	SYDA Paul-Marie	Assistant
	Mme	WILK Sabine	Assistante
	M.	HIRTZ Pierre	Enseignant universitaire
<b>Département fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux</b> <b>Sous-section 58-01</b>	Mme	<b>STRAZIELLE Catherine</b>	Professeur des universités *
	Mme	MOBY (STUTZMANN) Vanessa	Maître de conférences *
	M.	SALOMON Jean-Pierre	Maître de conférences
	Mme	JANTZEN-OSSOLA Caroline	Assistante associée

Souliqué : responsable de département

\* temps plein

Mis à jour le 1<sup>er</sup> février 2021

**À notre président de jury de thèse,**

**Professeur Éric MORTIER,**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur de l'université Henri Poincaré en physique-chimie de la matière et des matériaux

Habilité à diriger des recherches

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Responsable du département de dentisterie restauratrice, endodontie

Chef du service d'odontologie du CHRU de Nancy

*Vous nous faites l'honneur et le plaisir de présider notre jury de thèse.*

*Nous vous remercions pour vos qualités pédagogiques et humaines que nous avons pu apprécier durant nos années d'études.*

*Nous nous souviendrons de votre bienveillance et votre sympathie durant le monitorat de travaux pratiques d'odontologie conservatrice.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre sincère reconnaissance et de notre respectueuse admiration.*

**À notre juge et directrice de thèse,**

**Docteur Bérengère PHULPIN,**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur de l'Université Henri Poincaré Nancy I mention sciences de la vie et de la santé

Maître de conférences – Praticien Hospitalier

*Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de diriger ce travail.*

*Nous vous remercions de votre réactivité tout au long de ce travail, ce qui nous a permis de progresser rapidement dans son élaboration.*

*Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.*

**À notre juge et co-directeur de thèse,**

**Docteur Sébastien CLERC,**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Assistant Hospitalo-Universitaire

*Nous apprécions l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de codiriger notre travail.*

*Nous vous remercions pour votre gentillesse, votre accompagnement et votre disponibilité que vous nous avez accordé tout au long de ce travail et de ces années.*

*Que ce travail soit pour vous la preuve de la reconnaissance et de la sympathie que nous vous témoignons.*

**À notre juge,**

**Docteur Marin VINCENT,**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Maître de conférences – Praticien Hospitalier

Docteur de l'Université de Lorraine en mécanique et énergétique

*Nous apprécions l'honneur que vous  
nous faites en participant à notre jury de  
thèse.*

*Veillez trouver dans ce travail  
l'expression de notre sincère reconnaissance  
et de notre profond respect.*

## **Sommaire**

- 1. Introduction : Qu'est-ce que l'ingénierie tissulaire ?**
- 2. Données générales sur les substituts osseux actuels**
  - 2.1 Définition d'un substitut osseux
  - 2.2 Cahier des charges
  - 2.3 Les différents types de substituts osseux
  - 2.4 Les limites
- 3. L'intérêt des cellules souches dans la régénération osseuse**
  - 3.1 Données générales sur les cellules souches mésenchymateuses
  - 3.2 La régénération osseuse
  - 3.3 Protocole de production de substituts osseux à base de cellules souches
  - 3.4 Les différents PIT (produit d'ingénierie tissulaire) produits
  - 3.5 Implantation et suivi
- 4. Conclusions**
- 5. Références bibliographiques**
- 6. Références bibliographiques électroniques**

## Liste des figures

Figure 1 : stratégie de l'ingénierie tissulaire osseuse (source : Akkouch, 2012) .....	15
Figure 2 : les différents types de greffes (source : Akkouch, 2012).....	19
Figure 3 : les différents types de cellules souches (d'après : Caulfield, 2003) .....	24
Figure 4 : la différenciation des cellules souches (source : Fichelson, 2004).....	24
Figure 5 : le diagramme du processus mésenchymateux (d'après : Singer et Caplan, 2011).....	25
Figure 6 : les principales protéines non collagéniques (source : Bachy, 2015).....	34
Figure 7 : structure de l'hydroxyapatite (d'après : Touzeau, 2014).....	34
Figure 8 : disposition de l'hydroxyapatite entre les fibres de collagène (d'après : Peng, s.d.).....	35
Figure 9 : composition de l'os compact (d'après : Waner, 2019).....	35
Figure 10 : les différents types de cellules osseuses (source : document personnel) .....	36
Figure 11 : observation d'un ostéocyte sous microscope électronique (d'après : Adjlane, 2019) .....	37
Figure 12 : les différents types de tissus osseux (source : Celluloyd, 2015-2016) ....	39
Figure 13 : tissu osseux réticulaire sous microscope électronique (source : Nataf, 2009).....	40
Figure 14 : schéma représentant du tissu osseux réticulaire (source : Celluloyd, 2015-2016).....	40
Figure 15 : endroits où se trouve du tissu osseux réticulaire (d'après : Carter, date inconnue et Stovall, 2013).....	40
Figure 16 : les deux types de tissu osseux lamellaire (source : Celluloyd, 2015-2016) .....	41
Figure 17 : schéma représentant les lamelles du tissu osseux compact (source : Celluloyd, 2015-2016) .....	42
Figure 18 : schéma représentant un ostéon (source : Celluloyd, 2015-2016).....	42
Figure 19 : schéma représentant les systèmes de Havers (source : Celluloyd, 2015-2016).....	43
Figure 20 : tissu osseux compact haversien (diaphyse os long) (source : Nataf, 2009).....	44

Figure 21 : coupe d'une diaphyse d'un os long (source : Larousse Médical, 2009) ..	44
Figure 22 : les os plats comportent une épaisseur d'os spongieux (diploé), intercalée entre deux fines couches d'os compact (source : Marieb et Hoehn, 2019).....	45
Figure 23 : la microstructure de l'os trabéculaire et de la travée osseuse, à gauche : agrandissement de travées d'un os spongieux, à droite : détails d'une coupe de travée osseuse (source : Tortora et Grabowski, 2007) .....	45
Figure 24 : coupe représentant les tissus osseux compact et spongieux (source : Elsevier Masson, 2018).....	46
Figure 25 : coupe transversale de la diaphyse d'un os long (source : Marieb et Hoehn, 2019) .....	47
Figure 26 : schéma représentant une coupe sagittale d'incisive mandibulaire (source : document personnel).....	49
Figure 27 : ossification endochondrale d'un os long (source : Marieb et Hoehn, 2019).....	50
Figure 28 : ossification intra-membranaire (source : Marieb et Hoehn, 2019).....	51
Figure 29 : cycle ARIF (source : Société Française de Rhumatologie, s.d.) .....	53
Figure 30 : différenciation des CSM (source : Marie, 2001) .....	54
Figure 31 : différents marqueurs exprimés au cours de la différenciation des ostéoblastes (source : Marie, 2001) .....	54
Figure 32 : principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogenèse (source : Marie, 2001) .....	54
Figure 33 : régulation de la genèse des ostéoclastes par RANK/RANK-L/OPG (source : Owen et Reilly, 2018) .....	56
Figure 34 : équilibre RANKL/OPG (source : Celluloyd, 2015-2016).....	57
Figure 35 : Les étapes nécessaires à la construction d'un tissu par ingénierie tissulaire (source : Catros et coll., 2010) .....	60
Figure 36 : sources des différentes cellules souches dentaire (source : Egusa et coll., 2012).....	62
Figure 37 : anatomie et histologie de la papille apicale (source : Huang et coll., 2009) .....	64
Figure 38 : troisième molaire incluse avec son follicule (source : Egusa et coll., 2012) .....	65
Figure 39: comment obtenir des cellules iPS (source : Klingler, 2008) .....	72

Figure 40 : Procédé d'extraction de la pulpe dentaire (source : Alsulaimani et coll., 2016).....	73
Figure 41 : observation microscopique des ostéoblastes cultivés sur les supports Coll/HA/PLCL et PLCL au bout de 8 et 24 heures (source : Akkouch, 2012).....	85
Figure 42 : diagramme montrant le taux d'adhésion des ostéoblastes aux supports d'étude et de témoin (source : Akkouch, 2012).....	86
Figure 43 : diagramme indiquant le taux de croissance des ostéoblastes dérivés des DPSCs au sein des deux supports (source : Akkouch, 2012).....	86
Figure 44 : diagramme indiquant l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes des scaffolds Coll/HA/PLCL et PLCL (source : Akkouch, 2012) .....	87
Figure 45 : diagramme montrant le taux de minéralisation au sein des supports Coll/HA/PLCL et PLCL (source : Akkouch, 2012) .....	87
Figure 46 : photographies microscopiques des nodules osseux au sein des supports Coll/HA/PLCL (A) et PLCL (B) (d'après : Akkouch, 2012).....	88
Figure 47 : reconstruction en 3D du support Coll/HA/PLCL avant introduction des cellules ostéoblastique (A) et 2 semaines après (B) (source : Akkouch, 2012).....	89
Figure 48 : reconstruction d'os mandibulaire (source : Kang et coll., 2016).....	90
Figure 49 : photographie de la lésion avant implantation (source : Colangeli et coll., 2017).....	92
Figure 50 : tomodensitométries pré et post-opératoires (d'après : Colangeli et coll., 2017).....	93
Figure 51 : analyse de la tomodensitométrie indiquant un volume lésionnel de $48\text{cm}^3$ (source : Son et coll., 2018).....	94
Figure 52 : photographie durant la première opération (A) et lors du retrait du maillage (B) (source : Son et coll., 2018) .....	95
Figure 53 : orthopantomogrammes avant opération (A), après résection et insertion du maillage en titane (B), après retrait du maillage et titane (C) (source : Son et coll., 2018).....	96
Figure 54 : tomodensitométrie avant opération (A) et après retrait du maillage en titane (B) (source : Son et coll., 2018).....	96
Figure 55 : en A: seringues contenant les granules de BCP (a) et les cellules souches (b) ; en B: le mélange de BCP+cellules (d'après Gjerde et coll., 2018) .....	98
Figure 56 : photographies des étapes cliniques (source : Gjerde et coll., 2018).....	99

Figure 57 : tomodensitométrie pré-opératoire (en vert) et post-opératoire à 6 mois (en rouge) (source : Gjerde et coll., 2018).....	99
Figure 58 : coupes histologiques du tissu osseux prélevé lors de la biopsie ; en a et c : coloration à l'hématoxyline et à l'eosine (HE) ; en b et d : coloration au trichrome de Masson (source : Gjerde et coll., 2018).....	100
Figure 59 : situations pré-opératoire (A) et suite à la pose de l'implant (B) (source : Gjerde et coll., 2018).....	101

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : les principales caractéristiques des CSM.....	27
Tableau 2 : les différents types de collagène avec leur structure tertiaire et leur distribution tissulaire (d'après : Pariente et coll., 2006).....	32
Tableau 3 : les facteurs locaux intervenant au cours de l'ostéogenèse et leurs rôles.....	57
Tableau 4 : caractéristiques des différentes CSM orales (source : Liu et coll., 2015).....	69
Tableau 5 : scaffolds associables avec les DPSCs (d'après : Dave et Tomar, 2018)	79
Tableau 6 : données des patients (source : Colangeli et coll., 2017).....	93
Tableau 7 : plan de l'étude (source : Gjerde et coll., 2018).....	101
Tableau 8 : données cliniques démontrant l'augmentation du volume osseux (source : Gjerde et coll., 2018).....	102
Tableau 9 : résumé des différentes techniques de production de PIT .....	104

## 1. Introduction : Qu'est-ce que l'ingénierie tissulaire ?

La première utilisation du terme d'ingénierie tissulaire n'est pas connue. Dans les années 1970, le pédiatre Dr Green fut le premier à manipuler des chondrocytes afin de régénérer du tissu cartilagineux.

Il a ensuite fallu attendre 1988 avant d'en inventer le terme lors d'un atelier de la *National Science Foundation* ainsi que la définition suivante : « *L'ingénierie tissulaire ou génie tissulaire est l'ensemble des techniques faisant appel aux principes et aux méthodes de l'ingénierie, de la culture cellulaire, des sciences de la vie, des sciences des matériaux pour comprendre les relations entre les structures et les fonctions des tissus normaux et pathologiques des mammifères, afin de développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus.* » (Vishwakarma et coll., 2015)

De nombreux matériaux existent afin de combler des défauts osseux et d'induire une régénération des tissus osseux, cependant ils ont leurs limites. Depuis quelques années, les chercheurs s'intéressent au pouvoir des cellules souches associées à un support afin de régénérer du tissu osseux.

L'ingénierie tissulaire du tissu osseux repose sur la combinaison de trois éléments : des cellules à potentiel ostéogénique, un support spécifique ainsi que des facteurs de croissance spécifiques du tissu osseux (figure 1).

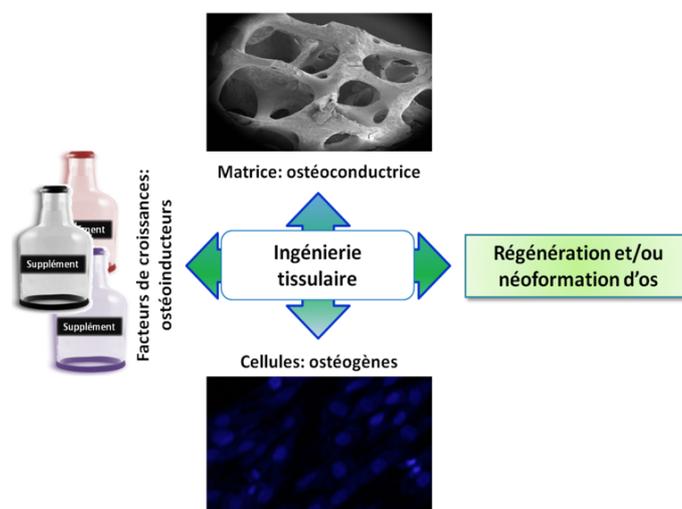


Figure 1 : stratégie de l'ingénierie tissulaire osseuse (source : Akkouch, 2012)

Ce travail a pour but d'étudier l'intérêt que pourraient apporter les cellules souches et la thérapie cellulaire dans la régénération de défauts osseux importants. Nous commencerons par énoncer les substituts osseux actuels ainsi que leurs limites expliquant l'intérêt pour la thérapie cellulaire.

Après avoir présenté les cellules souches et rappelé la physiologie du tissu osseux, nous parlerons de l'implication des cellules souches dans la thérapie cellulaire et dans l'ingénierie tissulaire osseuse afin de synthétiser des substituts osseux permettant le comblement de larges défauts osseux.

## 2. Données générales sur les substituts osseux actuels

### 2.1 Définition d'un substitut osseux

La SOFROT (Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique) , qui est la réunion de deux sociétés que sont le GRECO (Groupe de Recherche en Chirurgie Orthopédique) et le GESTO (Groupe pour l'Étude des Substituts Tissulaires et Osseux en Orthopédie) a, en 2011, proposé une définition du substitut osseux : « *Tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique :*

- 1) *destiné à l'implantation chez l'homme ;*
- 2) *dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux ;*
- 3) *par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique »* (HAS, 2013).

Ainsi, les substituts ont pour rôle de combler un défaut osseux suite à un traumatisme ou à une chirurgie. Leur but est également d'apporter un soutien mécanique supplémentaire et d'induire une bonne cicatrisation des tissus environnants (Jordana et coll., 2017).

Indiquons ci-dessous quelques définitions supplémentaires proposées par la Haute Autorité de Santé en 2013 (HAS, 2013) :

- Biomatériau : « *matériau destiné à être en contact avec les tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps »* (Jordana et coll., 2017)
- Ostéogenèse : « *processus de formation de la matrice osseuse sans indication sur l'origine cellulaire (issue de la greffe ou de l'hôte) »*
- Ostéoconduction : « *propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu receveur au contact de ce matériau »*
- Ostéoinduction : « *processus de stimulation par des protéines conduisant à la prolifération et/ou à la différenciation de cellules souches en matrice osseuse minéralisable »*.

## 2.2 Cahier des charges

Le substitut osseux idéal doit ressembler le plus possible à l'os du point de vue :

- De la composante chimique
- Du taux de matière se trouvant dans l'état cristallin
- De la taille des cristaux
- De la surface
- De l'irrégularité de surface
- De la microporosité.

Ainsi, l'archétype du substitut osseux se doit d'être biocompatible, biologiquement résorbable, d'utilisation aisée, stérilisable, peu onéreux tout en étant structurellement semblable au tissu osseux, ayant une matrice ostéoconductrice, mais également d'enclorre des facteurs ostéoinducteurs (dont le rôle est de recruter et d'activer les cellules osseuses et ainsi d'induire la régénération osseuse) (Patel et coll., 2011 ; Jordana et coll., 2017).

À ce jour, malheureusement aucun substitut ne remplit tous ces critères. De ce fait, les substituts sont généralement utilisés en association avec des membranes, de l'os autologue (c'est-à-dire propre au patient), des matériaux d'ostéosynthèse ou des techniques utilisant les dérivés sanguins (telles que le PRF (*platelet-rich fibrin*) par exemple).

Ainsi, le choix du substitut osseux dépend entièrement du praticien, qui se basera sur le volume osseux requis ainsi que sur la localisation anatomique de celui-ci, mais également sur l'origine du substitut, de sa capacité à être injecté et façonné ainsi que sa vitesse de résorption.

## 2.3 Les différents types de substituts osseux

Les substituts osseux peuvent être de source naturelle, plus précisément d'origine humaine, animale ou végétale, ou de source synthétique (figure 2). Ils se présentent soit sous forme :

- Solide : de formes particulières tels que des granulés, de la poudre, des copeaux et des lamelles ; de formes géométriques tels que des bâtonnets, des coins, des sphères, etc. ; de formes anatomiques (HAS, 2013)
- Liquide de densités plus ou moins élevées.

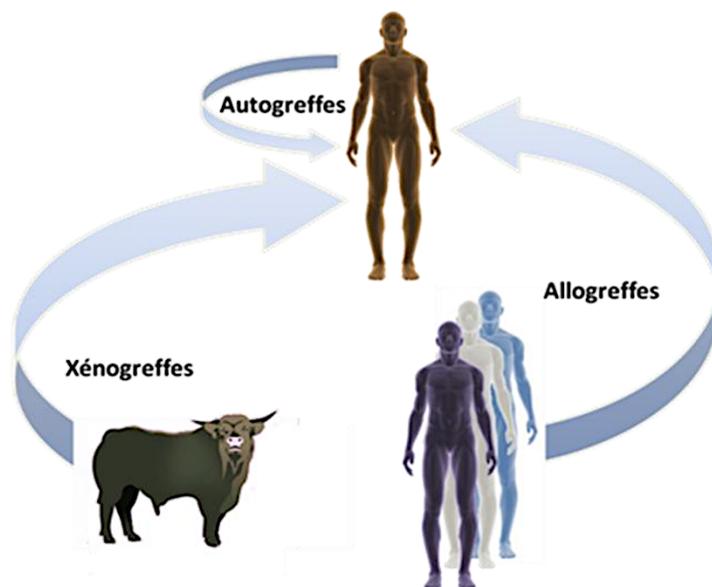


Figure 2 : les différents types de greffes (source : Akkouch, 2012)

### 2.3.1 D'origine humaine

Parmi les substituts d'origine humaine, on distingue les allo greffes et les auto greffes.

Les allo greffes osseuses sont des portions de tissu osseux transplantés d'un individu appelé donneur à un autre de la même espèce appelé receveur. Les allo greffes sont tout aussi bien ostéo-inductrices qu'ostéo-conductrices.

En général, l'os est congelé et même lyophilisé après avoir été traité afin d'exclure au maximum le risque de transmission de maladies et de réactions immunitaires (Jordana et coll., 2017).

Les autogreffes proviennent du même individu, qui est donc à la fois donneur et receveur. Le greffon peut provenir de la branche montante mandibulaire (ramus), de la zone rétro-molaire, de l'os iliaque ou encore de l'os pariétal (Colat-Parros et Jordana, 2009).

### 2.3.2 Les xéno greffes d'origine animale

Les xéno greffes sont issues de tissus d'individus d'espèces différentes à celle du receveur. Ainsi elles peuvent provenir du corail, de la nacre, de la seiche ou des mammifères (bovins, ovins, équidés, porcins). Les bovins sont la source la plus courante.

Les tissus sont soit non viables soit ils le sont rendus via des traitements qui consistent à supprimer les débris cellulaires, les protéines et les lipides, à inactiver les virus et les prions et enfin à stériliser le tout par irradiation. De ce fait, le risque de transmission de maladies et d'immunogénicité est rendu quasiment nul (Colat-Parros et Jordana, 2009).

Les xéno greffes ont un pouvoir ostéoconducteur ainsi qu'ostéoinducteur (HAS, 2013). Leur intérêt majeur réside dans le fait que leur structure (porosité) ressemble fortement à celle du tissu osseux humain et ont donc des propriétés biomécaniques semblables, ce qui en fait un matériau intéressant en zone de fortes contraintes mécaniques.

Les coraux ont la particularité d'avoir un exosquelette constitué de carbonate de calcium. En le soumettant à de hautes températures, on élimine la phase organique (processus de céramisation de la trame phospho-calcique) et on obtient de l'hydroxyapatite (HA ) biocompatible (HAS, 2013).

Le même processus de frittage de l'HA est utilisé sur l'os bovin après suppression de sa phase organique (éliminer les risques de transmission de zoonoses). Les substituts osseux d'origine bovine sont les plus utilisés en raison de leurs similitudes avec le tissu osseux humain ce qui apporte une bonne ostéoconduction et vascularisation du greffon.

L'HA biocompatible obtenu fait office de support aux facteurs de croissance et permet ainsi l'adhésion, la croissance et la différenciation des cellules.

### 2.3.3 Les xéno greffes d'origine végétal

L'algue marine rouge, tout comme le corail, possède un exosquelette calcifié fait de carbonate de calcium. Tout comme pour le corail, la céramisation permet d'obtenir de l'HA biocompatible (Jordana et coll., 2017).

### 2.3.4 D'origine synthétique

Les substituts osseux d'origine synthétiques représentent 60% des substituts osseux. Ils sont définis comme « *ne portant aucun dérivé ou tissu d'origine biologique et n'étant pas issus de tels dérivés* » (HAS, 2013). Leurs caractéristiques chimiques, structurelles ainsi que leurs propriétés peuvent être adaptées en fonction des besoins.

On distingue différents types :

- Les céramiques phosphocalciques : Leur composition chimique est similaire à celles de l'os. Disponibles sous plusieurs formes, elles sont ostéoconductrices car servent de support aux cellules ostéoformatrices. Parmi ces céramiques on trouve : l'HA, le phosphate tricalcique ( $\alpha$  et  $\beta$ TCP), les biphasées (BCP) (qui sont l'association d'HA et de  $\beta$ TCP) et les multiphasées (associant HA,  $\beta$ TCP et ciment ionique phosphate dicalcique dihydraté)

- Les bioverres : Ils sont principalement composés de silice, d'oxyde de sodium, d'oxyde de calcium et de phosphates. Ils jouent aussi bien un rôle ostéoconducteur qu'ostéoinducteur.
- Le sulfate de calcium : C'est le plus ancien des substituts osseux. Mélangé à de l'eau, il devient ce qu'on appelle communément le « plâtre de Paris ». Il est certes non poreux, mais il a l'avantage de bien se résorber et il est possible d'y inclure des antibiotiques.

### 2.3.5 Les matériaux composites

Ils sont composés d'une partie inorganique et d'une partie organique. La partie inorganique est constituée d'une phase phosphocalcique (HA,  $\beta$ TCP, phosphate de calcium), tandis que la phase organique peut se composer de collagène, de polymères, ... Ainsi ils ont à la fois des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices (HAS, 2013).

Leurs avantages sont d'être biocompatibles mais également d'avoir des propriétés biomécaniques modulables en fonction de leur phase inorganique.

## 2.4 Les limites

Malgré tous leurs avantages, ces types de substituts osseux présentent également des inconvénients.

Le risque des d'allogreffes est de transmettre des pathologies bactériennes ou virales même après traitement du greffon. Les rayons gamma utilisés afin de stériliser le greffon peuvent altérer sa capacité d'ostéoinduction. De plus, en dépit de l'irradiation, une réaction immunitaire du receveur n'est pas à exclure.

Les autogreffes nécessitent un second site d'intervention ce qui peut induire de possibles douleurs, inflammations ou troubles sensoriels sur le site de ponction. La durée de l'opération est rallongée ce qui majore le risque infectieux. De surcroît, le site de prélèvement et son mode d'ossification jouent sur la résorption du greffon qui peut être totale (Colat-Parros et Jordana, 2009).

Les greffons d'origine xénogénique, bien que stérilisés, sont susceptibles de transmettre des maladies zoonotiques. De plus, ils ne sont pas indiqués pour régénérer des défauts osseux de grands volumes.

Concernant les substituts synthétiques, les bioverres ne peuvent servir de support structurel et sont par conséquent peu intéressants à combiner avec des cellules. En prime, après cicatrisation, ils ne peuvent pas être retirés sans endommager l'os.

Le sulfate de calcium ou plâtre de Paris a une activité ostéoconductrice nulle et supporte mal les forces mécaniques, ce qui fait de lui un matériau peu adapté pour la régénération de tissu osseux.

À l'instar des matériaux d'origine xénogénique, les matériaux composites ne sont pas propices aux défauts osseux de large étendue.

Ces facteurs limitent en certains points la bonne régénération osseuse, ce qui a mené les scientifiques à se tourner vers l'usage d'autres matériaux en combinaison avec des cellules souches.

### 3. L'intérêt des cellules souches dans la régénération osseuse

La cellule est l'unité fondamentale du corps humain. Tout tissu qui compose notre corps provient de la différenciation de cellules souches en cellules tissulaires spécifiques.

On distingue plusieurs types des cellules souches (figure 3). Nous avons les cellules souches embryonnaires, fœtales et adultes.

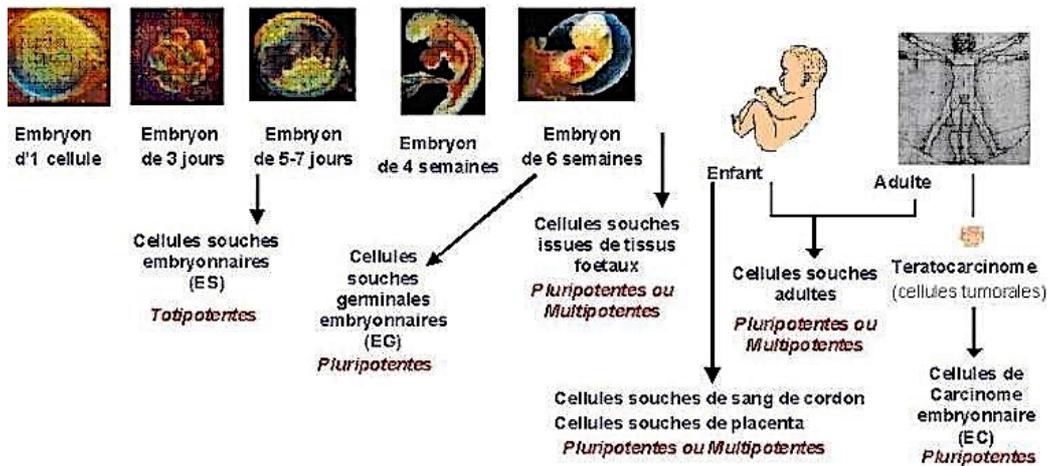


Figure 3 : les différents types de cellules souches (d'après : Caulfield, 2003)

Lors de l'embryogenèse, les cellules issues des premières divisions de l'ovocyte sont appelées cellules souches totipotentes (figure 4). Comme leur nom l'indique, elles sont capables de se différencier en tous types de cellules, mais également de générer un nouvel individu dans son intégralité.

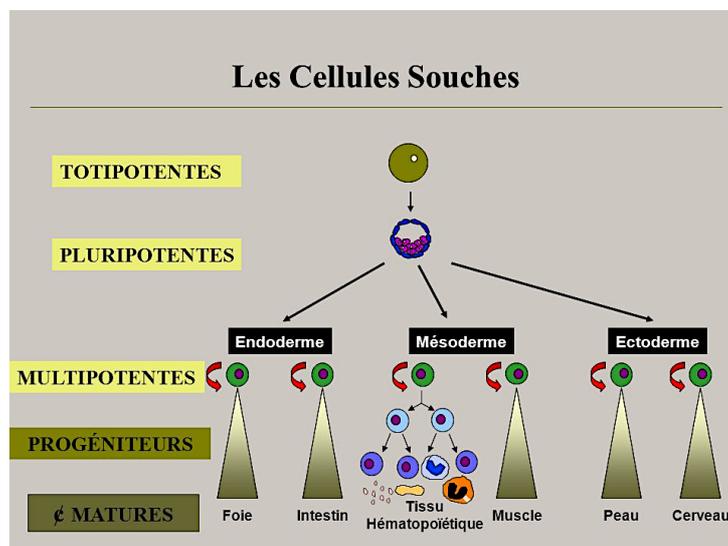


Figure 4 : la différenciation des cellules souches (source : Fichelson, 2004)

- Stade embryonnaire

À partir du quatrième jour de l'embryogenèse, apparaissent les cellules souches embryonnaires pluripotentes.

Ce sont elles qui sont à l'origine des trois lignées de cellules multipotentes qui vont donner les trois feuillet (lors du processus de gastrulation) : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme.

- Stade foetal

Au stade foetal on distingue donc dans chaque feuillet une lignée de cellules souches multipotentes différente : les cellules souches de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme.

- Stade post-natal

Dès la naissance, les cellules souches retrouvées sont dites adultes. Elles sont de nature multipotentes ou unipotentes, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent engendrer qu'un seul type cellulaire.

Nous ne nous intéresserons qu'aux cellules souches multipotentes adultes issues du mésenchyme (qui dérivent du mésoderme) : les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (figure 5) (David, 2015).

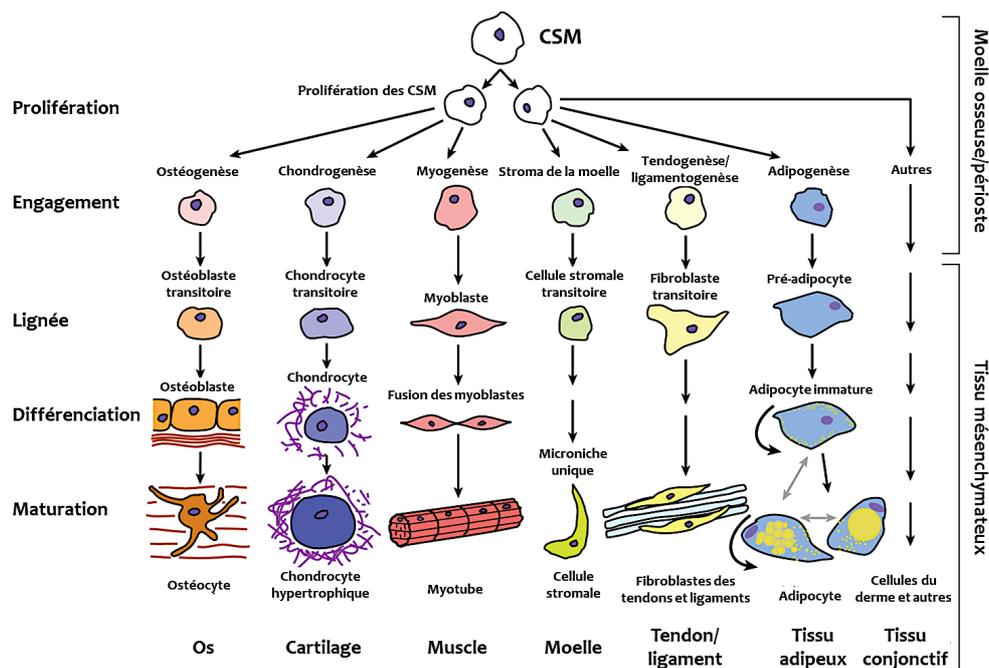


Figure 5 : le diagramme du processus mésenchymateux (d'après : Singer et Caplan, 2011)

### 3.1 Données générales sur les cellules souches mésenchymateuses

#### 3.1.1 Définition

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent une des deux lignées de cellules souches issues des cellules souches multipotentes adultes. L'autre lignée correspond aux cellules souches hématopoïétiques.

C'est grâce au cochon d'Inde, qu'en 1970, Friedenstein a identifié pour la première fois les CSM dans la moelle osseuse (MO) (Chen et coll., 2008). Or la moelle osseuse n'est pas la seule « niche » de CSM.

En effet, on les localise aussi dans le tissu adipeux, la membrane synoviale, l'os trabéculaire, le périoste, le derme, les poumons, le muscle squelettique, la pulpe dentaire, le sang périphérique mais également dans le fœtus et plus particulièrement au niveau du placenta, dans le liquide amniotique et le cordon ombilical (sang ombilical et gelée de Wharton) (Caplan, 1991 ; Kolf et coll., 2007 ; Chen et coll., 2008). Il existe de nombreuses façons de définir les cellules souches mésenchymateuses, mais en règle générale ce sont des cellules « *immatures, capables de générer plusieurs types cellulaires et propres à l'auto-renouvellement* » (Reppel, 2011 ; Roubex, 2014).

#### 3.1.2 Caractéristiques

Retenons ici les principales caractéristiques qui permettent de différencier les CSM des autres lignées de cellules multipotentes (tableau 1).

L' ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) a émis des critères standards minimums caractérisant les CSM, afin de faciliter le travail de la communauté scientifique (Reppel, 2011).

Tableau 1 : les principales caractéristiques des CSM

Caractéristique	Explications
<b>Adhésion au plastique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhérentes au plastique dans un environnement de culture cellulaire, c'est-à-dire <i>in vitro</i> (Dominici et coll., 2006)</li> </ul>
<b>Présence de marqueurs de surface (antigènes) spécifiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression d'une cinquantaine de protéines de membrane</li> <li>• Expression obligatoire de CD73, CD90 et CD105</li> <li>• Absence des marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79<math>\alpha</math> et HLA-II (Dominici et coll., 2006)</li> </ul>
<b>Multipotence</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capables de se différencier en plusieurs lignées de cellules mésenchymateuses (qui déterminent les tissus du mésoderme)</li> <li>• À l'origine de la lignée des cellules osseuses, cartilagineuses et adipocytaires (Charbord et Casteilla, 2011)</li> </ul>
<b>Immaturité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peuvent donner naissance à des cellules différentes d'elles-mêmes (impossible pour une cellule tissulaire spécifique)</li> <li>• Par division symétrique (une CSM donne deux cellules filles tissulaires spécifiques) ou asymétrique (une CSM donne une cellule fille tissulaire spécifique et une nouvelle CSM mère) on obtient une cellule fille spécifique d'un tissu (Charbord et Casteilla, 2011)</li> </ul>
<b>Auto-renouvellement</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aptes à engendrer des nouvelles CSM mères via des mitoses symétriques et asymétriques</li> <li>• Assure le stock de CSM dans les « niches » (Zipori, 2011)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phénomène largement plus observable <i>in vitro</i> qu'<i>in vivo</i> en raison de la sénescence cellulaire (Reppel, 2011)</li> </ul>				
<b>Plasticité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>« <i>L'aptitude des CS à générer des cellules n'appartenant pas à leur tissu d'origine</i> » (Reppel, 2011)</li> <li>CSM peuvent se différencier en cellules non mésodermiques (p.ex. : neurones, cellules vasculaires du muscle lisse, cellules stromales) → reprogrammation par transdifférenciation</li> <li>Reprogrammation par transdifférenciation ou par dédifférenciation</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th>transdifférenciation</th> <th>dédifférenciation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>capacité d'une cellule différenciée (ou non, p.ex. une CSM) à acquérir les caractéristiques d'une autre lignée tissulaire sans passer par l'état de CS indifférenciée</td> <td>dédifférenciation en CS puis différenciation en un type cellulaire spécifique, se produisent lors de changements d'environnements (sous l'influence de nouveaux facteurs extra-cellulaires) (Chen et coll, 2008 ; Zipori, 2011)</td> </tr> </tbody> </table>	transdifférenciation	dédifférenciation	capacité d'une cellule différenciée (ou non, p.ex. une CSM) à acquérir les caractéristiques d'une autre lignée tissulaire sans passer par l'état de CS indifférenciée	dédifférenciation en CS puis différenciation en un type cellulaire spécifique, se produisent lors de changements d'environnements (sous l'influence de nouveaux facteurs extra-cellulaires) (Chen et coll, 2008 ; Zipori, 2011)
transdifférenciation	dédifférenciation				
capacité d'une cellule différenciée (ou non, p.ex. une CSM) à acquérir les caractéristiques d'une autre lignée tissulaire sans passer par l'état de CS indifférenciée	dédifférenciation en CS puis différenciation en un type cellulaire spécifique, se produisent lors de changements d'environnements (sous l'influence de nouveaux facteurs extra-cellulaires) (Chen et coll, 2008 ; Zipori, 2011)				
<b>Immunosuppression</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Capables de libérer (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>) des facteurs inhibiteurs de certaines cellules de l'immunité (Reppel, 2011)</li> </ul>				
<b>Quiescence</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ne se différencient et prolifèrent que lorsqu'il y a lésion ou atteinte des cellules tissulaires issues du feuillet mésodermique</li> </ul>				

### 3.1.3 Intérêt des CSM

De nombreuses sources cellulaires sont utilisables en ingénierie du tissu osseux.

Les cellules humaines différenciées autologues obtenues à partir d'os spongieux ou alvéolaire en sont une. Cependant, leur culture est compliquée par la faible quantité cellulaire récoltée ainsi qu'un potentiel de prolifération et de différenciation inférieur à celui d'autres types cellulaires (Xiao et coll., 2003). De plus, un grand nombre de cellules issus du tissu donneur est nécessaire afin de les faire proliférer *in vitro* sans mutation génétique (Usunier, 2016). Ainsi, les scientifiques se sont tournés vers d'autres types de cellules souches plus adéquats à l'utilisation clinique.

Les cellules souches embryonnaires possèdent un avantage majeur : l'auto-renouvellement *in vitro* (Usunier, 2016). De plus, elles sont de nature pluripotente, ce qui explique leur différenciation ostéoblastique en présence de facteurs ostéogéniques (Jukes et coll., 2010). Cependant, l'utilisation et la manipulation des cellules souches embryonnaires suscitent des problèmes d'ordre réglementaire et éthique (Vinatier et coll., 2011).

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS), dont nous étayerons les caractéristiques ultérieurement, semblent également être une source indiquée en ingénierie du tissu osseux. En effet, du point de vue biologique, elles possèdent des caractéristiques similaires aux cellules embryonnaires et aucun obstacle éthique n'entrave leur utilisation (Usunier, 2016). Pourtant, elles impliquent de nombreuses manipulations techniques insuffisamment développées pour une utilisation clinique (Vinatier et coll., 2011). De surcroît, la conservation phénotypique étant incertaine, il en découle un risque de carcinogenèse non nul (Usunier, 2016).

Par conséquent, le choix des cellules à des fins d'utilisation clinique se porte sur les CSM. La première raison pour expliquer le choix des CSM pour la production de substituts osseux à base de cellules souches est la différenciation des CSM en précurseurs d'ostéocytes. Pour rappel, la multipotence des CSM se porte en premier lieu sur les trois lignées de cellules tissulaires : ostéocytaire, chondrocytaire et adipocytaires.

Ajoutons à cela, quelques autres caractéristiques intéressantes pour justifier le choix des CSM :

- Les CSM sont aisément isolables à partir d'un modeste échantillon de moelle osseuse.
- Elles ont un fort potentiel d'expansion *in vitro*. On peut ainsi facilement cultiver des colonies de milliards de CSM.
- On observe une reproductibilité des caractéristiques principales des CSM dans les différentes études.
- Elles ont un fort potentiel de réparation des tissus via migration cellulaire lorsque ceux-ci sont lésés (Pittenger MF et Martin BJ, 2004).

## 3.2 La régénération osseuse

### 3.2.1 La physiologie du tissu osseux

#### a) Généralités

L'os, résultant du fruit de la croissance du tissu osseux (25%) avec la moelle osseuse (60%), les espaces conjonctivo-vasculaires (5%), le périoste, l'endoste et le cartilage articulaire (10%), constitue le squelette qui caractérise tous les vertébrés (McLeer, 2019).

L'os et plus précisément les espaces médullaires renferment la moelle hématopoïétique, qui est l'endroit de la production des cellules sanguines (via l'hématopoïèse).

Enfin, l'os joue un rôle biomécanique de par sa capacité à résister à toute force exercée sur lui (André et coll., 2008 ; Thomas et coll., 2008).

#### b) Composition

Le tissu osseux se compose :

- D'une matrice extra-cellulaire (MEC) rigide car calcifiée.
- Et de cellules spécifiques de l'ostéogenèse (les cellules bordantes et les ostéoblastes), de la résorption osseuse (les ostéoclastes) et d'ostéocytes.

- La matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire se compose d'une phase organique et d'une phase minérale.

La phase organique est constituée de protéines collagéniques que sont les fibres de collagène et d'une substance fondamentale (eau et protéines).

Une fibre de collagène est une glycoprotéine rigide d'aspect fibreux. Les fibres de collagène représentent environ 90-95% de la portion organique. Quarante-vingt pour cent de ces fibres sont des fibres de collagène de type I.

On ne retrouve ni collagène de type II ni fibre élastique au sein de la matrice, ce qui explique sa rigidité (McLeer, 2019).

Contrairement au collagène de type II qui n'est constitué que d'une seule chaîne  $\alpha$ , le collagène de type I en possède deux (tableau 2).

Tableau 2 : les différents types de collagène avec leur structure tertiaire et leur distribution tissulaire (d'après : Pariente et coll., 2006)

	Type	Formule Moléculaire	Forme Polymérisée	Distribution tissulaire
Formant des fibrilles	I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Fibrille	Os, peau, tendons, ligaments, cornée, organes internes <b>(90% du collagène corporel)</b>
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrille	Cartilage, disque intervertébral, notochorde, humeur vitrée
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrille	Peau, vaisseaux sanguins, organes internes

La substance fondamentale de la phase organique est constituée à moitié d'eau.

Le reste de l'espace est occupé par des protéines dites non collagéniques, que l'on peut classer en trois groupes :

1) Les protéines non collagéniques osseuses, qui en sont le constituant majeur et font entièrement partie de la matrice.

Elles sont synthétisées par les ostéoblastes (Le Doan et coll., 2017).

On retrouve par exemple (figure 6) :

- L'ostéocalcine, qui est un marqueur des ostéoblastes, a un tropisme pour l'hydroxyapatite de calcium et joue un rôle dans la régulation locale du métabolisme osseux (Toppets et coll., 2004).
- L'ostéonectine possède également une forte affinité pour l'hydroxyapatite de calcium ainsi que pour les fibres de collagène de type I, bien qu'elle ne soit pas spécifique de l'os. Avec l'ostéocalcine, elles sont impliquées dans la minéralisation via leur affinité pour les fibres de collagène de type I et le calcium.

- La Gla-protéine matricielle.
  - Des protéoglycanes, qui sont des protéines sur lesquelles se trouvent des chaînes polyosides appelées glycosaminoglycanes. Ceux retrouvés dans la matrice sont la fibromoduline , le biglycan, la décorine et le lumican. Ils sont impliqués dans la structure de la matrice, d'où leur affinité pour les molécules de collagène et le facteur de croissance TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*).
  - Des phosphoprotéines.
  - Certains membres de la famille des « *Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoproteins* » (SIBLING) comme l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse II et l'ostéoréguline (Thomas et coll., 2008).
- 2) Les protéines plasmatiques comme l'alpha2 HS-glycoprotéine (Heremans Schmid), l'albumine et quelques immunoglobulines. Bien que non synthétisées dans l'os, elles s'y retrouvent via le plasma et les liquides interstitiels (Thomas et coll., 2008).
- 3) Les facteurs de croissance produits par les ostéoblastes. On compte entre autres, le *Transforming Growth Factor* (TGF) Bêta, quelques facteurs de la famille des *Insulin Growth Factors* (IGF), des BMP (*Bone Morphogenic Protein*) et des cytokines (André et coll., 2008).

Ces protéines non collagéniques participent non seulement à l'organisation architecturale de la matrice extra-cellulaire, mais certaines jouent aussi un rôle dans la minéralisation ou dans le remodelage du tissu osseux.

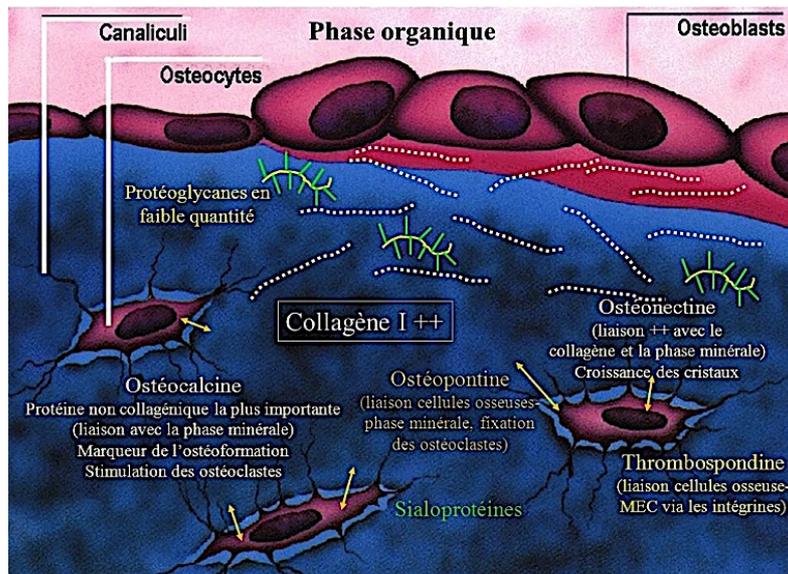


Figure 6 : les principales protéines non collagéniques (source : Bachy, 2015)

La phase minérale de la matrice est constituée de cristaux d'hydroxyapatite et de carbonate de calcium. L'hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , correspond à du phosphate de calcium cristallisé (figure 7) (McLeer, 2019).

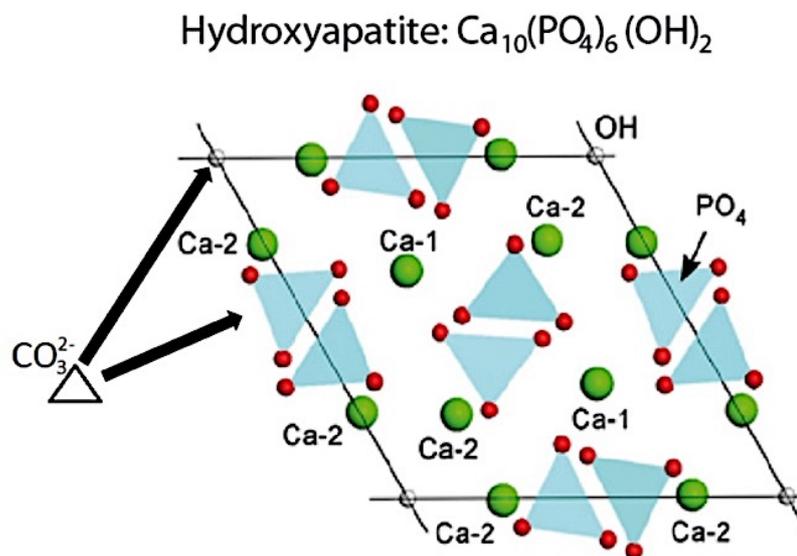


Figure 7 : structure de l'hydroxyapatite (d'après : Touzeau, 2014)

Ces cristaux se présentent sous formes de petites et fines aiguilles hexagonales qui s'enchevêtrent aux fibres de collagène ainsi qu'à l'intérieur de ces dernières (figure 8). De par cette configuration s'explique la structure et la rigidité de la matrice extracellulaire (figure 9) (Boyer, 2014).

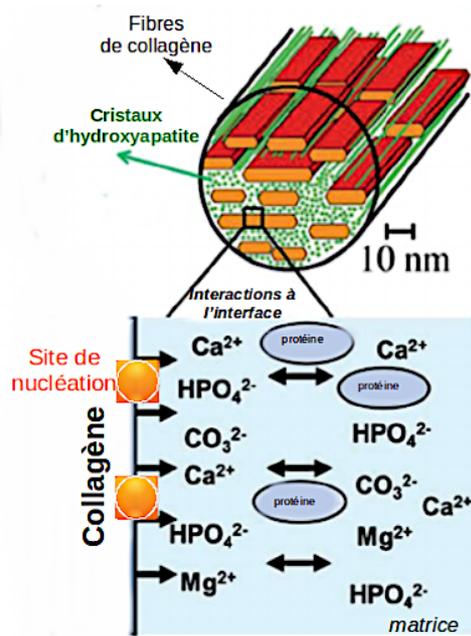


Figure 8 : disposition de l'hydroxyapatite entre les fibres de collagène (d'après : Peng, s.d.)

Les ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  et phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  placés en surface des cristaux jouent un rôle dans la régulation du métabolisme phosphocalcique via des échanges avec le liquide interstitiel et le sang (André et coll., 2008).

La minéralisation de la matrice par maturation cristalline se fait grâce à la précipitation des molécules de phosphore et de calcium amorphe en cristaux. Le taux de cristaux reflète la rigidité du tissu osseux et donc de l'os (André et coll., 2008).

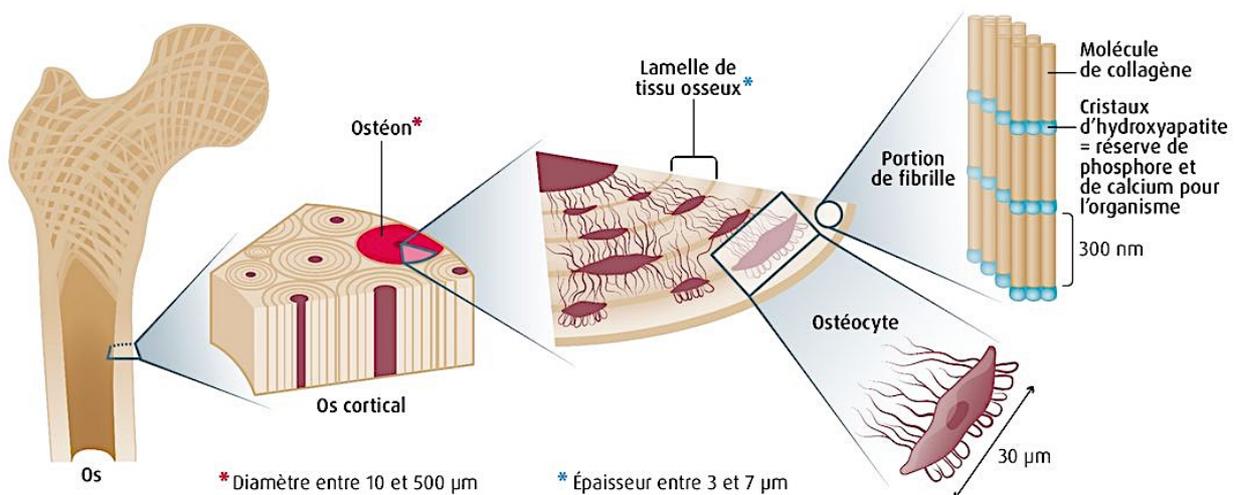


Figure 9 : composition de l'os compact (d'après : Waner, 2019)

- Les cellules osseuses (figure 10)

Les cellules osseuses se distinguent en deux groupes selon leur activité. D'un côté il y a les cellules ostéoformatrices et de l'autre les cellules ostéorésorbantes.

Les cellules ostéoformatrices que sont les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont issues de la lignée des cellules souches mésenchymateuses. En revanche les cellules ostéorésorbantes, c'est-à-dire les ostéoclastes, sont issues de la lignée des cellules souches hématopoïétiques qui produit également les cellules sanguines et immunitaires.

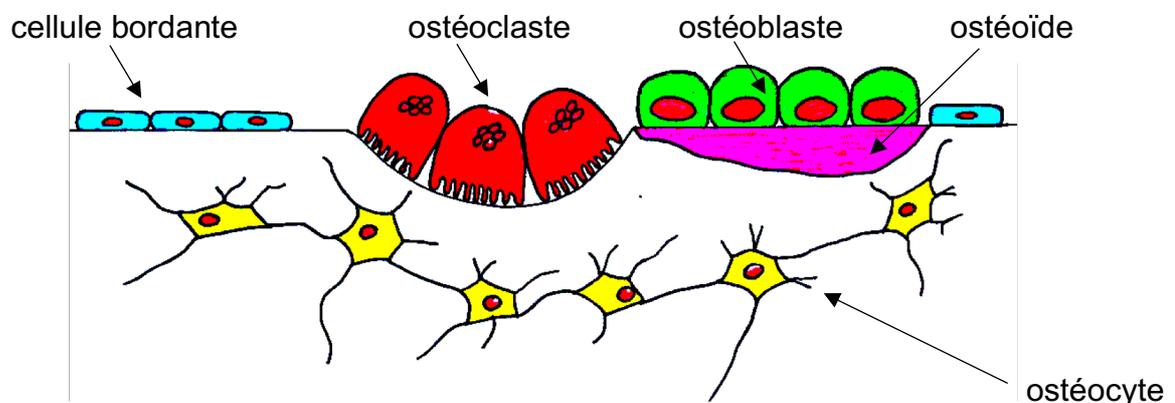


Figure 10 : les différents types de cellules osseuses (source : document personnel)

### 1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules aux contours irréguliers, de forme cubique, mononuclées et de 20-30 $\mu$ m de diamètre (McLeer, 2019). Ils s'alignent en monocouche à la surface externe du tissu osseux en formation.

Les ostéoblastes ont pour rôle principal de synthétiser les constituants organiques de la matrice extra-cellulaire non encore minéralisée, appelée ostéoïde.

Ils sont également impliqués dans la minéralisation de la matrice extra-cellulaire, ce qui explique la profusion de l'enzyme phosphatase alcaline (essentielle à la minéralisation) au sein de la membrane plasmique des ostéoblastes (Boyer, 2014).

Finalement, les ostéoblastes interviennent dans la régulation du remodelage osseux en produisant des enzymes protéolytiques et des facteurs agissant sur les ostéoclastes, cellules ostéorésorbantes.

En effet, à la surface externe de la membrane plasmique, on retrouve de nombreux récepteurs sensibles à des hormones (oestrogènes, hormone parathyroïdienne PTH, vitamine D3, ...), des cytokines (interleukines, prostaglandines, ...) et des facteurs de croissance et de différenciation (TGF- $\beta$ , BMP, ...) (McLeer, 2019).

On dénombre trois possibilités d'évolution pour les ostéoblastes : la transformation en ostéocytes totalement intégrés à la matrice minéralisée, la transformation en cellules bordantes par baisse d'activité ou la mort par apoptose (Boyer, 2014).

## 2. Les ostéocytes

Bien qu'un ostéoblaste mature sur dix se différencie en ostéocyte, ces derniers sont les cellules les plus présentes au sein du tissu osseux (Thomas, 2008). Ils se trouvent donc dans la matrice extra-cellulaire, dans des logettes appelées ostéoplastes (figure 11).

Les ostéoplastes sont reliés entre eux par des canalicules qui contiennent les nombreux et fins prolongements cytoplasmiques des ostéocytes, au bout desquels on retrouve des jonctions communicantes.

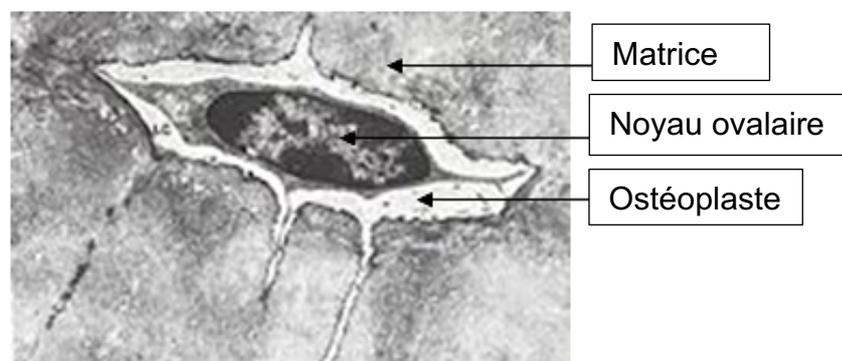


Figure 11 : observation d'un ostéocyte sous microscope électronique (d'après : Adjlane, 2019)

Ce réseau permet la régulation du remodelage osseux via la perception des variations de forces mécaniques et la transmission de ces informations par les jonctions communicantes aux autres ostéocytes ainsi qu'aux ostéoblastes (Thomas, 2008). Ainsi les ostéocytes participent au maintien de la structure du tissu osseux.

Les corps cellulaires des ostéocytes sont de taille inférieure à ceux des ostéoblastes, d'aspect étoilé et contenant moins d'organites car synthétisant moins de protéines (McLeer, 2019). Néanmoins, ils en produisent assez pour participer à l'homéostasie phosphocalcique.

### 3. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont le résultat d'ostéoblastes devenus plats et quiescents par ralentissement de leur activité métabolique. Comme leur nom l'indique, elles se situent en bordure externe du tissu osseux minéralisé non soumis au remodelage (ni apposition ni résorption) et sont reliées entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes. Leur rôle principal est donc de protéger le tissu osseux sous-jacent en formant une barrière fonctionnelle (Thomas, 2008).

Les cellules bordantes peuvent se différencier à nouveau en ostéoblastes si elles sont sollicitées par certaines molécules (dont l'hormone parathyroïdienne) (McLeer, 2019).

### 4. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont issus de la lignée des cellules souches hématopoïétiques.

Ce sont de très volumineuses cellules (50-100 $\mu$ m de diamètre), possédant plusieurs noyaux, très mobiles et donc aptes à se déplacer à la surface du tissu osseux d'un site de résorption à un autre (Nataf, 2009).

Leur cytoplasme est riche en organites, car nécessaires au rôle premier de l'ostéoclaste, à savoir la résorption osseuse (McLeer, 2019).

Après activation, l'ostéoclaste se polarise et deux pôles apparaissent : le pôle basal où se forme une membrane plissée, portant le nom de bordure en brosse, responsable de la résorption de la matrice osseuse qu'elle touche et le pôle apical situé à l'autre extrémité.

### c) Classification

On peut distinguer 3 classes de tissus osseux selon le niveau d'évolution et/ou l'organisation des fibres de collagène : le tissu osseux réticulaire ou non lamellaire, le tissu osseux lamellaire compact et le tissu osseux lamellaire spongieux (figure 12).

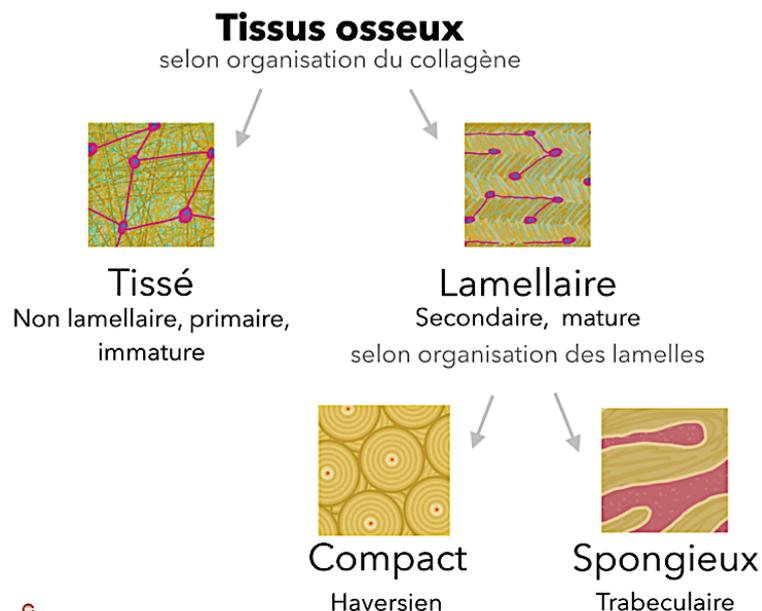


Figure 12 : les différents types de tissus osseux (source : Celluloyd, 2015-2016)

#### o Le tissu osseux réticulaire

Aussi appelé non lamellaire, il est peu minéralisé, ce pourquoi il est considéré comme immature (Nataf, 2009). Sous microscope électronique en lumière polarisée, il a une allure fibreuse, ce qui le rend peu résistant (figure 13).

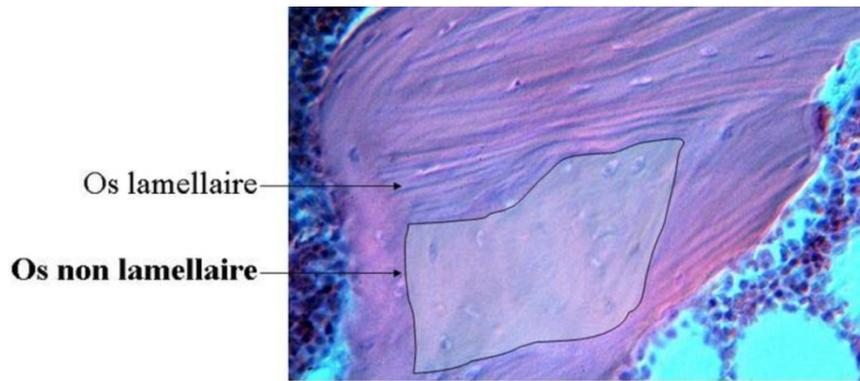


Figure 13 : tissu osseux réticulaire sous microscope électronique (source : Nataf, 2009)

Les fibres de collagène contenues dans la matrice n'ont pas d'organisation, elles sont disposées de façon anarchique dans toutes les directions ; on parle de structure primaire (figure 14) (McLeer, 2019).

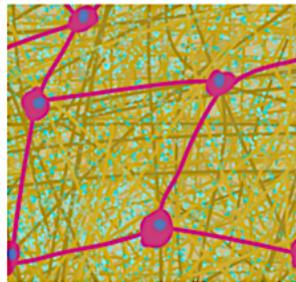


Figure 14 : schéma représentant du tissu osseux réticulaire (source : Celluloyd, 2015-2016)

On retrouve ce tissu essentiellement chez le fœtus. Chez l'adulte il est présent au niveau des osselets de l'oreille moyenne et des alvéoles dentaires. Il apparaît également dans des situations pathologiques comme le remodelage osseux après une fracture (cals), les tumeurs ostéogéniques, etc (figure 15) (Thomas et coll., 2008 ; McLeer, 2019).



Osselets  
Réparation de fracture

Figure 15 : endroits où se trouve du tissu osseux réticulaire (d'après : Carter, date inconnue et Stovall, 2013)

Le reste est peu à peu remplacé par le tissu osseux secondaire. On peut donc dire que l'os réticulaire est en majeure partie provisoire.

- Le tissu osseux lamellaire

Il est produit à partir du tissu osseux primaire et se caractérise par des fibres de collagène disposées parallèlement. Il apparaît alors des lamelles, ce qui rend le tissu bien plus résistant aux forces mécaniques.

Il existe deux types de tissu osseux lamellaire : le tissu osseux haversien encore appelé compact ou cortical et le non haversien aussi nommé spongieux ou trabéculaire. Ces deux types sont tout aussi bien présents au niveau des os longs (humérus, fémur, tibia, ...) que courts (carpes, tarses, vertèbres, ...) ou encore plats (côtes, sternum, os scapulaire, ...) (figure 16) .

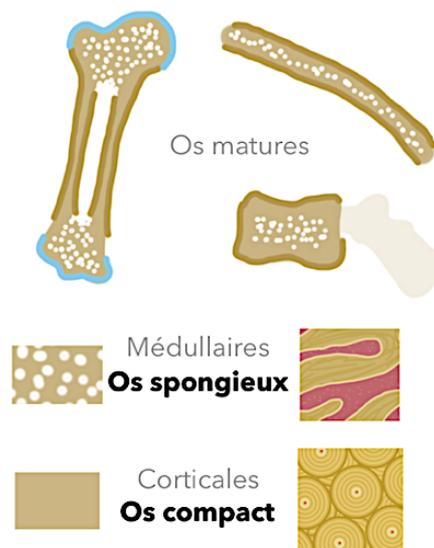


Figure 16 : les deux types de tissu osseux lamellaire (source : Celluloyd, 2015-2016)

### 1. Le tissu osseux compact

Il représente environ 80% du tissu osseux total du squelette humain (Tortora et Derrickson, 2007). Il recouvre les os courts, les diaphyses et les épiphyses des os longs et constitue les tables externes et internes des os plats.

Il se caractérise par des fibres de collagène parallèles les unes aux autres formant ainsi une lamelle.

En d'autres mots, les lamelles sont des couches de matrice extra-cellulaire (figure 17).

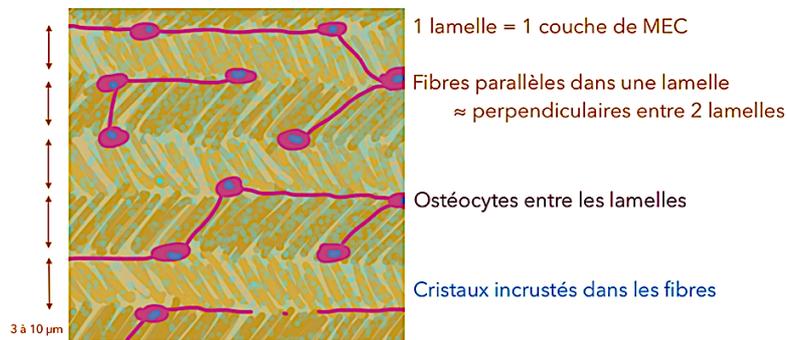


Figure 17 : schéma représentant les lamelles du tissu osseux compact (source : Celluloyd, 2015-2016)

Ces lamelles, de 3-7µm d'épaisseur, se superposent en variant leur direction de 90° les unes par rapport aux autres, d'où résultent la résistance ainsi que la plasticité de l'os (McLeer, 2019).

Les lamelles sont séparées par des ostéoplastes alignés qui renferment les corps cellulaires des ostéocytes.

Les couches de lamelles sont disposées de façon concentrique autour d'un canal central appelé canal de Havers. Cet ensemble constitue un ostéon (figure 18).

Le canal de Havers (diamètre moyen de 50µm) a un axe parallèle à la cavité médullaire de l'os. Il est enveloppé d'une couche de cellules bordantes. Chaque canal contient un capillaire sanguin ainsi qu'une fibre nerveuse amyélinique.

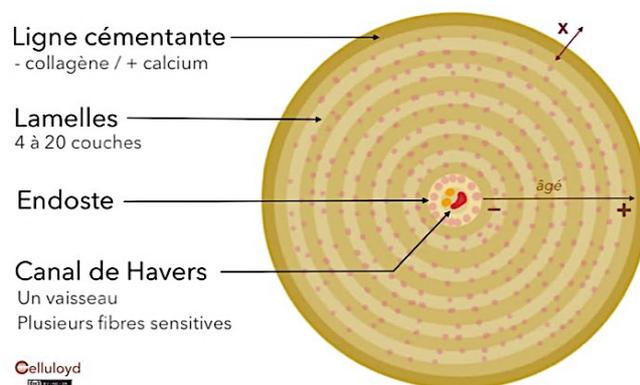


Figure 18 : schéma représentant un ostéon (source : Celluloyd, 2015-2016)

Tout ostéon, dont le diamètre varie entre 100 $\mu$ m et 1mm, est bordé par une ligne cémentante et comprend entre 4 et 20 lamelles.

Entre les ostéons se trouvent les systèmes interstitiels qui ne sont autre que des ostéons partiels contenant des lamelles osseuses dites interstitielles. Ils résultent d'ostéons complets ayant subi un remodelage partiel (Nataf, 2009).

Les ostéons communiquent entre eux, avec la surface de l'os et avec la cavité médullaire par de plus larges canaux disposés transversalement appelés canaux de Volkmann (figure 19).

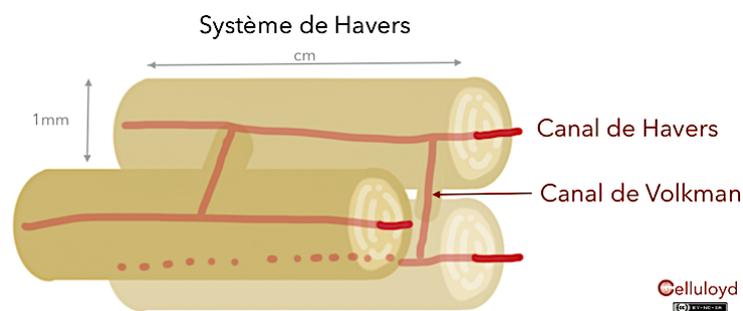


Figure 19 : schéma représentant les systèmes de Havers (source : Celluloyd, 2015-2016)

Ces derniers sont également entourés de cellules bordantes et contiennent des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. De par leur disposition, ils offrent une rigidité accrue au tissu osseux face aux forces extérieures.

Le tissu osseux compact de la diaphyse des os longs se différencie d'avantage. En effet, on retrouve des lamelles osseuses concentriques au niveau des contours externes et internes du tissu osseux formant ainsi les systèmes fondamentaux (ou circonférentiels) externe et interne (figure 20) (Nataf, 2009).

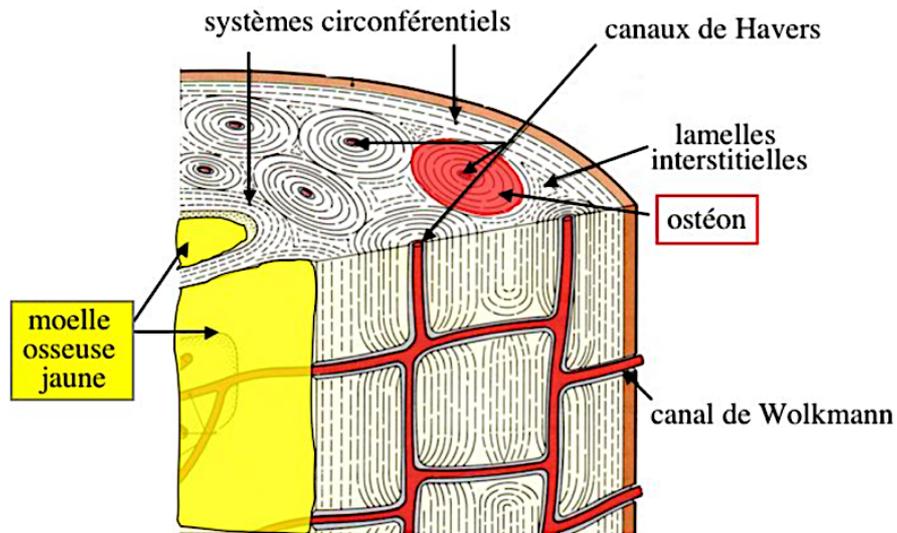


Figure 20 : tissu osseux compact haversien (diaphyse os long) (source : Nataf, 2009)

De surcroît, la cavité centrale de l'os, appelée cavité médullaire contient du tissu adipeux appelé moelle osseuse jaune (figure 21).

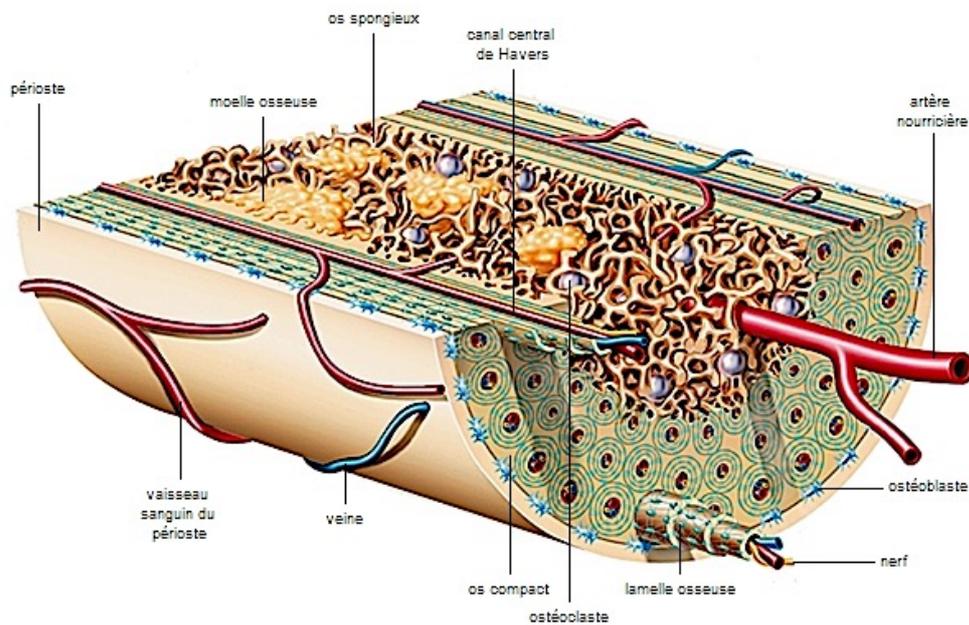


Figure 21 : coupe d'une diaphyse d'un os long (source : Larousse Médical, 2009)

## 2. Le tissu osseux spongieux

Aussi appelé trabéculaire, il compose 20% du squelette adulte.

Il forme le diploé des os courts et plats, c'est-à-dire la couche d'os spongieux qui sépare les couches internes et externes d'os compact (figure 22), mais on le retrouve également au niveau de l'épiphyse des os longs (Nataf, 2009).

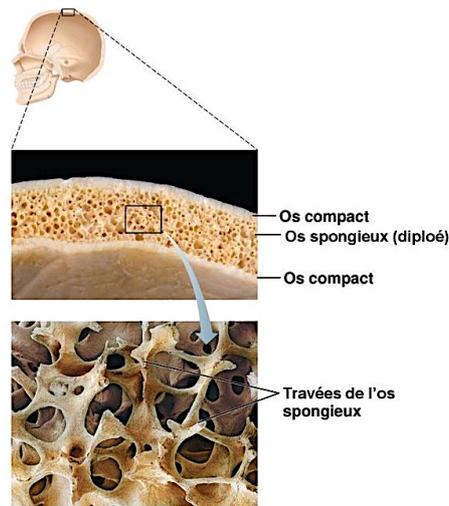


Figure 22 : les os plats comportent une épaisseur d'os spongieux (diploé), intercalée entre deux fines couches d'os compact (source : Marieb et Hoehn, 2019)

Il n'est pas formé d'ostéons mais d'un enchevêtrement de trabécules de tissu osseux lamellaire reliées entre elles.

Les lamelles qui constituent les trabécules se disposent selon le grand axe de la travée (McLeer, 2019).

Tout comme pour le tissu osseux compact, les lamelles de matrice extracellulaire d'une trabécule sont séparées par les ostéoplastes contenant les ostéocytes et les cellules bordantes tapissent le bord externe des trabéculation (figure 23).

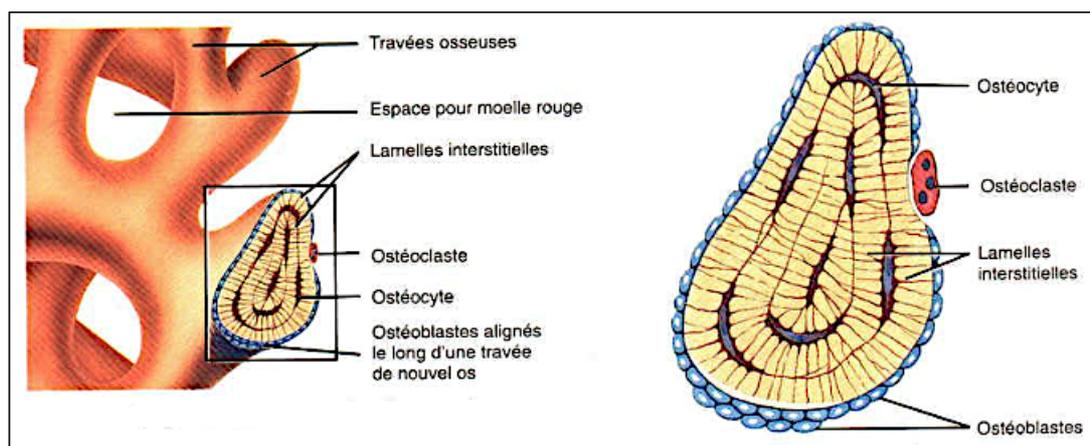


Figure 23 : la microstructure de l'os trabéculaire et de la travée osseuse, à gauche : agrandissement de travées d'un os spongieux, à droite : détails d'une coupe de travée osseuse (source : Tortora et Grabowski, 2007)

Les espaces entre les trabécules, nommés niches ont une largeur de 0,5-1mm et sont donc visibles à l'œil nu. Ces espaces sont envahis par la moelle osseuse ainsi que de nombreux vaisseaux sanguins.

#### d) Les enveloppes du tissu osseux / Les tissus conjonctifs associés

À l'exception des surfaces articulaires où se trouve du tissu cartilagineux, tous les os possèdent une enveloppe externe, le périoste, et une enveloppe interne, l'endoste (figure 24). Tous les deux assurent la croissance en épaisseur du tissu osseux mais jouent également un rôle dans la réparation de fractures (McLeer, 2019).

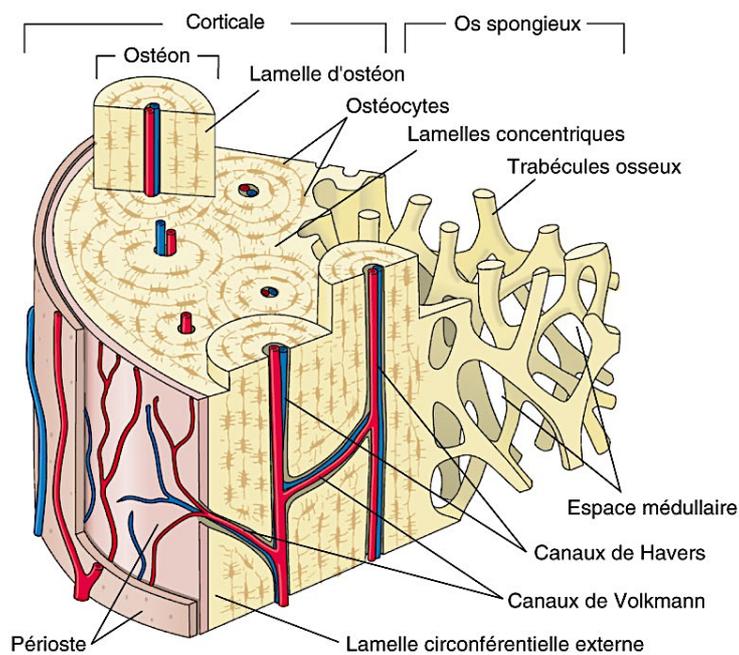


Figure 24 : coupe représentant les tissus osseux compact et spongieux (source : Elsevier Masson, 2018)

Le périoste est l'enveloppe externe des os. Il se compose de 2 couches de tissu conjonctif, formant ainsi un large feuillet.

La couche profonde renferme un grand nombre de précurseurs ostéoblastiques, d'ostéoblastes et de CSM, constituant ainsi une réserve fondamentale d'ostéoblastes (Nataf, 2009). On y retrouve également des ostéoclastes.

La délimitation entre la couche profonde du périoste et le tissu osseux se fait au niveau de la couche de cellules bordantes.

D'épais faisceaux de fibres de collagène solidarisent le périoste avec la MEC du tissu osseux ; ce sont les fibres de Sharpey (figure 25).

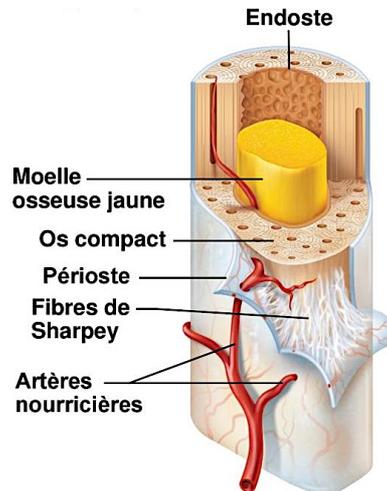


Figure 25 : coupe transversale de la diaphyse d'un os long (source : Marieb et Hoehn, 2019)

L'endoste quant à lui tapisse les surfaces internes de l'os, comme les parois des canaux de Volkmann et de Havers pour le tissu osseux compact et des trabécules pour le tissu osseux spongieux. Il enveloppe également la cavité médullaire des os longs.

Contrairement au périoste, l'endoste n'est formé que d'une seule couche, qui s'apparente à la couche profonde du périoste de par sa composition en cellules (Nataf, 2009).

#### e) Organisation du tissu osseux des maxillaires

Les deux os nous intéressant principalement sont le maxillaire et la mandibule. Tandis que le maxillaire est un os paire, symétrique et statique, la mandibule est impaire et mobile par rapport aux autres os de la face.

Dans les deux cas, on y retrouve du tissu osseux compact et spongieux.

Les corps des os sont constitués d'un os basal et d'un os alvéolaire.

Contrairement à la mandibule, l'os basal du maxillaire est principalement constitué de tissu osseux spongieux (Andreotti, 2005).

En effet l'os basal mandibulaire est composé de tissu osseux compact recouvrant le tissu spongieux. Cependant la répartition en tissu spongieux y est disparate. On retrouve par exemple bien plus de tissu spongieux au niveau de la branche horizontale et de la symphyse qu'au niveau de la branche montante.

L'os alvéolaire correspond à l'os entourant les racines des dents.

Il n'y a pas de délimitation claire entre l'os alvéolaire et l'os basal (ni anatomiquement, ni histologiquement).

L'os alvéolaire est composé d'alvéoles, de corticales, de tables, de septas et de la crête (figure 26).

- Les alvéoles sont les cavités où se logent les racines dentaires. Elles sont séparées par deux corticales.
- Les corticales sont composées de tissu osseux compact. On distingue une corticale externe et une corticale interne. Entre les deux on retrouve le tissu osseux spongieux.
- La table externe représente la partie osseuse vestibulaire de l'os alvéolaire tandis que la table interne indique la partie linguale ou palatine de l'os alvéolaire.
- Les septas représentent les portions d'os alvéolaire séparant les racines. Ils peuvent être inter-dentaires ou inter-radicaux. En toute logique, les septas inter-dentaires séparent deux dents adjacentes, et donc deux alvéoles, alors que les septas inter-radicaux séparent les racines d'une même dent.
- La crête alvéolaire représente le bord cervical de l'os alvéolaire.

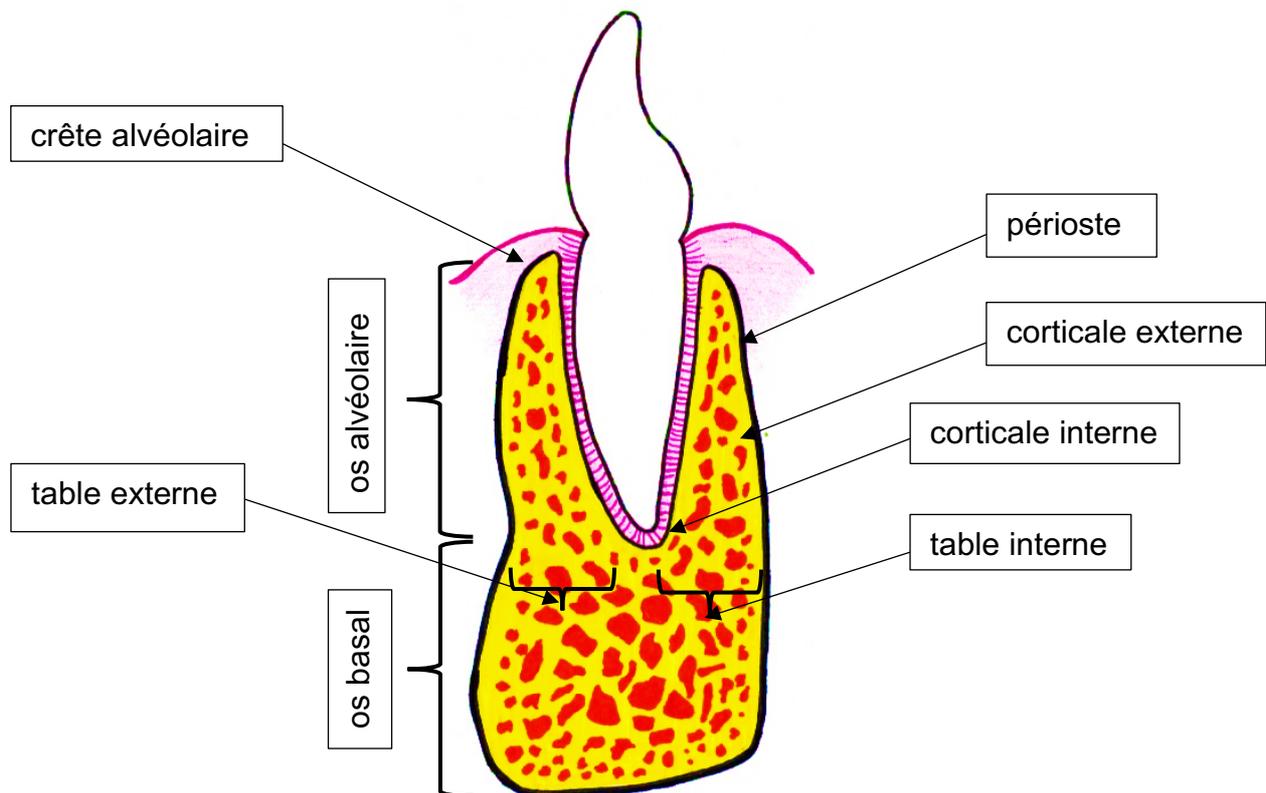


Figure 26 : schéma représentant une coupe sagittale d'incisive mandibulaire (source : document personnel)

#### f) L'histogénèse du tissu osseux : formation et remodelage

- Formation

Jusqu'à la sixième semaine de gestation, l'embryon est constitué de membranes fibreuses et de cartilage hyalin, qui seront peu à peu remplacés par du tissu osseux.

La formation du tissu osseux se fait en deux étapes : la sécrétion d'une matrice organique (ostéoïde) et sa minéralisation.

Le dépôt de tissu osseux se fait là où se trouve initialement du tissu conjonctif riche en collagène (ossifications intra-membranaire et périostique), soit du tissu cartilagineux (ossification endochondrale). Dans les deux cas, on parle d'ossification primaire.

On parle d'ossification secondaire lorsque l'apposition osseuse s'effectue sur une couche de tissu osseux déjà formé (le remodelage osseux) (McLeer, 2019).

On distingue donc trois processus de formation osseuse primaire : l'ossification endochondrale, intra-membranaire et périostique. Ces phénomènes d'ossification se traduisent par le remplacement des tissus mésenchymateux et cartilagineux par du tissu osseux.

Suite à ces phénomènes a lieu la minéralisation ou calcification, durant laquelle des cristaux d'hydroxyapatite vont s'apposer sur la matrice osseuse tout juste secrétée encore appelée ostéoïde (Pastoureau, 1990 ; Lamy, 2018).

1. L'ossification endochondrale aboutit à de l'os spongieux et participe donc à la formation des os longs (majorité du squelette). Comme son nom l'indique, elle correspond au dépôt de matrice osseuse sur une ébauche cartilagineuse. Ce type d'ostéogenèse comporte deux phases : la désintégration du tissu cartilagineux suivi de son remplacement (et non sa transformation) en tissu osseux. Les chondrocytes dont est constitué l'embryon se condensent jusqu'à former les ébauches primitives de futurs os. Puis au fur et à mesure de la désintégration centrifuge du cartilage hyalin, celui-ci est remplacé par la matrice osseuse (figure 27).

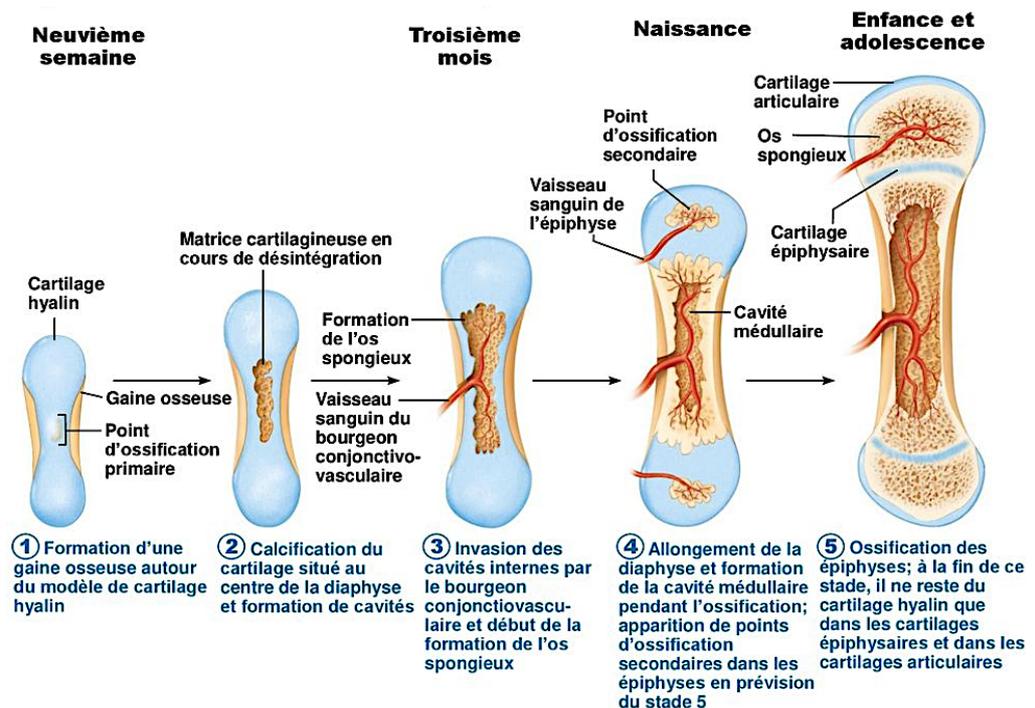


Figure 27 : ossification endochondrale d'un os long (source : Marieb et Hoehn, 2019)

2. L'ossification intra-membranaire est à l'origine des os plats. Tout part du tissu mésenchymateux organisé en membranes fibreuses.

Entre les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes apparaissent et prolifèrent des cellules ostéoprogénitrices, qui ne sont autres que des cellules précurseurs mésenchymateuses dérivées de la crête neurale.

Sous l'influence de facteurs (de croissance), certains de ces précurseurs ostéoblastiques se transforment en ostéoblastes actifs. Ces derniers synthétisent alors la matrice extra-cellulaire aussi appelée ostéoïde qui sera ultérieurement minéralisée.

Ainsi on peut observer la formation d'un point d'ossification au sein de ces membranes fibreuses. Ce point d'ossification marque le départ de la synthèse d'os fibreux (ou réticulaire) qui sera dans sa grande majorité résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire spongieux et compact. L'ossification intra-membranaire peut donc se résumer par l'apposition de matrice extra-cellulaire sécrétée par les ostéoblastes ; dérivés de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (figure 28).

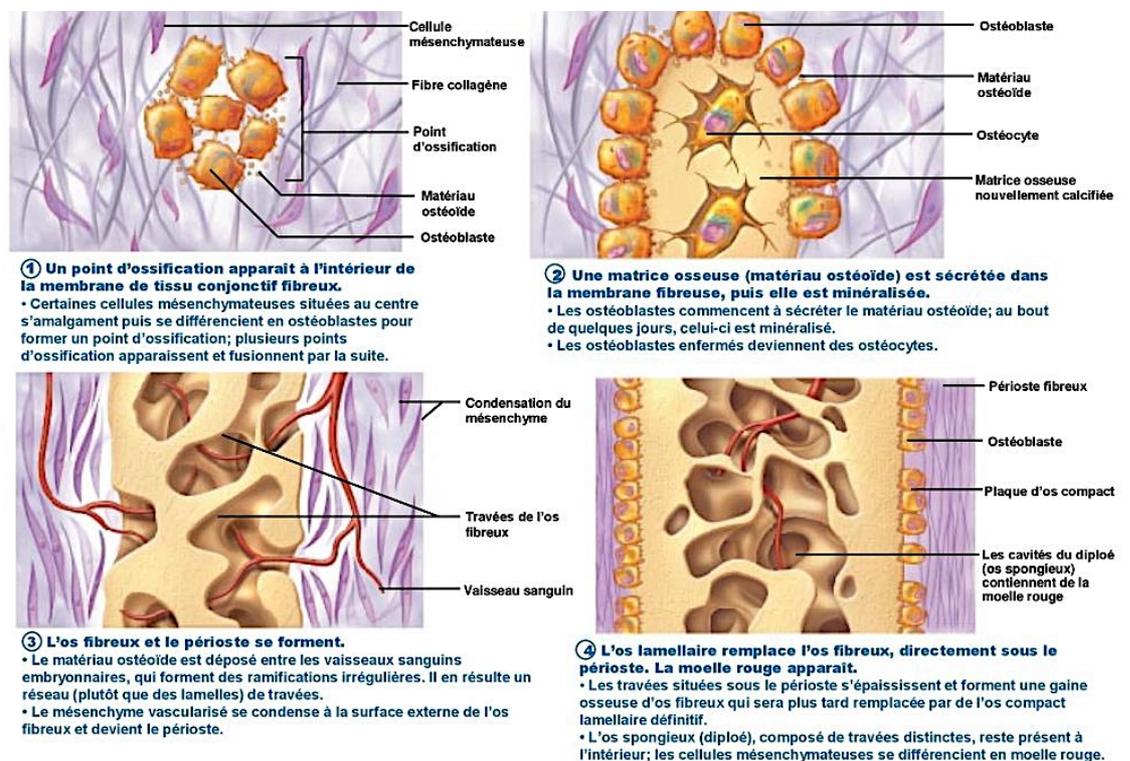


Figure 28 : ossification intra-membranaire (source : Marieb et Hoehn, 2019)

3. L'ossification périostique s'effectue, comme son nom l'indique, autour de l'os. Elle se produit soit à partir du périchondre si l'ébauche osseuse de départ est du cartilage, soit à partir du périoste si le tissu sous-jacent constitue déjà de l'os.

L'ossification périostique est à l'origine de la croissance en épaisseur de l'os, garantissant ainsi une augmentation du diamètre du tissu osseux.

- Remodelage

Le remodelage du tissu osseux a lieu tous les quatre mois chez l'adulte en bonne santé.

Son rôle est de contrôler l'équilibre minéral en plus d'être un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique. Il permet également de renouveler le tissu osseux et de réfectionner les dommages osseux subis (Thomas et coll., 2008).

Le remodelage comprend la résorption et la formation alternée de tissu osseux.

Le remodelage se fait selon quatre phases successives que l'on appelle la séquence de remodelage ARIF (figure 29) :

1. La phase d'activation : sous l'influence de certains facteurs ostéorésorbants, les cellules bordantes s'écartent, laissant ainsi passer les ostéoclastes. Conjointement, les ostéoblastes se différencient en ostéoclastes.
2. La phase de résorption : les ostéoclastes actifs s'accrochent à la matrice extra-cellulaire, permettant le début de la dissolution de la phase minérale. La matrice organique subit une désintégration enzymatique.
3. La phase d'inversion : les ostéoclastes entrent en apoptose après avoir taillé une lacune. Des macrophages phagocytent les ostéoclastes morts, laissant un fond de lacune lisse.

4. La phase de formation : les cellules du fond de la lacune se différencient en ostéoblastes et secrètent une nouvelle matrice extra-cellulaire minéralisée dans un second temps.

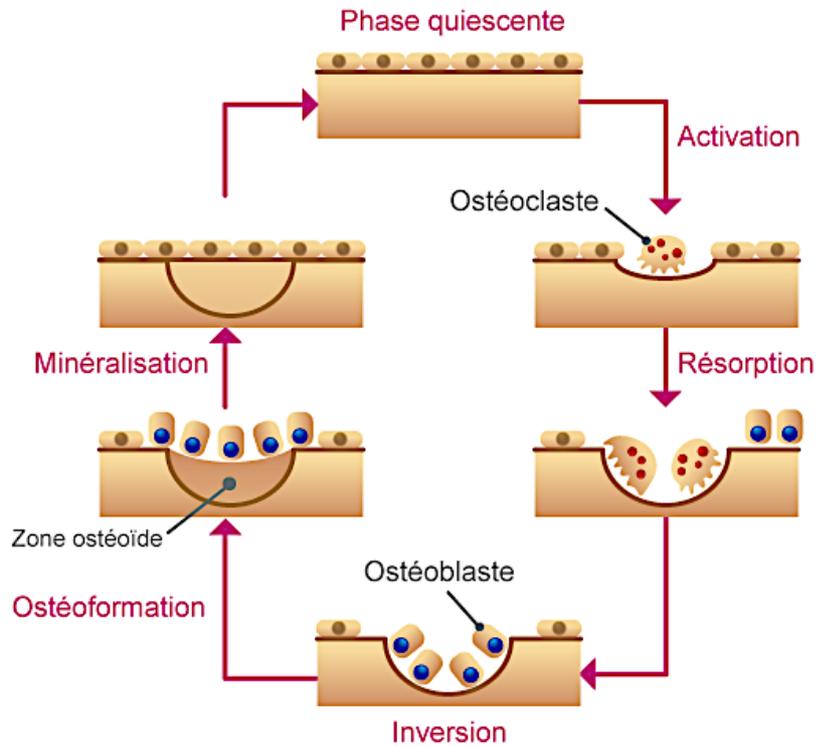


Figure 29 : cycle ARIF (source : Société Française de Rhumatologie, s.d.)

### 3.2.2 Les acteurs de la régénération osseuse (tableau 3)

De nombreux facteurs systémiques et locaux sont impliqués dans l'ostéogenèse, depuis la différenciation des CSM en ostéoblastes jusqu'à la régénération du tissu osseux (figures 30, 31 et 32).

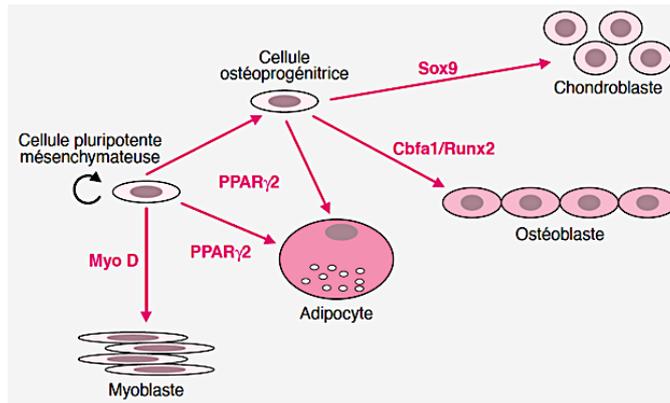


Figure 30 : différenciation des CSM (source : Marie, 2001)

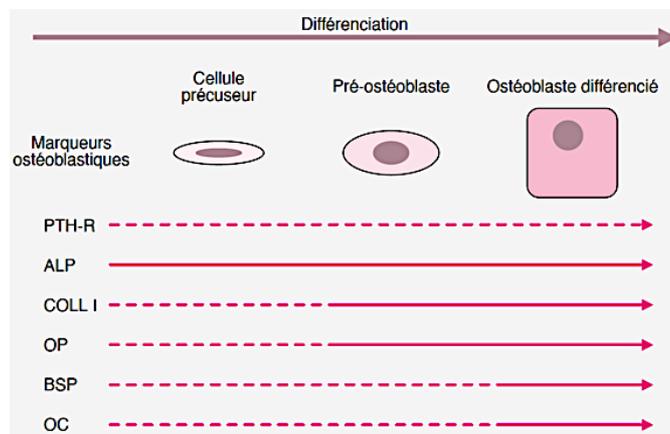


Figure 31 : différents marqueurs exprimés au cours de la différenciation des ostéoblastes (source : Marie, 2001)

Séquence de différenciation ostéoblastique	Principaux facteurs de contrôle	Principaux facteurs de transcription impliqués
Cellule souche mésenchymateuse		
Engagement vers la voie ostéoblastique	BMP, glucocorticoïdes	Cbfa1
Prolifération cellulaire	FGF, TGFβ, PTH/PTHrP	Msx-2, c-fos, Twist
Différenciation cellulaire	BMP, TGFβ, IGF, glucocorticoïdes, vitamine D	Cbfa1, Msx-2, Dlx-5, AP-1, Twist
Apoptose	BMP, FGF, PTH, glucocorticoïdes	Msx-2, NFκB

Figure 32 : principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogénèse (source : Marie, 2001)

- Différenciation des CSM en cellules ostéoprogénitrices

Les premiers marqueurs à entrer en jeu sont les facteurs de transcription Cbfa1/Runx2.

Grâce à leur expression, les CSM se différencient en ostéoblastes en passant par le stade de cellules ostéoprogénitrices. Ces facteurs de transcription sont notamment contrôlés par les *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (membre de la famille des TGF- $\beta$ ) ; qui augmentent l'expression de Cbfa1/Runx2 (Marie, 2001).

- Prolifération des cellules ostéoprogénitrices

Les cellules ostéoprogénitrices prolifèrent pendant un certain temps, avant de subir une différenciation en ostéoblastes actifs endossant le rôle de sécrétion et de minéralisation de la matrice osseuse. Certains facteurs locaux comme le TGF- $\beta$ , le FGF et la parathormone PTH agissent sur ces cellules préostéoblastiques en augmentant leur prolifération via les facteurs de transcription.

Les principaux facteurs de transcription impliqués sont Msx-2, c-fos et Twist. Tandis que Msx-2 et c-fos contrôlent l'ostéogenèse positivement, Twist est un régulateur négatif, c'est-à-dire que son inactivité engendre la prolifération des cellules.

- Différenciation en ostéoblastes

La différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes se fait grâce aux facteurs que sont les BMP, le TGF- $\beta$ , l'IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor*), les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance GH, mais et également la vitamine D et les oestrogènes.

Les facteurs de transcription impliqués sont Cbfa1, Msx-2, Dlx-5, AP-1 ainsi que Twist.

L'hormone de croissance GH (*Growth Hormone*) induit la sécrétion d'IGF-1 mais augmente également la réceptibilité des ostéoblastes à IGF-1.

Ainsi, IGF-1 stimule la prolifération des ostéoblastes et donc la synthèse du tissu osseux. L'ostéof ormation est néanmoins aussi sous le contrôle de la PTH, de TGF- $\beta$ , de BMP, d'hormones sexuelles telles que les œstrogènes et de la vitamine D via la prolifération d'ostéoblastes.

La durée de vie des ostéoblastes est contrôlée par PTH, TGF- $\beta$ , les oestrogènes et IGF-1. En effet ils inhibent l'apoptose des ostéoblastes. En revanche, les glucocorticoïdes stimulent l'apoptose, réduisant la durée de vie des ostéoblastes.

- Différenciation ostéoclastique

Parallèlement à l'ostéogénèse, les ostéoblastes matures induisent la différenciation des CSH (cellules souches hématopoïétiques) en ostéoclastes via la sécrétion de M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) qui agit sur toutes les cellules de la différenciation ostéoclastique (figure 33).

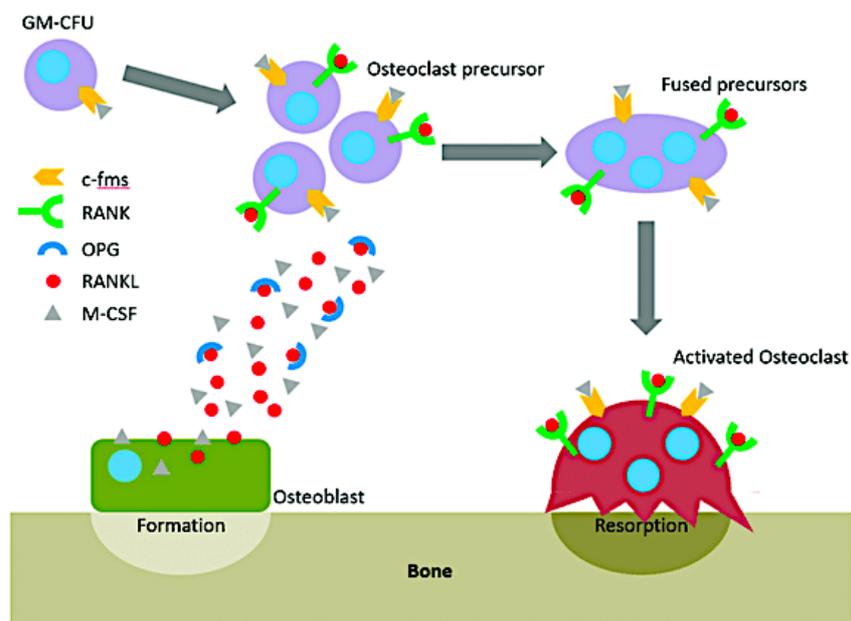


Figure 33 : régulation de la genèse des ostéoclastes par RANK/RANK-L/OPG (source : Owen et Reilly, 2018)

Une fois les ostéoclastes formés, les ostéoblastes contrôlent la résorption osseuse via l'équilibre RANKL/OPG, molécules produites par les ostéoblastes (figure 34).

RANKL (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*) est le ligand venant se lier à RANK situé à la surface des pré-ostéoclastes et des ostéoclastes ; activant ainsi le stade final de la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse. Son contradicteur OPG (ostéoprotégérine) quant à lui, empêche RANKL de se lier à son récepteur et inhibe donc la résorption.

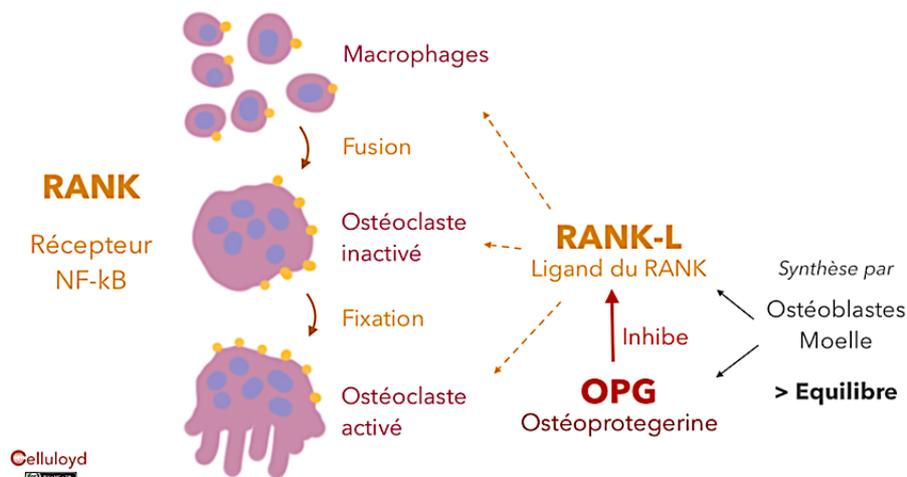


Figure 34 : équilibre RANKL/OPG (source : Celluloyd, 2015-2016)

Le contrôle de l'activité ostéoclastique se fait également grâce à TGF- $\beta$  et aux glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes stimulent l'activité de RANKL et inhibent celle d'OPG, augmentant de cette façon la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes actifs.

En revanche, TGF- $\beta$  inhibe la synthèse d'ODF (*Osteoclast Differentiation Factor*), qui est en charge de la différenciation ostéoclastique. TGF- $\beta$  augmente également la synthèse d'OPG par les ostéoblastes, réduisant ainsi l'activité ostéoclastique.

Tableau 3 : les facteurs locaux intervenant au cours de l'ostéogenèse et leurs rôles

Facteurs locaux	Rôles
<b>BMP</b> (famille de TGF- $\beta$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> expression Cbfa1/Runx2</li> <li>• <math>\uparrow</math> différenciation pré-ostéoblastes <math>\rightarrow</math> ostéoblastes</li> <li>• <math>\uparrow</math> prolifération pré-ostéoblastes et ostéoblastes</li> </ul>
<b>FGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> prolifération pré-ostéoblastes</li> </ul>
<b>GH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> différenciation pré-ostéoblastes <math>\rightarrow</math> ostéoblastes</li> </ul>

<b>glucocorticoïdes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoblastes → ostéoblastes</li> <li>• ↑ apoptose ostéoblastes</li> <li>• ↑ prolifération ostéoclastes</li> </ul>
<b>IGF-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoblastes → ostéoblastes</li> <li>• ↑ prolifération ostéoblastes</li> <li>• Inhibe apoptose ostéoblastes → ↑ durée de vie</li> </ul>
<b>M-CSF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation CSH → pré-ostéoclastes</li> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoclastes → ostéoclastes</li> </ul>
<b>œstrogènes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoblastes → ostéoblastes</li> <li>• ↑ prolifération ostéoblastes</li> <li>• Inhibe apoptose ostéoblastes → ↑ durée de vie</li> </ul>
<b>PTH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ prolifération pré-ostéoblastes et ostéoblastes</li> <li>• Inhibe apoptose ostéoblastes → ↑ durée de vie</li> </ul>
<b>RANK-L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoclastes → ostéoclastes</li> <li>• ↑ prolifération ostéoclastes</li> </ul> <p>} ≠ OPG</p>
<b>TGF-β</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ prolifération pré-ostéoblastes et ostéoblastes</li> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoblastes → ostéoblastes</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe apoptose ostéoblastes → ↑ durée de vie</li> <li>• Inhibe synthèse d'ODF</li> <li>• ↑ synthèse d'OPG</li> </ul> <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 150px;"> <div style="font-size: 2em; margin-right: 10px;">}</div> <div style="text-align: left;"> <p>↓ activité</p> <p>ostéoclastes</p> </div> </div>
<p><b>Vitamine D3</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ différenciation pré-ostéoblastes → ostéoblastes</li> <li>• ↑ prolifération ostéoblastes</li> </ul>

### 3.3 Protocole de production de substituts osseux à base de cellules souches

La production d'un substitut osseux par ingénierie tissulaire fait appel à quatre éléments majeurs : des cellules souches, un matériau de support, des facteurs de croissance et un temps de maturation (figure 35).

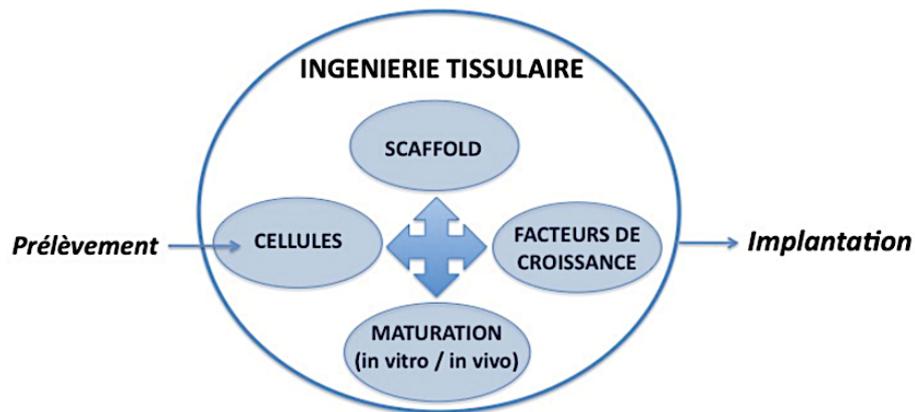


Figure 35 : Les étapes nécessaires à la construction d'un tissu par ingénierie tissulaire (source : Catros et coll., 2010)

#### 3.3.1 Les cellules souches utilisées

Les cellules souches se doivent de remplir les caractéristiques suivantes du cahier des charges (Huang et coll., 2009) :

- Être de source allogénique ou autologue
- Être cryogénisables
- Posséder une activité angiogénique
- Connaître les effets immunosuppresseurs des CSM allogéniques ainsi que les effets des cytokines inflammatoires sur l'activité et la différenciation des CSM
- Avoir un protocole de prélèvement approuvé
- Utilisation éthiquement et légalement correcte.

#### a) Les cellules souches allogéniques

Des études ont montré que des CSM allogéniques de la moelle osseuse pouvaient être injectés à un receveur humain sans déclencher de réaction d'immunodéficience convaincante (Karantalis et coll., 2015).

En effet, les CSM allogéniques échappent au système immunitaire du donneur notamment en ne possédant pas de marqueur de surface antigénique, en supprimant la multiplication des lymphocytes T, en inhibant l'activation des lymphocytes cytotoxiques naturels NK (*Natural Killer*) ainsi qu'en interrompant l'évolution des plasmocytes et des cellules dendritiques (Cohen, 2019).

Les cellules souches allogéniques sont donc intéressantes lorsque l'utilisation des propres cellules souches du patient ne le sont pas (problème de temps et/ou de biodisponibilité).

#### b) Les cellules souches autologues

En raison de leur présence dans de nombreux tissus adultes, les CSM sont facilement prélevables. Lorsque l'on se base sur des cellules autologues, le panel des sources est plus large de par l'absence de réaction immunitaire provoquée, ce qui en fait un avantage non négligeable.

Néanmoins, quelques contraintes ont été éditées afin de faciliter le choix de la provenance (Vishwakarma et coll., 2015) :

- La biodisponibilité
- L'accessibilité du tissu source
- Le temps ainsi que le coût du prélèvement
- La reproductibilité de l'extraction des cellules souches
- Les caractéristiques des cellules isolées ainsi que leur homogénéité
- Le potentiel de différenciation en cellules osseuses
- La capacité de prolifération des cellules souches *in vitro*

- La perpétuation du phénotype cellulaire ou du potentiel de différenciation suite à l'introduction *in vivo* (et donc changement de milieu)
- La sûreté des cellules *in vivo*
- La capacité de rendre les protocoles de culture cellulaire automatiques
- L'obligation de contrôles de qualité de cellules isolées ainsi que des produits obtenus.

### c) Les sources de cellules souches

On peut classer la provenance des cellules souches mésenchymateuses en deux catégories : les cellules souches intra-orales et les cellules souches extra-orales.

- Les cellules souches intra-orales

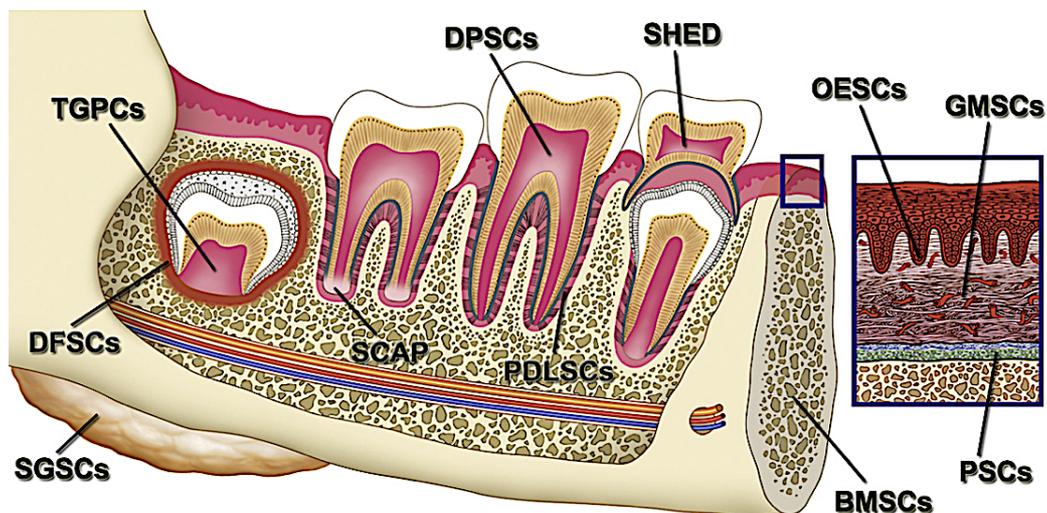


Figure 36 : sources des différentes cellules souches dentaire (source : Egusa et coll., 2012)

Comme l'indique la figure ci-dessus (figure 36), les cellules souches intra-orales peuvent être d'origine pulpaire, parodontale ou osseuse.

Les cellules d'origine pulpaire comprennent les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs, *Dental Pulp Stem Cells*), celles de dents lactéales exfoliées (SHED : *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*) ainsi que celles de la papille apicale (SCALP : *Stem Cells from Apical Papilla*).

Les cellules d'origine parodontale regroupent les cellules précurseurs du follicule dentaire (DFSCs : *Dental Follicle Precursor Cells*), les cellules souches ligamentaires (PDLSCs : *PerioDontal Ligament Stem Cells*) ainsi que les cellules souches gingivales (GSCs : *Gum Stem Cells*).

Finalement les cellules d'origine osseuse se distinguent en CSM de la moelle osseuse des maxillaires (BMSCs : *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) ainsi qu'en cellules souches du périoste (PSCs : *Periosteum Stem Cells*) (Cohen, 2019).

Toutes présentent les caractéristiques typiques des CSM.

- Les cellules souches de la pulpe dentaire DPSCs et des dents lactéales SHED

Pour des raisons évidentes, les dents utilisées ne doivent ni être cariées, ni présenter une pulpe rétrécie (rétractation proportionnelle à l'âge). Ainsi les dents les plus utilisées sont les troisièmes molaires (extractions souvent sans incidence sur l'état bucco-dentaire) ainsi que les dents lactéales (Kichenbrand et coll., 2019).

La pulpe dentaire renferme un grand nombre de CSM supportant aisément la cryogénéisation (les études ne vont pas au-delà de 8 mois de cryogénéisation) (Cristaldi et coll., 2018).

Il a été démontré que les SHED prolifèrent davantage et ont un potentiel de différenciation accru *in vitro*, mais possèdent également une capacité de minéralisation et une régénération osseuse *in vivo* supérieures en comparaison avec les DPSCs. Ne pouvant pas immédiatement se différencier en ostéoblastes, les SHED recrutent les cellules ostéogéniques de l'hôte et ont ainsi un rôle ostéo-inducteur (Dave et Tomar, 2018).

Cependant, étant donné la nécessité de cryogéniser les SHED et l'absence d'études sur leur cryogénéisation à long terme, les DPSCs constituent une source de CSM plus sûre dans le cadre de la régénération osseuse (Wang et coll., 2012).

En plus de posséder un fort potentiel de différenciation ostéogénique *in vitro* ainsi qu'une immunosuppression, *in vivo* les DPSCs sont capables, en fonction du lieu d'introduction, de se différencier en odontoblastes, ostéoblastes ou chondrocytes.

En effet, une étude a démontré que l'injection de DPSCs en site de défaut osseux parodontal a permis le développement d'os nouveau (Amghar-Maach et coll., 2019).

En comparaison avec les DPSCs, les SHED ont un potentiel de prolifération plus élevé et plus rapide mais possèdent également la capacité de former une matrice osseuse à structure lamellaire en recrutant des cellules de l'hôte (Miura et coll., 2003 ; Seo et coll., 2008 ; Huang et coll., 2009). Ceci peut s'expliquer par le fait que la résorption radiculaire des dents lactéales va de pair avec la création d'un nouvel os péri-radicaire (Egusa et coll., 2012).

- Les cellules souches de la papille apicale SCAPs

Par le terme de papille apicale, on entend le tissu conjonctif mou situé à l'apex des dents permanentes immatures. La zone riche en SCAPs est appelée « *apical cell-rich zone* » et se situe entre la pulpe radicaire et la papille apicale (figure 37).

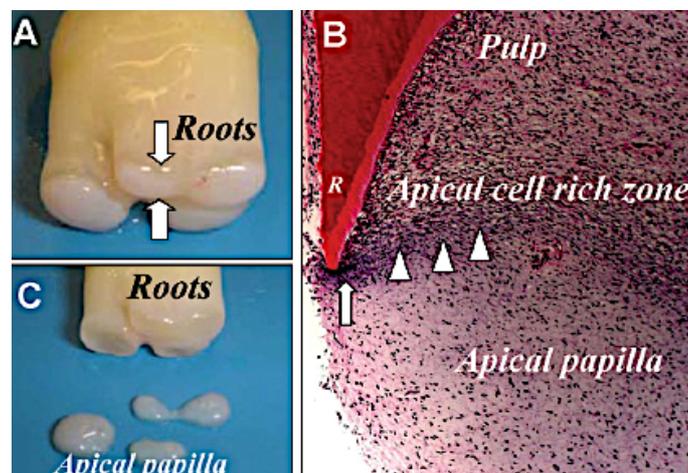


Figure 37 : anatomie et histologie de la papille apicale (source : Huang et coll., 2009)

Les SCAPs sont à l'origine de l'édification de la dentine radiculaire (différenciation en odontoblastes primaires). Venant donc d'un tissu en formation, les SCAPs semblent être une population de cellules souches supérieure pour la régénération tissulaire (Huang et coll., 2009). Cependant, cette source est soumise à la contrainte du temps car uniquement disponible lorsque les apex sont ouverts, c'est-à-dire au niveau des dents permanentes immatures. Les SCAPs se différencient des autres cellules souches par la présence d'un marqueur spécifique, l'antigène de

surface CD24. Le rôle de ce marqueur n'est pas encore totalement éclairé, cependant on peut penser que CD24 faciliterait l'isolation de ces cellules souches.

- Les cellules progénitrices du follicule dentaire DFSCs

Le follicule dentaire est un tissu de type mésenchymateux qui entoure l'émail et la papille apicale du bourgeon dentaire avant son éruption sur l'arcade dentaire (figure 38).

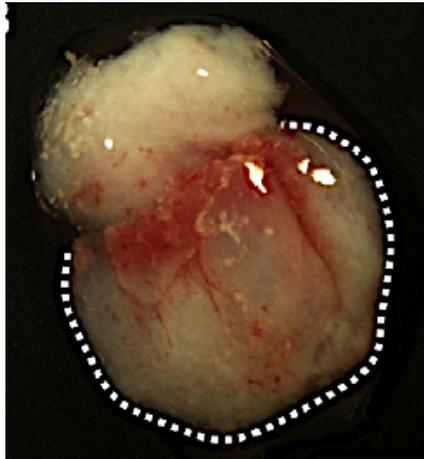


Figure 38 : troisième molaire incluse avec son follicule (source : Egusa et coll., 2012)

Dans le cas de dents incluses (le plus souvent des dents de sagesse), il ne disparaît jamais. On peut donc facilement envisager son utilisation.

Le follicule contient des cellules progénitrices responsables de la formation du parodonte, c'est-à-dire le desmodonte, le ciment et l'os alvéolaire.

Ainsi, ces DFSCs peuvent *in vitro* se différencier en chondrocytes, cimentoblastes, ostéoblastes, mais également en adipocytes, en myoblastes ou encore en neurones selon leur environnement d'intégration (Honda et coll., 2011).

Les DFSCs semblent avoir une prédisposition à induire la synthèse du ciment plutôt que du tissu osseux, n'étant donc pas aussi indifférenciées que les autres CSM (Nakajima et coll., 2018).

Cependant, tout comme les SCAPs, les DFSCs sont victimes du temps ; une fois la dent édifiée, le follicule dentaire disparaît et avec lui les cellules souches en question.

- Les cellules souches du ligament parodontal (PDLSCs)

Le ligament parodontal, aussi appelé desmodonte, se situe entre le cément des racines et l'os alvéolaire. C'est un tissu conjonctif riche en fibres de collagène.

Il renferme des CSM appelées CS du ligament parodontal PDLSCs, qui ont la capacité de former le desmodonte ainsi que le cément et l'os alvéolaire.

*In vitro*, les PDLSCs peuvent en fonction de leur environnement de culture, se différencier en odontoblastes, cémentoblastes, chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes. Selon Wang et coll. les caractéristiques des PDLSCs dépendraient de leur localisation. En effet, les PDLSCs situés au plus proche de l'os alvéolaire ont un potentiel de régénération osseuse supérieur aux PDLSCs situées au plus proche du cément (Wang et coll., 2011).

*In vivo*, elles induisent non seulement la régénération d'une structure type cément/desmodonte mais sont également impliquées dans la régénération osseuse. Les PDLSCs sont aisément récupérables sur les surfaces radiculaires lors d'avulsions dentaires. Cependant la partie du ligament qui nous intéresse le plus afin d'induire la régénération osseuse reste inévitablement attachée à la surface de l'alvéole vide (Wang et coll., 2011).

- Les cellules souches gingivales GSCs

La muqueuse orale se compose principalement de tissus conjonctif (*lamina propria*) et épithélial squameux. Deux types de cellules existent au sein de la muqueuse orale : une sous-population de kératinocytes ainsi que des CSM appelées GSCs (ou GMSCs). Ces cellules se juxtaposent au niveau du périoste, entourant le tissu osseux compact comme indiqué sur la figure 33. La gencive de la région rétro-molaire ainsi que celle recouvrant la crête alvéolaire sont aisément exploitables comme échantillons (Egusa et coll., 2012).

*In vitro*, les GMSCs sont capables de se différencier en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes (Jin et coll., 2014 ; Ghaderi et coll., 2018).

*In vivo*, les GMSCs sont capables d'induire l'ostéogenèse en se différenciant en ostéocytes (Dave et Tomar, 2018).

Il est également à noter que d'après Tomar et coll., les GMSCs prolifèrent plus rapidement que les BMSCs (Tomar et coll., 2010). Cette dernière caractéristique ajoutée à l'aisance et la technique non-invasive du prélèvement (car tout le monde possède de la gencive) font de ces GMSCs des cellules a priori idéales pour la régénération osseuse.

- Les cellules souches de la moelle osseuse des maxillaires (BMMSCs ou BMSCs)

Les cellules souches de la moelle osseuse des tissus osseux oro-faciaux ont plusieurs avantages.

D'une part, on peut aisément récupérer des échantillons d'os lors de chirurgies telles que les poses d'implant, les avulsions de dents de sagesse, les énucléations kystiques ou encore les ostéotomies.

D'autre part, l'âge du donneur importe peu et ne semble pas avoir d'influences néfastes sur la « qualité » des BMSCs (Egusa et coll., 2012).

Pour finir, les BMSCs sont tout aussi capables de régénérer du tissu osseux *in vitro* qu'*in vivo* (Dave et Tomar, 2018).

Cependant il semblerait que les BMSCs soient plus enclin à provoquer une réaction immunitaire en cas de transplantation allogénique que les autres CSM (Li et coll., 2018).

- Les cellules souches du périoste (PSCs)

Comme déjà énoncé précédemment, la couche profonde de périoste renferme non seulement des précurseurs ostéoblastiques et des ostéoblastes, mais également des CSM que l'on appelle PSCs.

De Bari a mis en évidence le caractère multipotent des PSCs en démontrant leur capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et myocytes tant *in vitro* qu'*in vivo* (De Bari et coll., 2006).

- Comparaison des CSM intra-orales (tableau 4)

Bien que les CSM orales aient des prédispositions différentes à former tel ou tel tissu, elles sont quasiment toutes capables *in vitro* d'engendrer : des ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, myoblastes et neurones. Les CSM d'origine pulpaire (DPSCs, SHED, SCAPs) ainsi que les CSM d'origine folliculaire et desmodontal ont une particularité supplémentaire ; elles peuvent synthétiser la matrice dentinaire respectivement le ciment (en se différenciant en cémentoblastes).

Tableau 4 : caractéristiques des différentes CSM orales (source : Liu et coll., 2015)

Cell Type	Isolation	PD	CD antigen expression		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> Tissue
			Positive	Negative	Multipotency	Formation Capacity
<b>DPSC</b>	++++	>120	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44,	CD14, CD19,	adipo, chondro, myo,	adipose, muscle,
			CD59, CD73, CD90, CD105,	CD24, CD31,	osteo, neuro, odonto,	dentin-pulp, bone
			CD106, CD146, CD166, CD271	CD34, CD45,	cardiomyo, HLCs,	
				CD117, CD133	melanocyte	
<b>SHED</b>	+++	>140	CD13, CD29, CD44, CD56, CD73,	CD11b, CD14,	adipo, chondro, myo,	bone, dentin-pulp,
			CD90, CD105, CD146, CD166	CD19, CD34,	osteo, neuro, odonto,	microvessel
				CD43, CD45	endothelial cell	
<b>PDLSC</b>	++++	ND	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44,	CD14, CD31,	adipo, chondro, osteo,	cementum, PDL
			CD59, CD73, CD90, CD105,	CD34, CD45	neuro, cemento	
			CD106, CD146, CD166			
<b>DFPC</b>	++	ND	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44,	CD31, CD34,	adipo, chondro, osteo,	alveolar bone, PDL,
			CD53, CD59, CD73, CD90, CD105,	CD45, CD133	neuro, cemento, HLCs	cementum
			CD106, CD166, CD271			
<b>ABMSCs</b>	++++	>30	CD13, CD29, CD44, CD71, CD73,	CD11b, CD14,	adipo, chondro, osteo	bone
			CD90, CD105, CD146, CD166	CD19, CD31,		
				CD34, CD45,		
<b>SCAP</b>	+++	>70	CD13, CD24, CD29, CD44, CD51,	CD14, CD18,	adipo, neuro, osteo,	dentin-pulp
			CD56, CD61, CD73, CD90, CD105,	CD34, CD45,	odonto, HLCs	
			CD106, CD146, CD166	CD117, CD150		
<b>TGPC</b>	+	ND	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105,	CD14, CD34,	adipo, osteo, chondro,	bone
			CD106, CD166	CD45, CD133	odonto, neuro, hepato	
					endothelial cell,	
<b>GMSC</b>	++++	>20	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105,	CD34, CD45,	adipo, chondro, osteo,	cartilage, bone, muscle
			CD106, CD146, CD166	CD117	neuro, endoderm cell	

*PD* : population doubling ; *ND* : not determined ; *odonto* : odontoblast ; *osteo* : osteoblast ; *adipo* : adipocyte ; *chondro* : chondrocyte ; *myo* : myoblast ; *neuro* : neuronal cell ; *hepato* : hepatocyte ; *cemento* : cementoblast ; *HLCs* : hepatocyte-like-cell ; *cardiomyo* : cardiomyocyte ; *PDL* : periodontal ligament

En plus d'être aisément accessibles (dents de sagesse), extraites et isolables, de se multiplier très rapidement et de former du tissu osseux *in vivo*, les CSM de la pulpe dentaire DPSCs sont les plus étudiées parmi les cellules souches intra-orales.

Ainsi, à l'aide d'études menées sur les DPSCs, nous détaillerons ultérieurement le protocole d'extraction, d'isolation et de mise en culture de DPSCs à des fins de régénération osseuse.

- Les cellules souches extra-orales

La littérature expose majoritairement des études sur les cellules souches de la moelle osseuse (BMMSCs ou BMSCs) et du tissu adipeux (ASCs : *Adipose Stem Cells*).

- Les cellules souches de la moelle osseuse (BMSCs ou BMMSCs)

Rappelons que la moelle osseuse représente le plus grand réservoir de CSM du corps humain. Les BMSCs possèdent toutes les caractéristiques des CSM et sont ainsi capables de se différencier en différents types cellulaires, dont les ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et myoblastes. De plus, elles possèdent un fort potentiel de reproduction.

*In vivo*, on peut observer la formation de tissu osseux, caractéristique essentielle pour la recherche sur la régénération osseuse. Cependant quelques points négatifs sont à relever.

Tout d'abord, la récupération d'un échantillon de moelle osseuse (crête iliaque pour la plupart du temps) est une technique invasive car elle nécessite l'anesthésie générale du donneur.

De surcroît, un échantillon de moelle osseuse extra-orale ne contient qu'un pourcentage très faible de CSM.

Il existe également une corrélation entre l'augmentation de l'âge du donneur et la diminution du nombre de cellules dans l'échantillon. On observe aussi une baisse de leurs potentiels de prolifération (senescence) et de différenciation *in vitro* au fil du temps (Egusa et coll., 2012).

Pour ces raisons, et en comparaison avec les DPSCs, il paraît compréhensible que l'utilisation des BMSCs extra-orales ne soit plus indiquée pour la régénération osseuse des tissus osseux oraux.

- Les cellules souches du tissu adipeux (ASCs)

Les cellules du tissu adipeux représentent une bonne alternative aux BMSCs. Il existe deux types de tissu adipeux, le tissu brun et le tissu blanc. Le tissu brun se trouve dans le médiastin, le cou et dans la région inter-scapulaire des nouveau-nés. Le tissu adipeux blanc est le plus répandu.

Les caractéristiques des ASCs dépendent de leur source. Par exemple, les ASCs issus du tissu adipeux superficiel de la région abdominale sont moins soumis à l'apoptose que ceux d'autres régions ; la plus grande concentration d'ASCs se trouve dans le tissu adipeux des bras et la plus grande plasticité d'ASCs est observée chez les ASCs du tissu adipeux inguinal (Si et coll., 2019).

Ainsi l'un des avantages réside dans la facilité d'accès. En effet le tissu adipeux représente un large pourcentage du poids total humain et la lipoaspiration du tissu adipeux sous-cutané n'est pas une technique invasive.

De plus, il est connu que les ASCs ont la capacité de se différencier *in vitro* et *in vivo* notamment en précurseurs adipocytaires, ostéogéniques, chondrogéniques et myogéniques (Si et coll., 2019). Il a été observé que le pré-traitement des ACSs par BMP-2 en vue d'une pré-différenciation ostéogénique pouvait être bénéfique (contrairement aux BMMSCs) (Shanbhag et coll., 2019).

Les ASCs semblent donc être une bonne alternative aux BMSCs, non seulement par leur accessibilité non-invasive et aisée mais également par le nombre élevé de cellules récoltées viables pour la culture cellulaire.

- Les cellules iPS

Shinya Yamanaka est à l'origine des cellules souches pluripotentes induites. Partant du principe de plasticité des cellules souches et plus particulièrement de la reprogrammation par dédifférenciation, il a décidé d'induire l'expression de certains facteurs de transcription responsables de la pluripotence au sein d'une cellule différenciée afin de la dédifférencier en cellule pluripotente.

Quatre facteurs de transcription majeurs et nécessaires à la dédifférenciation ont ainsi été mis en évidence : Oct3/4, c-Myc, Klf4 et Sox2 (Sansac et coll., 2016).

Ainsi, deux semaines sont suffisantes pour obtenir une cellule souche pluripotente dite induite à partir de n'importe quelle cellule différenciée (Takahashi et Yamanaka, 2006).

Des études récentes ont montré qu'il était possible d'obtenir des ostéoblastes et des ostéoclastes viables à partir de cellules iPS (figure 39) (Csobonyeiova et coll., 2017).

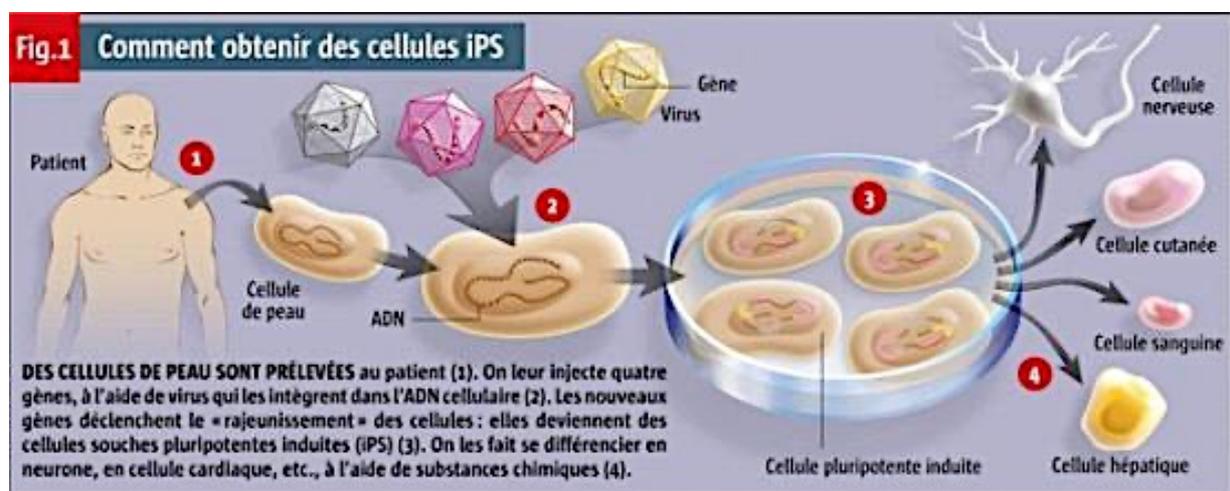


Figure 39: comment obtenir des cellules iPS (source : Klingler, 2008)

#### d) Isolation des DPSCs

À ce jour il n'existe pas de protocole standard détaillant le procédé d'isolation des DPSCs. Nous avons choisi de décrire le protocole mis en place par Alsulaimani et coll. en 2016 (figure 40).

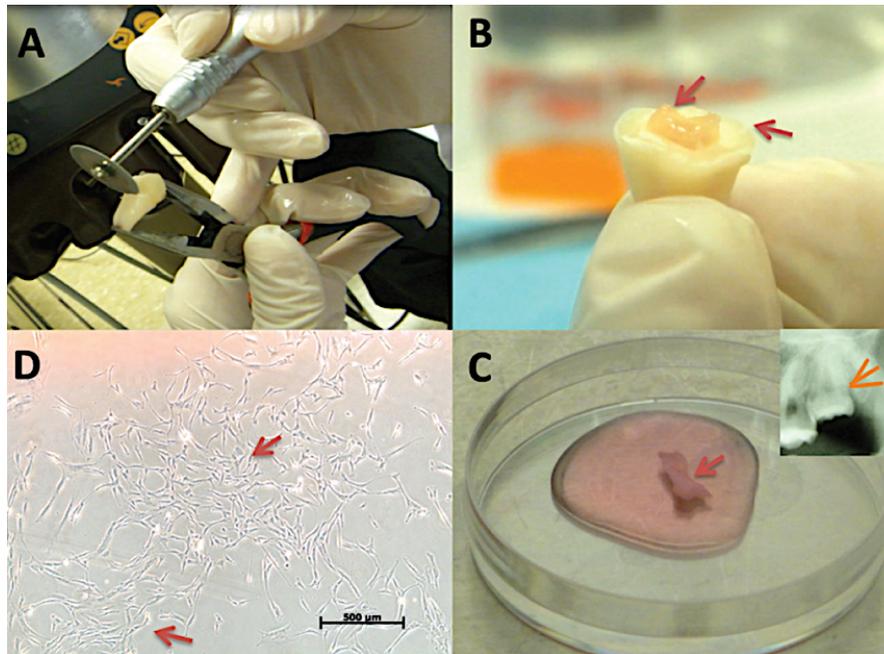


Figure 40 : Procédé d'extraction de la pulpe dentaire (source : Alsulaimani et coll., 2016)

Après avoir extrait la dent du donneur, celle-ci est brossée dans 2mL d'une solution désinfectante (digluconate de chlorhexidine) durant 30 secondes. Elle est ensuite rincée dans un bain de sérum physiologique avant d'être à nouveau trempée dans une autre solution désinfectante durant 30 secondes (Alsulaimani et coll., 2016).

Avant d'être transportée au laboratoire, la dent est conditionnée dans un tube contenant une solution antibiotique (pénicilline-streptomycine, Pen-Strep) à 4°C pendant 24 heures (Cuisinier, 2016).

À l'aide d'un disque diamanté, la dent est séparée en deux au niveau de la jonction amélo-cémentaire (Figure 40a et 40b).

La pulpe est récupérée à l'aide d'une pince hémostatique et d'une lime endodontique K. La pulpe est taillée en cubes de moins de 2mm<sup>3</sup> à l'aide d'un scalpel avant d'être déposée dans un tube de centrifugation (Alsulaimani et coll., 2016).

Afin de permettre la digestion enzymatique ayant pour but d'éliminer le système extra-cellulaire et donc d'isoler les cellules, on ajoute des solutions enzymatiques dans le tube que l'on place dans un agitateur-incubateur pendant 20-45 minutes à 37°C. L'isolation des cellules peut également se faire par digestion mécanique : la pulpe est fragmentée puis déposée dans des boîtes de culture à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> contenant du sérum physiologique, des antibiotiques et des antifongiques (Stanko et coll., 2014). Cependant, il semble que la méthode d'isolation des DPSCs et SHED la plus employée et la plus efficiente reste la digestion enzymatique (Cristaldi et coll., 2018).

Enfin, il s'agit d'isoler les cellules souches recherchées des autres cellules. On dénombre 4 techniques différentes :

- Par adhésion au plastique : sachant que les cellules souches ont la capacité d'adhérer au plastique, la suspension cellulaire obtenue par digestion enzymatique est déposée dans une boîte de culture. Les DPSCs prolifèrent et on obtient des unités formant des colonies de fibroblastes (UFC-Fs) adhérentes au plastique.
- Par migration et multiplication : technique utilisée après la digestion mécanique.
- Par ordre de grandeur : en tamisant la suspension de cellules obtenue par digestion enzymatique, on récupère les cellules souches adultes grâce à leur diamètre inférieur aux autres types cellulaires.
- Par immunosélection (tri par actions magnétique ou fluorescente).

Suite à l'isolation, il est nécessaire de mettre les CSM en culture afin d'en obtenir un très grand nombre. Ainsi elles sont placées à l'étuve dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture. Lorsque la surface de culture est presque totalement recouverte, les cellules sont récoltées et de nouveau cultivées afin d'obtenir plusieurs colonies. Cet acte est appelé passage en culture cellulaire.

Certaines études ont montré que les DPSCs pouvaient supporter autour de 25 passages, tandis que d'autres affirment qu'elles peuvent supporter jusqu'à 60 et même 80 passages (Dave et Tomar, 2018).

### 3.3.2 Les matériaux de support pour la croissance tissulaire ou scaffold

Il semble logique d'affirmer qu'afin d'obtenir du tissu osseux, les biomatériaux de support, aussi appelés scaffolds ou échafaudages, se doivent d'imiter au mieux la structure de la matrice extra-cellulaire du tissu osseux.

Ainsi, qu'ils soient artificiels ou naturels, ils jouent un rôle de barrière, de structure 3D guidant l'ostéogénèse mais également de réserve des nutriments nécessaires.

Ainsi le cahier des charges doit remplir certaines caractéristiques :

- Une macro-géométrie et une microarchitecture se rapprochant au plus de celles du tissu osseux
- Présenter une activité biologique
- Détenir des propriétés mécaniques similaires au tissu osseux (Nyberg et coll., 2017).

Plus la macro-géométrie et la microarchitecture seront respectées, meilleur sera le résultat. La disposition des pores est donc fondamentale. La migration des cellules ainsi que leur distribution uniforme dans le scaffold en dépendent. Une corrélation entre la haute porosité et la croissance de tissu osseux a été observé *in vivo*. La migration et la prolifération des ostéoblastes s'intensifient au sein d'un scaffold de collagène-glycosaminoglycane possédant des pores de 300 $\mu$ m. De surcroît, la vascularisation, nécessaire au bon développement, à la survie et à la viabilité du produit tissulaire dépend également de la taille des pores. Des scientifiques indiquent que des pores entre 160 et 270 $\mu$ m permettent un fort développement des vaisseaux. La connexion entre les pores est tout aussi importante au bon développement tissulaire (Nyberg et coll., 2017).

Selon Zhang et coll., un scaffold idéal doit avoir une porosité de 90% et un diamètre de pores entre 300 et 500 $\mu$ m afin de laisser passer tous les acteurs de l'ostéogénèse.

L'échafaudage se doit également de servir de substrat afin de permettre l'ancrage des molécules de signal incorporées. Celles-ci induisent et guident la différenciation ainsi que la prolifération ostéoblastique.

La résultante de ces caractéristiques induit l'ostéoconductivité qui permet aux cellules d'adhérer, de proliférer et de former du tissu matriciel à la surface du scaffold et au niveau de ses pores (Zhang et coll., 2018).

Les potentiels d'adhésion, de différenciation et de prolifération des CSM au sein du scaffold dépendent également des composants de ce dernier (Cristaldi et coll., 2018). Autrement dit, les scaffolds aident au maintien du potentiel de régénération osseuse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

En plus de devoir être biocompatible et non toxique pour le corps humain, le scaffold doit être résorbable. En effet, la résorption de l'échafaudage doit être concomitante avec la synthèse du tissu osseux pour ne laisser au final qu'un produit tissulaire implantable (Aumailley, 2019).

Les biomatériaux polymères mis à profit en ingénierie tissulaire peuvent être catégorisés en deux types majeurs :

- Les matériaux polymères naturels comme le collagène, le chitosane, l'élastine, les glycosaminoglycanes, la fibrine, l'alginate, l'agarose et la soie. Ils remplissent le cahier des charges en terme de biocompatibilité, de biodégradabilité et de structure 3D solide, or leurs modifications afin de contrôler la structure sont limitées (Galler et D'Souza, 2011).
- Les matériaux polymères synthétiques tels que l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le fumarate de polypropylène, les polyhydroxyalcanoates (PHA) ainsi que leurs copolymères d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA). Les polyesters PCL, PLA, PGA et leurs copolymères PLGA sont les plus utilisés en ingénierie tissulaire de par leur stabilité mécanique, leur composition cytologique et leur capacité de résorption. Cependant les polyesters PLA et PGA ne sont pas compatibles avec la régénération osseuse (Thrivikraman et coll., 2017).

En plus de ces types de scaffolds, on peut ajouter les biocéramiques telles que les scaffolds d'hydroxyapatite, de phosphate de calcium ou encore les céramiques bioactives.

Parmi les polymères naturels, on compte aussi les hydrogels. Ils se composent de gel de fibrine adjoint à du polyéthylène glycol (PEG) ou de glycosaminoglycanes (GAG) ou d'agrégats de peptides et d'eau.

Ils sont dotés d'une propriété viscoélastique comparable à celle des tissus du corps humain, mais permettent également le transport efficace de nutriments et de produits métaboliques, l'encapsulation cellulaire uniforme, leur injection *in vivo* et la gélification *in vivo*.

Ils peuvent être chimiquement ou physiquement modifiés par ajout de molécules afin d'obtenir le meilleur échafaudage possible selon la situation (Galler et D'Souza, 2011). Les hydrogels semblent donc être une bonne alternative aux polymères.

Certains polymères naturels comme la gélatine, le collagène, le chitosane ou la soie ont la capacité de mimer la structure, la composition chimique ainsi que les propriétés biochimiques de la matrice extra-cellulaire du tissu osseux. De surcroît, en plus de posséder une immunogénicité relativement faible, ces polymères peuvent stimuler une réponse et une fonction cellulaires appropriées tout en endossant un remodelage tissulaire.

De plus, le collagène occupe une grande partie de l'espace matriciel extra-cellulaire des vertébrés. On pourrait donc en déduire que les éponges de collagène sont un excellent scaffold. Cependant, ses propriétés mécaniques sont trop faibles comparées à celle du tissu osseux naturel ; ainsi un matériau de support contenant uniquement du collagène ne peut donner un tissu osseux satisfaisant (Thrivikraman et coll., 2017). Ainsi, en plus de pouvoir une grande capacité de support cellulaire, les polymères naturels guident le développement des cellules, faisant de ce fait interagir le scaffold avec le tissu (Thrivikraman et coll., 2017).

Le grand avantage des polymères synthétiques réside dans le fait que leurs propriétés mécaniques et chimiques, telles que le diamètre des pores et le degré des interconnexions, sont contrôlables. En contrepartie, leur biocompatibilité est nettement moindre que celles des polymères naturels (Cristaldi et coll., 2018).

Il est donc intéressant de mettre en place des polymères combinés afin de tirer avantage à la fois des polymères naturels et synthétiques.

Par conséquent on retrouve dans la littérature une grande quantité d'associations de scaffolds différents.

*In vitro*, Dave et Tomar décrivent l'association des DPSCs avec des biomatériaux à base de fibrine, des microscaffold de PLGA, des hydrogels peptidiques, des hydrogels de gélatine polyéthylène glycol diacylatehyuronan, des biomembranes d'aluminate de calcium chitosane-collagène ainsi qu'avec des scaffolds fibreux de montmorillonite/poly(vinyl alcohol) intercalés de chitosane.

Ces associations ont induit une biocompatibilité, une viabilité des cellules et une différenciation cellulaire aboutissant avec succès à la régénération de tissu osseux.

L'association de polymères a également été étudiée *in vivo*. Ainsi, des scaffolds contenant du HA/TCP (hydroxyapatite/phosphate tricalcique), du nanoHA collagène/poly(L-lactide), du PLGA, du collagène, de la fibrine, du plasma riche en plaquettes (PRP) ou encore des hydrogels nano-fibrés ont montré la formation de structures ressemblant à du tissu osseux en les associant avec des DPSCs (Dave et Tomar, 2018).

L'extrait de tableau suivant, édité par Dave et Tomar, indique les scaffolds compatibles afin d'obtenir des ostéoblastes à partir de DPSCs (tableau 5). On constate, que le nombre de scaffolds compatibles avec la régénération osseuse est élevé. Ces études ayant été menées sur des rats, on peut supposer que les résultats sur l'homme ne sont pas identiques et que certains échafaudages sont plus prometteurs que d'autres.

Tableau 5 : scaffolds associables avec les DPSCs (d'après : Dave et Tomar, 2018)

D-MSC	Tissue regenerated application	Characteristic markers	Method/procedure and outcome
	Osteoblast	OCN, ALP, OPN, LAB nodules	<ol style="list-style-type: none"> <li>Scaffolds <ul style="list-style-type: none"> <li>HA/TCP, subcutaneous, immunocompromised mice</li> <li>Biocerams and bioactive glass</li> <li>PLGA</li> <li>Collagen</li> <li>Col1-HA-PLCL</li> <li>Nanofiber hydrogel</li> <li>Chitosan intercalated organic montmorillonite/poly(vinyl alcohol) fibrous</li> <li>PEG diacrylatehyaluronan-gelatin hydrogels</li> <li>Chitosan-collagen calcium aluminate biomembrane</li> <li>nHAC/PLA</li> <li>PRP</li> <li>Fibroin</li> <li>Bio-Oss in mesial, three-walled, periodontal defects</li> <li>Polylactic</li> <li>Alginate hydrogel microspheres</li> <li>HA</li> <li>GDPB</li> <li>βTCP</li> <li>Collagen-chitosan</li> <li>MTA</li> <li>Hyaluronic-based hydrogel scaffold</li> <li>Calcium sulfate/calcium phosphate bone grafts</li> </ul> </li> <li>CD34+ cells; subcutaneous pockets of back of immunocompromised rats; bonenodule formation</li> <li>Bone nodule formation and matrix proteins associated with mineralized tissue</li> </ol>

Le choix du scaffold dépend au final des buts de l'étude menée. En plus de pouvoir combiner les polymères, ils peuvent être liquides ou solides. Le choix dépend tout aussi bien de la taille du défaut osseux que de la taille de l'animal receveur. Le plus souvent, l'échafaudage est sous forme solide (Cristaldi et coll., 2018).

Depuis quelques années on voit apparaître dans la littérature de plus en plus d'études sur l'impression de scaffold en 3D. Cependant, étant récentes, la majorité des études n'ont pas encore abouti (Ho-Shui-Ling et coll., 2018). Ce concept est intéressant dans la mesure où l'on pourrait induire la régénération osseuse de larges défauts osseux notamment cranio-faciaux.

Parmi les avantages de l'impression 3D, on compte :

- La capacité de contrôler l'architecture 3D interne et externe de l'échafaudage
- L'aisance de fabrication
- La création du scaffold à partir de plusieurs matériaux
- La maîtrise du comportement cellulaire et la réponse mécanique en prédéfinissant l'architecture (Thrivikraman et coll., 2017).

Ainsi, cette technique permet de définir la porosité, la taille des pores et la connexion entre les pores de l'échafaudage (Zhang et coll., 2018).

### 3.3.3 Les différents facteurs bioactifs impliqués

En plus des CSM et d'un biomatériau de support, il est nécessaire *in vitro* d'y ajouter des molécules bioactives afin d'induire la prolifération et la différenciation cellulaire. Physiologiquement ces molécules sont responsables de l'enrôlement des cellules indifférenciées et de l'activation de la production des protéines de la matrice extra-cellulaire.

Ces molécules regroupent des molécules de signal, des protéines, des gènes, des facteurs de transcription et des facteurs de croissance.

Rappelons les facteurs de croissance impliqués dans l'ostéogenèse :

- La famille des TGF (*Transforming Growth Factor*) qui comprend le TGF- $\beta$  ainsi que les BMP (*Bone Morphogenic Protein*)
- La famille des FGF (*Fibroblast Growth Factor*)
- La famille des IGF (*Insulin-like Growth Factor*)
- La famille des VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

Parmi ces familles, certains facteurs jouent un plus grand rôle que d'autres.

C'est notamment le cas du BMP-2. La littérature regorge de papiers démontrant une bonne régénération osseuse en associant BMP-2 à une éponge de collagène de type 1 en tant que scaffold (Ho-Shui-Ling et coll., 2018). Cela peut s'expliquer par le fait que BMP-2 agit tout au long de l'ostéogenèse, depuis la différenciation jusqu'à la prolifération des pré-ostéoblastes, jusqu'à leur maturation (tableau 3).

En plus de BMP-2, les facteurs BMP-4, 6 et 7 montrent également des capacités ostéoinductives (Dave et Tomar, 2018 ; Ju et coll., 2019).

La famille des VEGF est tout aussi importante, car elle va permettre la bonne vascularisation du tissu et donc son intégration et sa viabilité.

Ici aussi, les choix du facteur et sa dose administrée sont à étudier selon le résultat voulu. Les facteurs de croissance étant hâtivement dégradés par le corps humain, cela implique d'instaurer un système de délivrance permettant le contrôle et la durabilité de leur activité (Ho-Shui-Ling et coll., 2018).

### 3.3.4 La période de maturation

Cette durée dépend entièrement du biomatériaux de support utilisé ainsi que des CSM et des facteurs adjoints, mais également du produit tissulaire final voulu.

### 3.4 Les différents PIT (produit d'ingénierie tissulaire) produits

Nous nous intéresserons ici à deux types de PIT : les produits à implanter et les produits déjà implantés.

Nous choisirons de ne présenter que des cas d'applications cliniques humaines endo-buccales.

Les premiers consistent à ensemercer un support (sur mesure ou non) de CSM afin d'obtenir un tissu de type osseux et d'implanter ce dernier à l'endroit du défaut osseux. On obtient donc ces PIT *in vitro* avant de les implanter *in vivo*.

Les seconds consistent à implanter un support (sur mesure ou non) à l'endroit du défaut osseux et de l'ensemencer ensuite de CSM. On est donc en présence de PIT produits *in vivo*.

#### 3.4.1 Production *in vitro*

Le principe de production de tissu osseux *in vitro* est relativement simple : les CSM différenciées en cellules ostéogéniques sont déposées sur un biomatériau de support (scaffold). On y ajoute des facteurs de croissance afin d'induire la régénération osseuse.

Le scaffold peut être fabriqué sur mesure ou non. Il est intéressant d'utiliser l'impression 3D afin de produire des scaffolds sur mesure lorsque les défauts osseux sont de grandes tailles. Nous en verrons un exemple par la suite.

##### a) Prélèvement et culture des CSM

Tout d'abord il est nécessaire de prélever les CSM voulues, de les isoler puis de les mettre en culture afin d'en obtenir un nombre suffisant. Nous avons décrit plus

haut le protocole d'isolation des DPSCs, et mis à part le prélèvement, il est quasiment identique pour toutes les autres CSM.

La culture cellulaire permet d'obtenir grand nombre de CSM afin d'avoir un maximum de chance de réussite. En général on réalise entre 2 et 5 passages cellulaires. Le milieu utilisé contient souvent :

- Du *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)
- Du sérum fœtal bovin (SFB) remplacé par du sérum humain dans le cas d'applications humaines
- Des antibiotiques (ATB) afin de limiter le risque de transmission de maladie zoonotiques (pénicilline-streptomycine) (Haj et coll., 2017)
- Certains autres adjuvants comme la caséine, la glutamine ou l'albumine humaine peuvent également être ajoutés (Alsulaimani et coll., 2016 ; Gjerde et coll., 2018 ; Miles et coll., 2019).

#### b) Différenciation ostéoblastique

L'étape suivante aboutit aux cellules de la lignée ostéoblastique (précurseurs et ostéoblastes), c'est la différenciation ostéoblastique.

On peut y arriver de deux façons :

- Soit en induisant la différenciation grâce à un milieu de culture spécifique sur lequel on dépose les CSM
- Soit en introduisant les CSM directement sur le biomatériau de support contenant des facteurs ostéoinducteurs.

Des études ont montré que la pré-différenciation en cellules ostéoblastiques avant implantation sur le support induisent une meilleure régénération osseuse (Shanbhag et coll., 2019).

Les papiers étudiés ont permis de proposer un milieu de différenciation ostéoblastique des CSM humaines reproductible (Alsulaimani et coll., 2016 ; Haj et coll., 2017 ; Si et coll., 2019).

Ce milieu contient :

- Du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) en grande partie
- De la dexaméthasone
- Du  $\beta$ -glycerophosphate
- De l'acide ascorbique (vitamine C).

L'adjonction de BMP-2 ainsi que d'autres facteurs de croissance à ce milieu peut optimiser l'ostéoinduction lors de l'utilisation d'ACS comme CSM (Si et coll., 2019). Cependant il est impératif de maîtriser les doses administrées afin de contrôler la différenciation.

### c) Conception d'un organoïde osseux

À l'aide d'un biomatériau de support et de cellules souches différenciées en ostéoblastes on peut obtenir du tissu osseux *in vitro*.

C'est ce que démontre une étude menée par Akkouch en 2012. Ce chercheur et son équipe ont mis au point un biomatériau de support permettant la viabilité et la croissance des ostéoblastes issus de la différenciation ostéogénique de DPSCs induisant ainsi la formation de nodules de tissu osseux.

Ils ont créé un scaffold composite hybride tridimensionnel hautement poreux composé de collagène de type I (Coll), d'hydroxyapatite (HA) et de polymère Poly acide (L-lactique-co- $\epsilon$ -caprolactone) (PLCL).

Le collagène et l'hydroxyapatite composent la partie naturelle du support, tandis que le PLCL constitue la partie synthétique.

Le collagène, protéine la plus répandue de la matrice extra-cellulaire osseuse, agit sur la viabilité des cellules tandis que l'HA permet leur l'adhésion (Gutiérrez-Prieto et coll., 2019). Le PLCL, qui est biodégradable, apporte l'élasticité nécessaire.

Les CSM utilisées sont des DPSCs provenant de la pulpe de troisièmes molaires extraites (patients âgés de 18 à 50 ans). Après extraction et isolation, les

DPSCs sont placées le milieu de culture type de la différenciation ostéoblastique (avec adjonction de sérum fœtal bovin au  $\alpha$ -MEM) pendant 3 semaines afin d'induire leur différenciation ostéoblastique. Le milieu de culture est changé toutes les 24 heures durant trois semaines.

Au bout de trois semaines, avant de déposer les DPSCs différenciées en ostéoblastes sur le support tridimensionnel Coll/HA/PLCL, ils ont vérifié la présence d'activité de phosphatase alcaline (ALP) (marqueur biochimique du phénotype ostéoblastique), de dépôt de calcium (preuve de minéralisation de la MEC) ainsi que l'expression du gène RUNX-2 (induit la différenciation ostéoblastique).

À l'issu de ces tests, les ostéoblastes dérivés des DPSCs sontensemencés sur des disques du scaffold préalablement coupés et stérilisés. Le scaffold témoin n'est composé que de PLCL, il s'agit donc d'un biomatériau polymère synthétique.

La morphologie des ostéoblastes intégrés au support a été observé au bout de 8 heures et de 24 heures (figure 41).

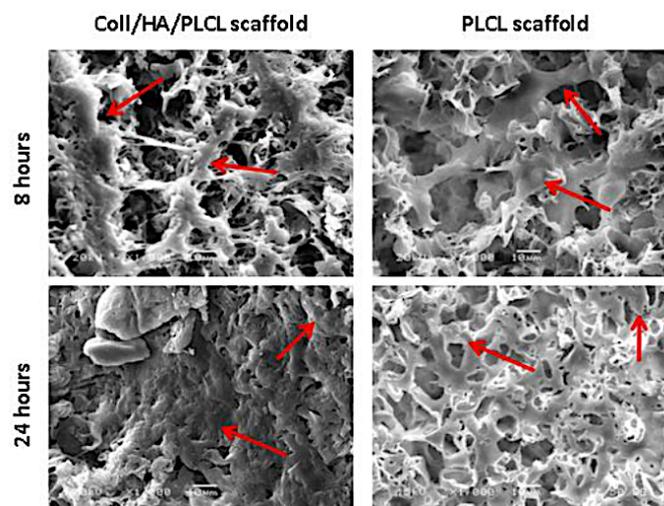


Figure 41 : observation microscopique des ostéoblastes cultivés sur les supports Coll/HA/PLCL et PLCL au bout de 8 et 24 heures (source : Akkouch, 2012)

Les flèches désignent les pseudopodes développés par les ostéoblastes afin d'adhérer au support. Tandis qu'ils sont évidents sur le scaffold Coll/HA/PLCL, ils paraissent plus aplatis et moins nets sur les scaffold PLCL.

L'histogramme suivant (figure 42) montre la nette différence d'adhésion au bout de 8 et 24 heures ainsi qu'entre les deux supports différents.

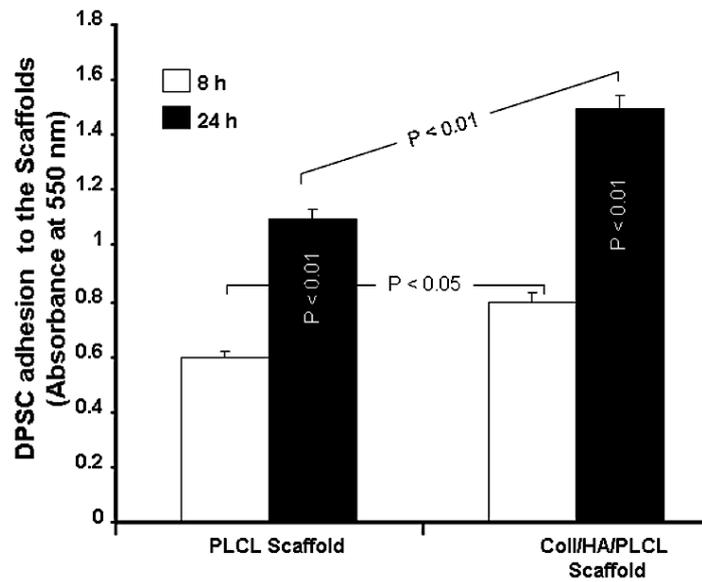


Figure 42 : diagramme montrant le taux d'adhésion des ostéoblastes aux supports d'étude et de témoin (source : Akkouch, 2012)

Tout au long des 3 semaines la croissance et la prolifération des ostéoblastes ont été mesurées (figure 43).

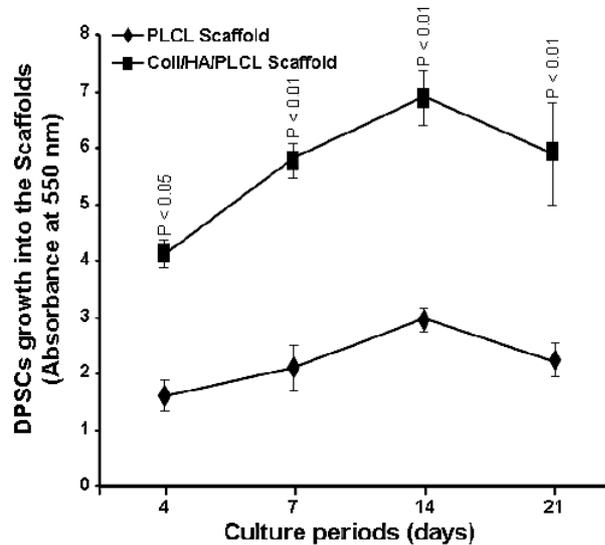


Figure 43 : diagramme indiquant le taux de croissance des ostéoblastes dérivés des DPSCs au sein des deux supports (source : Akkouch, 2012)

On observe une baisse de la croissance des ostéoblastes entre la deuxième et la troisième semaine expliquée par les chercheurs du fait de la confluence des ostéoblastes.

Le taux de phosphatase alcaline (produite par les ostéoblastes) témoigne de la bonne prolifération des ostéoblastes ainsi que de leur bon fonctionnement métabolique (figure 44).

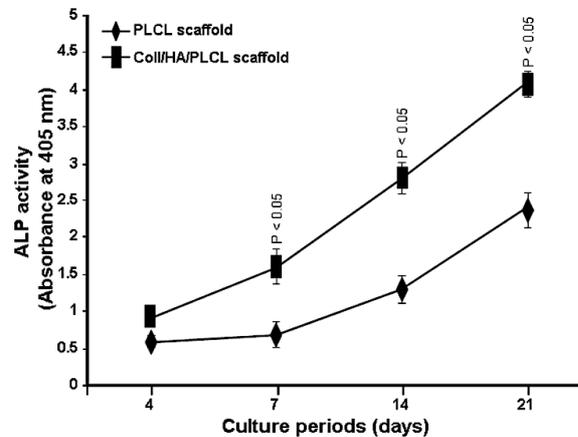


Figure 44 : diagramme indiquant l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes des scaffolds Coll/HA/PLCL et PLCL (source : Akkouch, 2012)

On observe une augmentation de cette dernière qui ne baisse pas entre la deuxième et la troisième semaine. Cela suggère une production continue de matrice extra-cellulaire malgré l'arrêt de la croissance des ostéoblastes.

L'équipe de chercheurs a également mesuré le taux de minéralisation de la matrice néoformée. On observe un taux de dépôt de calcium supérieur au sein du support Coll/HA/PLCL par rapport au support PLCL (figure 45). Ce taux nous renseigne donc sur la formation de nodules osseux formés à l'intérieur des supports.

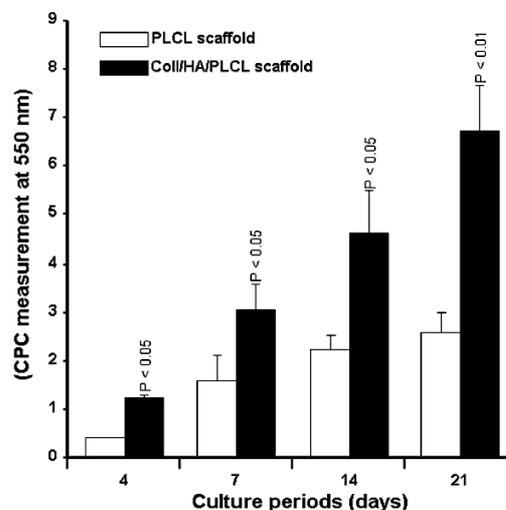


Figure 45 : diagramme montrant le taux de minéralisation au sein des supports Coll/HA/PLCL et PLCL (source : Akkouch, 2012)

Les chercheurs ont aussi étudié les nodules osseux formés au cours de ces 3 semaines. Ces nodules composés de calcium et de phosphate (molécules principales de la matrice osseuse) attestent de l'activité ostéogénique des ostéoblastes (figure 46).

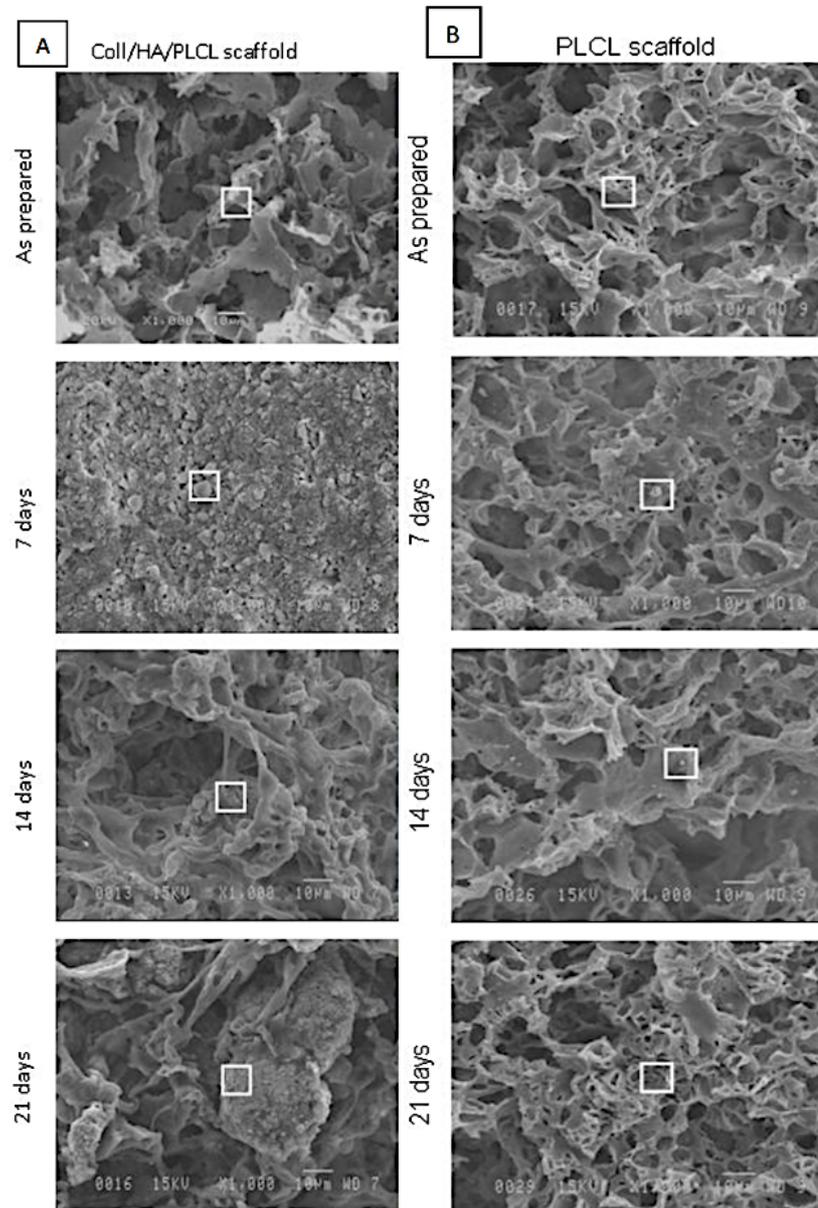


Figure 46 : photographies microscopiques des nodules osseux au sein des supports Coll/HA/PLCL (A) et PLCL (B) (d'après : Akkouch, 2012)

L'illustration suivante montre la reconstruction microscopique en 3D du support Coll/HA/PLCL avant dépôt des ostéoblastes dérivés des DPSCs (figure 47A) ainsi que 2 semaines après ensemencement (figure 47B). La première illustration montre bien

la structure poreuse du biomatériaux ; la seconde illustre bien la formation de matrice osseuse minéralisée.

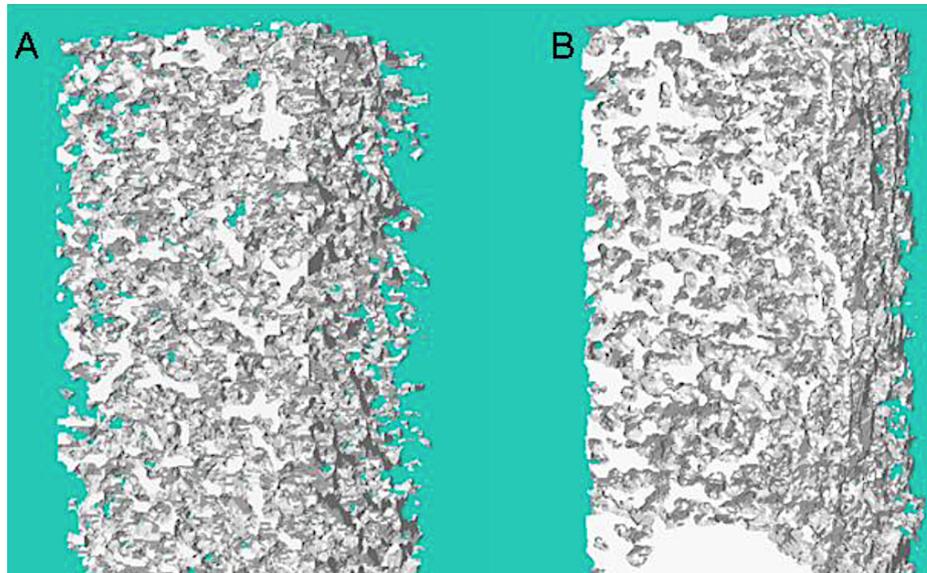


Figure 47 : reconstruction en 3D du support Coll/HA/PLCL avant introduction des cellules ostéoblastique (A) et 2 semaines après (B) (source : Akkouch, 2012)

Cette étude a permis de régénérer un organoïde osseux humain à partir de DPSCs différenciés en ostéoblastes et déposés au sein d'un biomatériaux de support fait de collagène de type I, d'hydroxyapatite et du polymère synthétique PLCL.

Les nettes augmentations des taux de croissance des ostéoblastes, de phosphatase alcaline et de minéralisation de la matrice en 3 semaines témoignent d'une activité ostéogénique des ostéoblastes.

L'arrêt de croissance des ostéoblastes après 2 semaines mais la poursuite de synthèse de phosphatase alcaline permet la genèse de nodules osseux sans empêcher la viabilité des ostéoblastes.

De plus, des analyses ont prouvé l'accroissement du durcissement interne du support de 27% et externe de 34% en 3 semaines.

#### d) Utilisation de l'impression 3D

Une équipe de chercheurs s'est intéressée à la reconstruction d'une structure osseuse 3D humaine mandibulaire à l'aide de l'impression 3D (Kang et coll., 2016). Leur but était de régénérer un fragment de mandibule utilisable afin de combler un défaut osseux suite à un traumatisme.

Les CSM utilisées étaient des cellules allogéniques, car dérivées du liquide amniotique humain (hAFSCs : *Human Amniotic Fluid Stem Cells*). Celles-ci sont capables de se différencier en cellules ostéoblastiques dans un milieu de culture donné.

Les dimensions du défaut osseux mandibulaire révélées par une tomodensitométrie et combinées à un logiciel de traitements d'images 3D ainsi que de conception et de modélisation ont permis de fabriquer un modèle 3D par CAO (conception assistée par ordinateur) (figure 48a). Les dimensions du bloc osseux à reconstituer étaient de 3,6 x 3,0 x 1,6 cm.

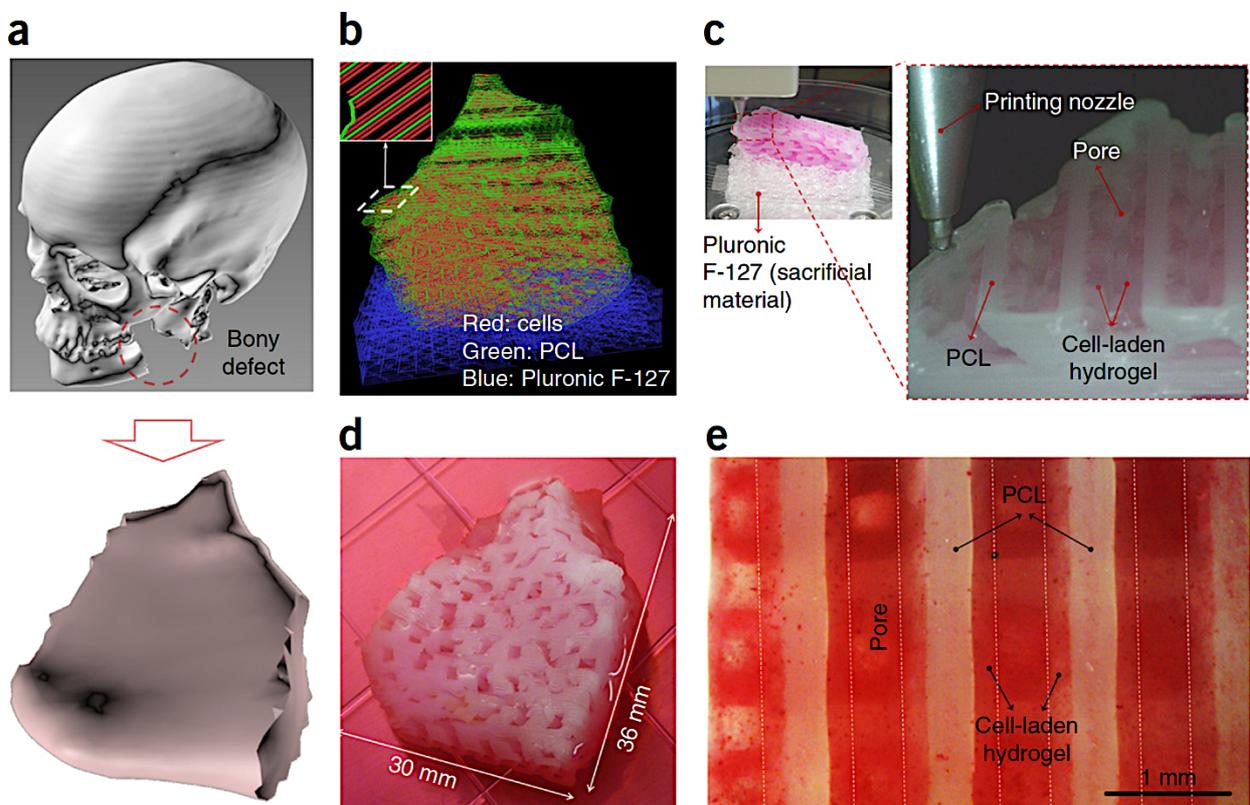


Figure 48 : reconstruction d'os mandibulaire (source : Kang et coll., 2016)

À l'aide du modèle, le logiciel a déterminé la composition que devait avoir le support. Il contenait ainsi un mélange de polycaprolactone (PCL), de phosphate tricalcique (TCP) et du polymère Pluronic F-127.

Les cellules hASCs ainsi que le PCL/TCP ont été mélangés à l'hydrogel puis imprimés sur le Pluronic F-127 qui servait de support d'impression temporaire (figure 48b et 48c).

Le taux de cellules survivantes après 24 heures était de  $91 \pm 2\%$ , ce qui prouve que le processus d'impression des cellules n'entrave pas la viabilité cellulaire. Après 28 jours de différenciation ostéoblastique et d'ostéoinduction des hASCs selon un certain protocole, le taux de minéralisation a été mesuré grâce à l'alizarine rouge, dont la particularité est de colorer le calcium en rouge. L'illustration 48d montre la structure tridimensionnelle obtenue au bout de 28 jours, tandis que la 48e montre la coloration rouge du calcium. On observe une structure tridimensionnelle dont les dimensions correspondent à celles du défaut osseux ainsi qu'une minéralisation évidente au sein du support.

Cette étude pré-clinique n'indique pas la possibilité d'implantation de la structure *in vivo*. Cette technique est intéressante, cependant il n'y a pas encore assez de recul pour l'utiliser en clinique humaine.

Le projet *H2020 Maxibone* mené par le Pr. Pierre Layrolle et subventionné par la Commission Européenne s'intéresse non seulement à la production par impression 3D de support osseux à partir de scanner auxquels sont ajoutés des cellules souches mais également à la régénération osseuse *in vivo* décrite par la suite.

### 3.4.2 Production *in vivo*

Parmi les quelques cas cliniques trouvés dans la littérature, nous avons décidé de retenir les trois plus récents.

#### a) Cas N°1 (Colangeli et coll., 2017)

Cette étude a été menée sur 5 patients présentant des défauts osseux mandibulaires et maxillaires suite à l'évolution de kystes dentigères bénins (figure 49). Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Volume des lésions supérieur à 2cm<sup>3</sup>, validé par une tomodensitométrie pré-opératoire
- Absence de comorbidité
- Patients non-fumeur.

Les patients, âgés de 41 à 59 ans, ont signé un consentement éclairé.



Figure 49 : photographie de la lésion avant implantation (source : Colangeli et coll., 2017)

Après résection des tumeurs, 40ml de moelle osseuse ont été aspirés depuis la crête iliaque des patients afin d'en extraire les BMSCs autologues. L'aspirat a été transféré dans des tubes de Regen THT (RegenKit Eextracell®) et le tout a été centrifugé durant 8 minutes. Ceci a permis d'obtenir un concentré de cellules

souches. Après avoir été ajoutées à un gel induisant l'isolation des BMSCs, les cellules ont été ajoutées à du gluconate de calcium sous forme de gel. Le tout a été introduit *in vivo* et le site a été suturé avec du fil résorbable.

Aucune complication (ni déhiscence, ni infection du site opératoire) n'a été observée.

Une tomodensitométrie des sites opératoires a été effectuée 6 mois après l'intervention (figure 50) avant d'évaluer le volume osseux obtenu ainsi que sa densité. Une nette augmentation du volume osseux et de la densité de tissu osseux spongieux de novo formé a pu être démontrée (tableau 6).

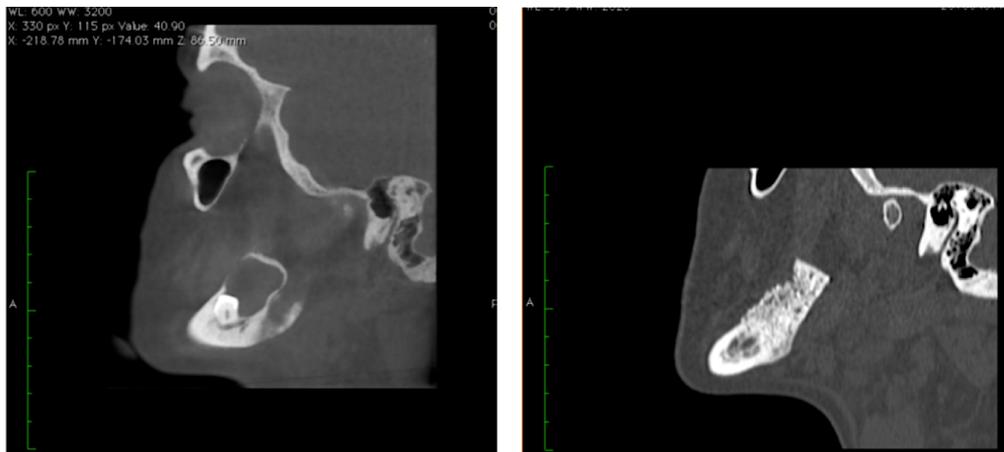


Figure 50 : tomodensitométries pré et post-opératoires (d'après : Colangeli et coll., 2017)

Tableau 6 : données des patients (source : Colangeli et coll., 2017)

Patients	Location	Age years	Sex	Volume of lesion from CT scan cm <sup>3</sup>	Bone density surgery pre-surgery HU	Bone density surgery post-surgery – CT scan HU
1	Mandible	49 Y	F	2,4	161	1167
2	Mandible	41 Y	F	3,1	195	1355
3	Mandible	55 Y	M	2,2	55	1284
4	Upper jaw	59 Y	M	2,0	190	985
5	Upper jaw	43 Y	F	2,5	254	898

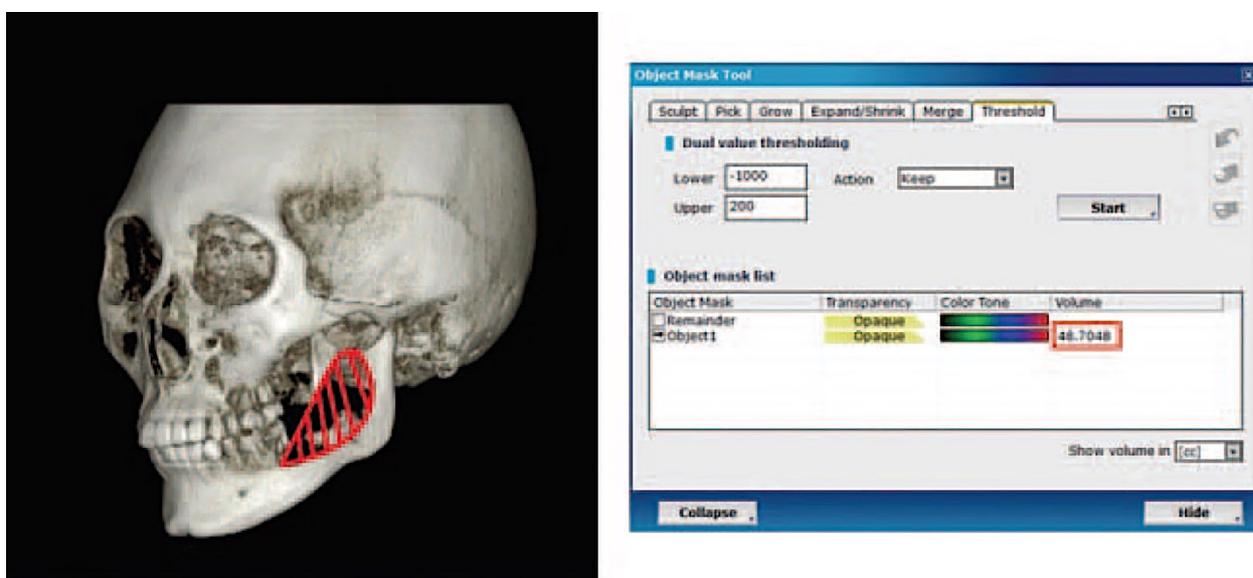
CT= Computed tomography; HU= Hounsfield units

Cette étude, à confirmer par une étude incluant un plus grand nombre de patients sur une plus longue durée, permet d'affirmer que la régénération osseuse par implantation de CSM issues de la moelle osseuse est une solution valable afin de traiter les défauts osseux oraux.

b) Cas N°2 (Son et coll., 2018)

Cette étude rapporte la régénération osseuse d'une portion de mandibule chez une enfant de 14 ans suite à la résection d'un améloblastome unikystique de type mural situé en postérieur de la première molaire mandibulaire gauche (figure 53a et 54a).

En raison de son jeune âge, de sa croissance non achevée et pour des raisons esthétiques, le traitement consistait à retirer la masse et à cureter l'os entourant la lésion (figure 51 et 52a).



En plus de la tumeur, le germe de la dent de sagesse ainsi que la deuxième molaire mandibulaires gauches ont été extraites sous anesthésie générale.

Un maillage en titane a été placé dans le site opératoire afin d'éviter son invasion par les tissus mous de la bouche (figure 53b).

Les chirurgiens ont profité de l'anesthésie générale pour prélever des CSM de la moelle osseuse de la crête iliaque avant gauche.

Environ 3ml de moelle osseuse ont été aspirés et introduits dans un milieu de culture standard (comme par exemple le DMEM) avec 10% de sérum fœtal bovin, 1% d'antibiotiques ainsi que 350 U/ml d'héparine.

Le tout a été centrifugé (1000 révolutions/minute) à 4°C pendant 5 minutes. Les pastilles obtenues ont été mélangées dans 10ml de milieu de culture puis mises en culture cellulaire durant 5 jours à 37°C avec un taux de dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> de 5% et 100% d'humidité afin d'induire la différenciation ostéoblastique des cellules.

Le milieu de culture se compose des mêmes composants proposés par Alsulaimani et coll. en 2016 et Haj et coll. en 2017, c'est-à-dire : d'acide ascorbique (vitamine C), de  $\beta$ -glycerophosphate et de dexaméthasone.

Tout au long des deux semaines de culture, l'alazarine rouge a été utilisée afin de prouver la présence de calcium et donc de l'activité de la phosphatase alcaline. Un second passage cellulaire a été effectué avant d'utiliser les cellules *in vivo*.

À 6 semaines post-opératoires, les cellules différenciées ont été mélangées à de la colle de fibrine puis injectées au sein du défaut.

Un an après l'opération, le maillage en titane a été retiré (sous sédation par voie intraveineuse) laissant apparaître un tissu osseux nouvellement régénéré (figure 52b, 53c et 54b).

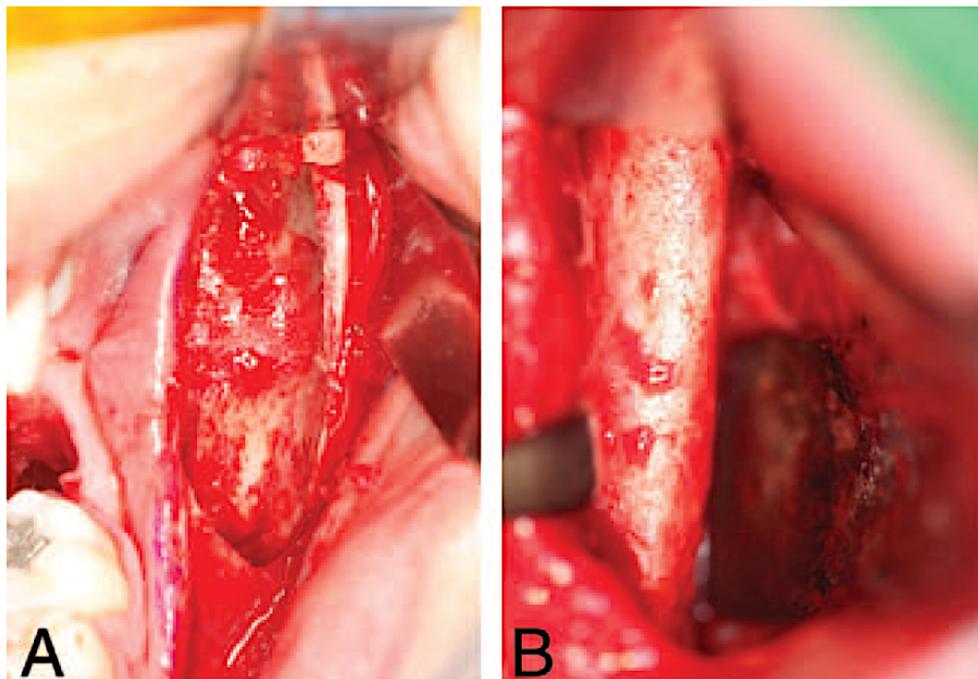


Figure 52 : photographie durant la première opération (A) et lors du retrait du maillage (B) (source : Son et coll., 2018)

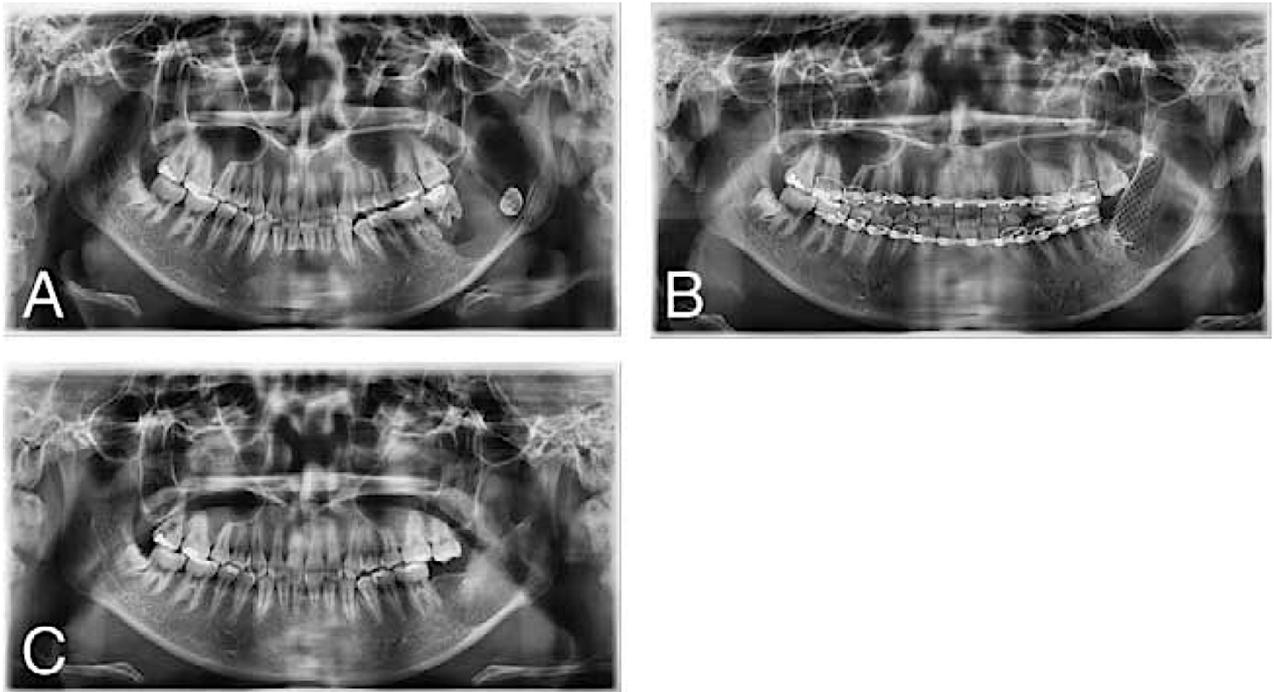


Figure 53 : orthopantomogrammes avant opération (A), après résection et insertion du maillage en titane (B), après retrait du maillage et titane (C) (source : Son et coll., 2018)

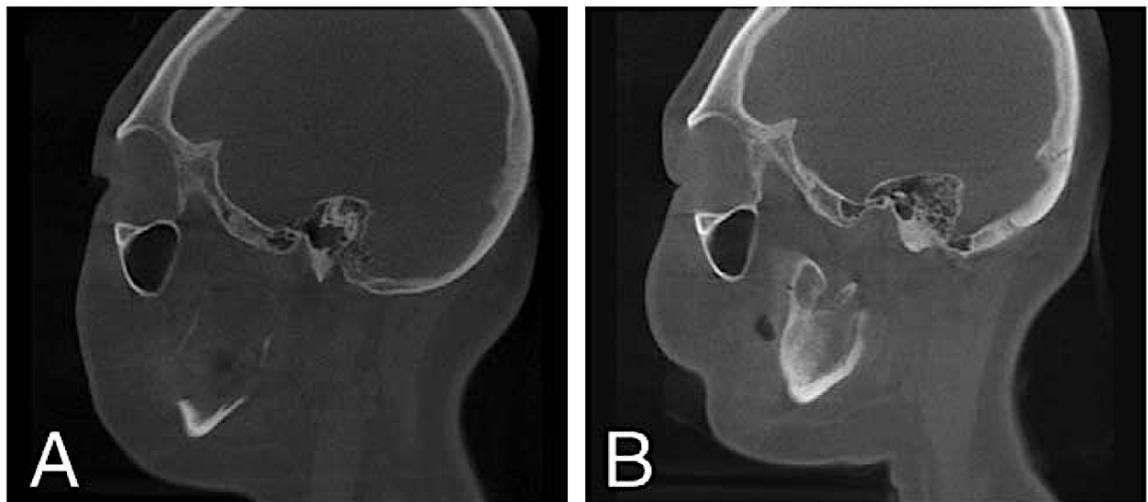


Figure 54 : tomographie avant opération (A) et après retrait du maillage en titane (B) (source : Son et coll., 2018)

Deux ans après le retrait du maillage, aucune récurrence tumorale n'a été observée. En plus de cela, les examens radiographiques montrent une nette régénération osseuse du secteur mandibulaire postérieur gauche suite à l'introduction de cellules souches différenciées en cellules ostéoblastiques, ce qui prouve la réussite de l'utilisation de BMSCs afin d'induire la régénération osseuse après résection d'une tumeur bénigne de l'os mandibulaire.

c) Cas N°3 (Gjerde et coll., 2018)

Une équipe de scientifiques a mené une étude en 2018 sur treize patients, âgés de 52 à 75 ans, présentant un large édentement mandibulaire postérieur avec une crête alvéolaire de moins de 4,5mm. Cette étude avait pour but de régénérer de l'os *in vivo* afin de pouvoir poser une prothèse implanto-portée par la suite.

Tout d'abord, une tomodensitométrie de la zone édentée à traiter ainsi que des empreintes ont été réalisés.

Sous anesthésie locale, 15-20ml de moelle osseuse provenant de la crête iliaque postérieure ont été aspirés dans des seringues préalablement remplies de 1000 UI d'héparine.

Arrivées au laboratoire, la viabilité des BMSCs a été étudiée. Sur les treize patients, deux n'ont pas pu être retenus pour cause d'insuffisance de BMSCs dans les échantillons.

Les cellules ont été cultivées au sein du milieu de culture  $\alpha$ -MEM supplémenté de 5% de lysat plaquettaire humain et 1 UI/ml d'héparine durant deux semaines.

Le premier passage cellulaire (cellules détachées grâce à la trypsine) a été effectué dans l' $\alpha$ -MEM supplémenté de 8% de lysat plaquettaire humain ainsi que d'1 UI/ml d'héparine.

Sept jours plus tard, les cellules ont été détachées et lavées, puis mélangées dans du sérum physiologique supplémenté de 4-5% d'albumine sérique humaine. La concentration des cellules était de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Des seringues de 5ml ont été remplies du mélange cellules/sérum physiologique/albumine, puis transportées au sein de la clinique (figure 55a).

Une heure avant l'opération, 1g d'amoxicilline (ou 300mg de clindamycine en cas d'allergie) a été administré oralement au patient.

Sous anesthésie locale, après réalisation d'un lambeau, la corticale a été perforée à l'aide d'une petite fraise ronde (afin d'augmenter le flux sanguin et ainsi aider l'infiltration vasculaire des biomatériaux).

Afin d'obtenir des parois permettant une croissance osseuse horizontale et verticale, une membrane non résorbable de polytétrafluoroéthylène (PTFE) renforcée de titane

a été partiellement fixée au tissu osseux sous-jacent à l'aide de micro et mini-vis afin de créer une sorte de tente recouvrant ultérieurement le mélange cellules/support (figure 56b).

Le biomatériau de support, 5cm<sup>3</sup> de phosphate de calcium biphasique (BCP) sous forme de granules de 0,5-1mm, était composé de 20% d'hydroxyapatite (HA) et de 80% de phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) (figure 55b).

Cent millions de cellules ont été mélangées aux granules de BCP durant une heure (figure 55B).

Au moment de l'introduction du mélange, celui-ci comptait 20 x 10<sup>6</sup> cellules/cm<sup>3</sup> (figure 55B). Une partie du mélange a été mise de côté afin de réaliser des analyses biologiques et d'étudier l'adhérence des cellules au BCP.

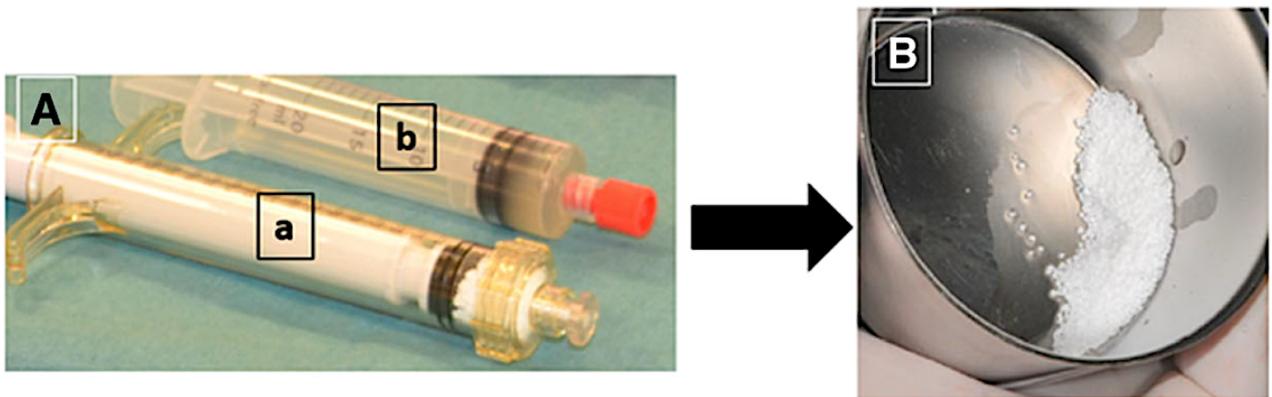


Figure 55 : en A: seringues contenant les granules de BCP (a) et les cellules souches (b) ; en B: le mélange de BCP+cellules (d'après Gjerde et coll., 2018)

La membrane mise en place préalablement a recouvert le mélange et le lambeau a été remis en place par des sutures non-résorbables (figure 56c).

Les recommandations post-opératoires (nourriture molle durant 10-14 jours, bain de bouche à la chlorhexidine, traitement antibiotique pendant une semaine, et antalgiques si besoin) ont été données au patient.

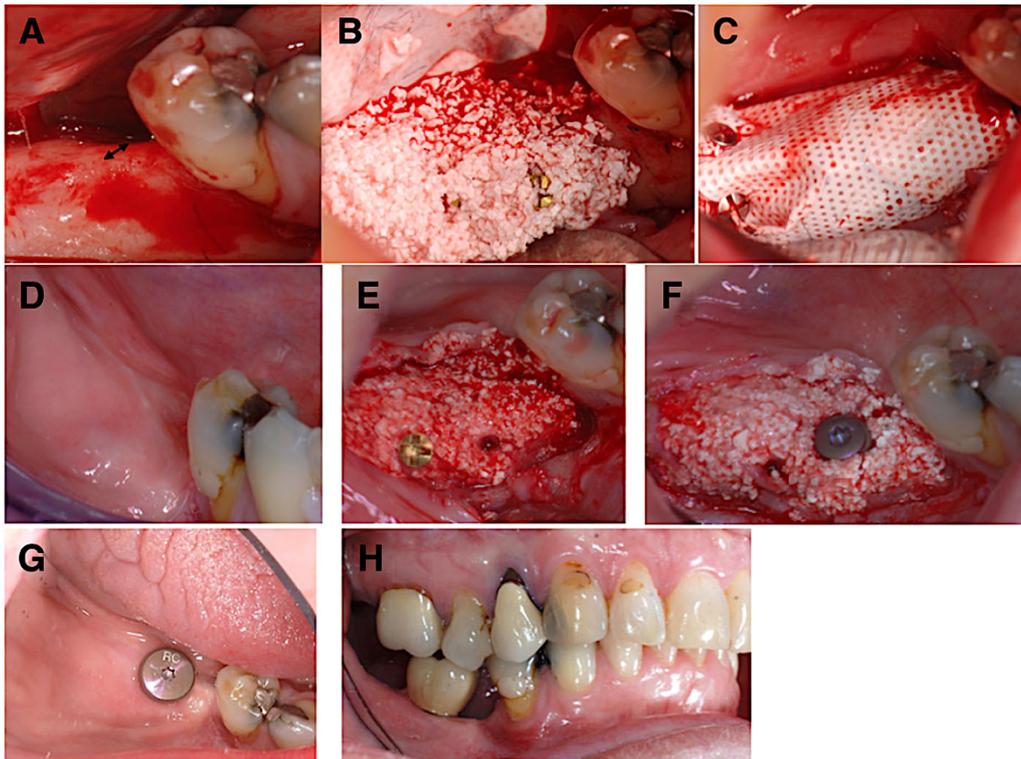


Figure 56 : photographies des étapes cliniques (source : Gjerde et coll., 2018)

Douze jours suivant l'opération a eu lieu le contrôle de cicatrisation, le retrait des fils ainsi qu'une nouvelle tomodynamométrie.

Les contrôles cliniques ont eu lieu à 1,2 et 4 mois post-opératoire.

Deux tomodynamométries supplémentaires à 6 et 18 mois post-opératoires ont été réalisées (figure 57).

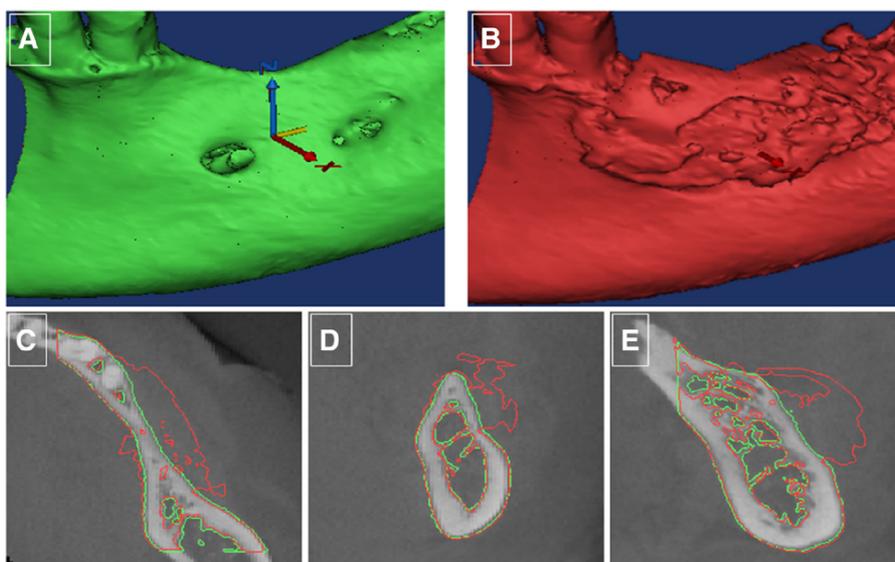


Figure 57 : tomodynamométrie pré-opératoire (en vert) et post-opératoire à 6 mois (en rouge) (source : Gjerde et coll., 2018)

Le volume osseux observé 6 mois après l'opération était satisfaisant et la pose d'implant a pu être envisagée, car la crête alvéolaire possédait les 7mm de hauteur requis (figure 56d).

Avant la pose implantaire, une biopsie a été faite et a permis de confirmer histologiquement et par micro-tomodensitométrie la présence de tissu osseux (figures 56e et 58). Du tissu osseux lamellaire ainsi que des ostéocytes emmurés dans la MEC mais aussi des granules de BCP restantes (marquées par « \* ») et bien intégrées au sein du tissu osseux nouvellement formé ont été observés. Les granules ont été progressivement dégradés par des macrophages mais probablement aussi par des ostéoclastes.

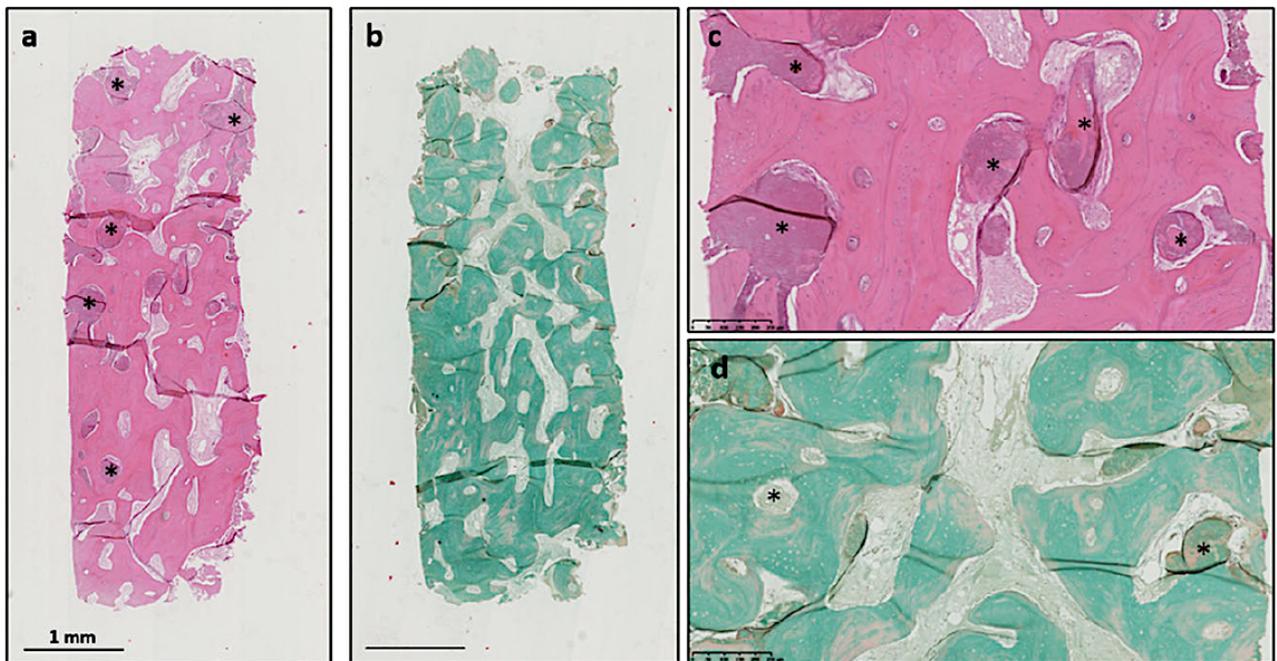


Figure 58 : coupes histologiques du tissu osseux prélevé lors de la biopsie ; en a et c : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) ; en b et d : coloration au trichrome de Masson (source : Gjerde et coll., 2018)

La pose implantaire a été un succès (figures 56f et 56g), ainsi que la prothèse implanto-portée (figure 56h). On constate une nette augmentation du volume crestal (figure 59).

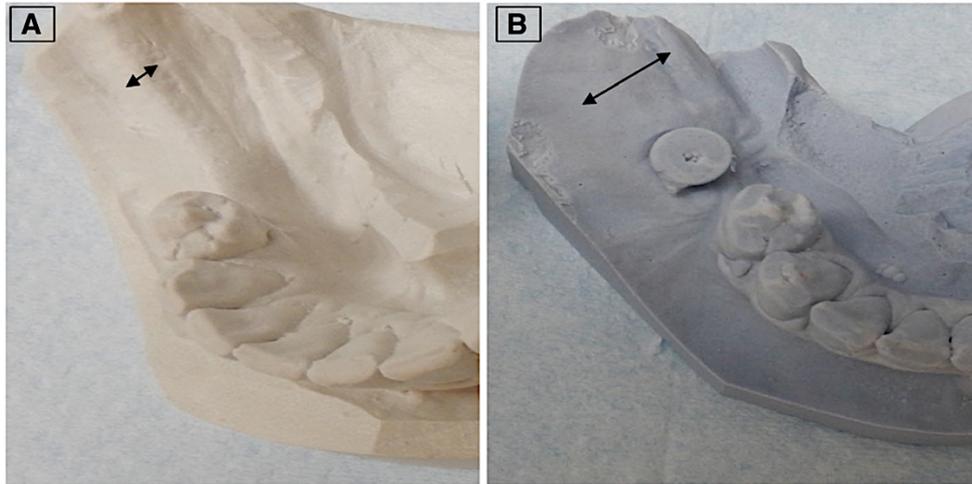


Figure 59 : situations pré-opératoire (A) et suite à la pose de l'implant (B) (source : Gjerde et coll., 2018)

Le plan ci-dessous récapitule les actes effectués tout au long de l'étude (tableau 7).

Tableau 7 : plan de l'étude (source : Gjerde et coll., 2018)

Intervention	Day -21 (pre inclusion visit or earlier)	Day 0 (inclusion visit)	Days 12-14	Month 1	Month 6	Month 9	Month 18
Verification of the selection criteria, information given to the patient, patient records and informed consent obtained	X						
Panoramic X-ray scans	X				X	X	X
Loco-regional clinical examination	X	X	X	X	X	X	X
Impression of both dental arches	X					X	
Facial and oral cavity photographs	X						X
Dental radiographs	X				X	X	X
VAS score for pain			X	X	X	X	X
Questionnaire on use of painkillers			X	X	X	X	X
Bone marrow harvest	X						
Grafting procedure		X					
CBCT scan	X		X		X		X
Implant placement, bone biopsy					X		
Resonance frequency Analysis (ISQ RFA)					X	X	X
Implant loading (prosthesis)						X	
Adverse events, clinical examination		X	X	X	X	X	X

VAS visual analog scale, CBCT cone beam computer tomography, ISQ implant stability quotient, RFA resonance frequency analysis

Hormis les deux patients qui n'ont pas pu bénéficier du traitement, chez tous les autres aucune infection n'a été observée, la cicatrisation n'a nullement été entravée et la zone a nettement augmenté en terme de volume. La présence de gencive kératinisée recouvrant la zone augmentée attestait d'une bonne cicatrisation des tissus mous.

Aucune complication post-opératoire n'a eu lieu et aucun patient n'a relaté de douleurs excessives (excepté un patient qui a relaté des douleurs moyennes suite à l'opération ainsi qu'après le retrait de la membrane).

Les poses d'implant et de la prothèse ont été un succès pour tous les patients, y compris ceux ayant bénéficié du traitement à deux endroits distincts (tableau 8). Pour 5 patients, la membrane a été retirée après 7-8 semaines suite à l'opération (date de retrait de la membrane non renseignée pour les 6 autres patients).

Tableau 8 : données cliniques démontrant l'augmentation du volume osseux (source : Gjerde et coll., 2018)

Patient number	Age (years)	Sex	Healing time (weeks)	Increase in width (mm)	Increase in volume (mm <sup>3</sup> )	Implant placement	Crown delivered	Patient satisfied
1	75	F	27	4.5	902.92	Yes	Yes	Yes
2	67	M	25	3.7	1047.15	Yes	Yes	Yes
3	55	F	26	3.9	1382.54	Yes	Yes	Yes
4	62	F	18	1.1	440.93	Yes	Yes	Yes
6	52	M	21	4.9	1469.53	Yes	Yes	Yes
7 left	69	M	31	4.6	432.7	Yes	Yes	Yes
7 right	69	M	31	4.9	1187.21	Yes	Yes	Yes
8	69	M	22	1.4	753.52	Yes	Yes	Yes
9	61	F	22	1.4	546.33	Yes	Yes	Yes
11	62	F	21	9.7	1188.47	Yes	Yes	Yes
12 left	65	F	20	2.7	954.98	Yes	Yes	Yes
12 right	65	F	20	3.4	418.36	Yes	Yes	Yes
13 left	69	F	22	3.7	553.56	Yes	Yes	Yes
13 right	69	F	22	6.8	1142.96	Yes	Yes	Yes

All patients received implants and prostheses  
F female, M male

Le volume osseux moyen a augmenté de  $0,887 \pm 0,365 \text{ cm}^3$ , tandis que la largeur a augmentée en moyenne de 4,05mm.

Cette étude a permis de démontrer la capacité de l'association BMSCs/BCP à induire la régénération osseuse et d'augmenter le tissu osseux aussi bien horizontalement que verticalement. Le matériau de support seul n'aurait pas induit les mêmes résultats.

À noter également, que dans cette étude, les CSM n'ont pas subi de prétraitement *in vitro* les différenciant en cellules ostéoblastiques. Or il n'est pas exclu que les cellules aient subi cette différenciation durant les phases d'isolement et/ou de prolifération.

L'étude a certes montré une certaine reproductibilité des résultats, cependant des études incluant un nombre de patients plus élevé suivis sur une plus longue durée sont nécessaires afin de valider les résultats obtenus dans cette étude. Néanmoins, ces résultats sont prometteurs en terme de régénération osseuse induite par cellules souches mésenchymateuses.

### 3.4.3 Tableau récapitulatif

Le tableau ci-dessous résume les différentes techniques employées afin d'obtenir du tissu osseux, ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients (tableau 9).

Tableau 9 : résumé des différentes techniques de production de PIT

In vitro		In vivo			
➤ Étude de Akkouch, 2012		➤ Étude de Kang et coll., 2016	➤ Étude de Colangeli et coll., 2017	➤ Étude de Son et coll., 2018	➤ Étude de Gjerde et coll., 2018
CSM utilisées	DPSCs	hASCs	BMSCs (40 mL de MO)	BMSCs (3 mL de MO)	BMSCs (15-20 mL de MO)
<b>Milieu de culture (MC)</b>	$\alpha$ -MEM + SFB + $\beta$ -glycérophosphate + acide ascorbique + dexaméthasone	PCL/TCP	Non renseigné	MC type DMEM + 10% SFB + 1% ATB + 350 U/mL d'héparine →centrifugation → 5 jours à 37°C dans 10 mL de MC à 5% CO <sub>2</sub> et 100% d'humidité	$\alpha$ -MEM + 5% lysat plaquettaire + 1 UI/mL d'héparine pendant 2 semaines → $\alpha$ -MEM + 8% lysat plaquettaire + 1 UI/mL d'héparine

					pendant 1 semaine
<b>Nombre de passages cellulaires</b>	Non renseigné	Aucun	Non renseigné	2	1
<b>Scaffold</b>	Coll/HA/PLCL	Hydrogel contenant du Pluronic F-127	Gluconate de calcium en gel	Colle de fibrine	BCP en granules (20% HA + 80% $\beta$ -TCP)
<b>Procédure d'implantation <i>in vivo</i></b>	Aucune	Aucune	Implantation du mélange de BMSCs et du support	Implantation des ostéoblastes adjoints au support	Implantation du mélange cellules/sérum physiologique/albumine + support
<b>Durée de l'étude</b>	21 jours	28 jours	6 mois	2 ans	18 mois

<p><b>Avantages</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Technique peu invasive</li> <li>• Tous les paramètres sont mesurables (morphologie et taux de croissance des ostéoblastes, adhésion au support, taux de phosphatase alcaline et de minéralisation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organoïde osseux « sur mesure »</li> <li>• Pas de passage cellulaire</li> <li>• Milieu de culture et scaffold sont réunis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opération peu invasive pour le patient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gros volume osseux régénéré</li> <li>• Patient très jeune</li> <li>• Absence de récession tumorale à ce jour</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tissu osseux régénéré viable car tous les patients ont supporté la prothèse implanto-portée posée</li> <li>• Bonne reproductibilité des résultats</li> <li>• Taux de régénération osseuse élevé</li> </ul>
<p><b>Inconvénients</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taux de réussite opérateur-dépendant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de cas d'implantation <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne semble pas convenir pour les défauts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Étude menée sur 1 seul patient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible cohorte (11) pour valider cette technique</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de cas d'implantation <i>in vivo</i></li> </ul>		<p>osseux volumineux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible cohorte (5) → divergence des taux de densité osseuse élevé</li> <li>• Volume d'aspirat de moelle osseuse élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opérations lourdes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recul clinique insuffisant</li> </ul>
--	--	--	--	--	--

### 3.5 Implantation et discussion

#### 3.5.1 Dans quels cas l'implantation de PIT est-elle possible ?

Afin d'assurer la bonne intégration d'un organoïde osseux ou d'un mélange cellules/biomatériau de support mais d'également de faciliter la régénération osseuse et la cicatrisation, certains critères issus de protocoles expérimentaux ont été relevés :

- Défaut de tissu osseux quelle que soit la taille
- Absence de signes d'infection locaux ou à distance
- Absence d'affection orale majeure (pour la régénération d'os de la sphère orale)
- Bonne santé générale du patient
- Être non-fumeur
- Ne pas être enceinte ni allaiter
- Ne pas avoir d'antécédents de pathologies malignes ni de radiothérapie de la zone intéressée
- Ne pas être sous traitements chroniques incluant les immunomodulateurs, les anti-résorbeurs osseux ou encore les stéroïdes.

#### 3.5.2 Protocole d'implantation

Du fait de la diversité des matériaux mais aussi des cellules utilisées, chaque protocole d'implantation est différent. Cependant on peut affirmer que des études cliniques ainsi que radiologiques pré et post-opératoires sont indispensables.

Il en est de même pour l'information du patient pré, (per si l'anesthésie est locale) et post-opératoire (certaines études indiquent qu'un consentement clair et concis a été exposé et approuvé par le patient avant toute opération).

Même si toutes les études ne le précisent pas, une antibioprophylaxie ainsi qu'une antibiothérapie de couverture sont recommandées.

### 3.5.3 Taux de réussite et suivi

Toutes les études d'implantation *in vivo* de la littérature que nous avons analysées décrivent un haut taux de réussite, c'est-à-dire une régénération évidente du tissu osseux allant de pair avec l'augmentation du volume osseux et cela sans aucune complication locale. Ces résultats s'accompagnent d'une bonne cicatrisation des tissus mous environnants.

Cependant la durée de ces études est insuffisante pour exclure le risque de complications à moyen ou long terme. En effet, ce genre d'opérations nécessitent un suivi clinique et radiologique continu sur une longue période afin de pouvoir juger de l'efficacité et de la réussite du traitement à long terme. Généralement les consultations post-opératoires se font autour de 10-12 jours puis 1, 2, 4, 6, 12 et 18 mois et 24 mois. Ici encore, les dates de contrôles dépendent des types de traitement mais également des opérateurs.

### 3.5.4 Discussion

L'utilisation de cellules souches n'est certainement pas sans risque. Leur innocuité est-elle vraiment assurée ?

L'agence de la biomédecine met en garde quant à la formation de tératomes suite à l'utilisation de cellules moins différenciées (Agence de la Biomédecine, 2016).

Rappelons qu'un tératome est « *une tumeur bénigne ou maligne qui se développe aux dépens de cellules embryonnaires restées présentes dans l'organisme, et capable de donner naissance à différents types de tissus* » (Larousse Médical).

L'instabilité du génome cellulaire représente un frein capital à l'évolution des thérapies basées sur les cellules souches. Une étude affirme que la mesure de la longueur du télomère ainsi que la détermination de l'âge cellulaire se doivent d'être un standard avant toute application thérapeutique. En effet, une culture cellulaire prolongée peut aboutir à une diminution graduelle de cette longueur télomérique au risque d'induire un déséquilibre du génome (Mokry et coll., 2010). Une étude menée

sur des DPSCs affirme qu'*in vitro*, cette instabilité chromosomique induit une augmentation de la prolifération des DPSCs en inhibant leur différenciation (Boyle et coll., 2014). Les temps de culture jouent donc un rôle important dans l'apparition de tératomes.

La plupart des études impliquant des cellules souches à des fins de régénération osseuse concluent à dire que les résultats sont à suivre sur le long terme et que le risque de formation de tumeurs n'est pas inexistant. Cependant, le risque semble plus élevé lors de l'utilisation de cellules iPS (Zakrzewski et coll., 2019).

En effet, les tératomes se forment aux dépens de cellules embryonnaires, c'est-à-dire de cellules pluripotentes. Or, les cellules iPS ne sont autres que des cellules différenciées reprogrammées en cellules pluripotentes. Toute utilisation de cellules pluripotentes majore donc le risque carcinologique si celles-ci ne sont pas toutes différenciées avant application *in vivo*.

De plus il est à souligner que les cellules iPS sont génétiquement plus « instables » que des cellules n'ayant subi aucune manipulation génomique. Les cellules iPS sont donc plus enclin à la formation de tératomes que les cellules souches mésenchymateuses.

En plus du risque plus accru de développement de cancer, les cellules iPS allongent la durée de la thérapie cellulaire de par les nombreuses manipulations qui s'imposent. Cette source de cellules est donc encore trop peu fiables à des fins d'application cliniques humaines.

Outre les problèmes liés à la complexité de la culture cellulaire, les sources de cellules souches constituent également un obstacle au développement de la thérapie cellulaire.

Les cellules souches autologues, contrairement aux cellules allogéniques, n'induisent aucune réaction immunitaire (sauf si les phénotypes HLA du donneur et du receveur sont identiques) et ne posent aucun problème d'ordre éthique (Inserm, 2015). Cependant, leur réserve est limitée et nécessite en plus un second site opératoire (techniques plus ou moins invasives) chez le patient. *A contrario*, les CS allogéniques peuvent être gardées dans des biobanques, assurant ainsi une disponibilité constante (donc aucun problème d'approvisionnement).

Trois types de cellules sont utilisés en médecine régénératrice du tissu osseux : les cellules souches embryonnaires, les cellules iPS ainsi que les cellules souches mésenchymateuses (Inserm, 2015).

- L'utilisation de cellules souches embryonnaires pose un problème d'ordre éthique. En France, la loi de bioéthique du 7 juillet 2011 permet la recherche sur l'embryon sous certaines conditions. Les scientifiques accrédités sont en mesure de pouvoir mener des recherches à partir d'embryons surnuméraires engendrés dans le cadre d'une fécondation *in vitro*. Les parents peuvent, s'ils le désirent, céder ces embryons surnuméraires à la recherche (Agence de la Biomédecine, 2020). Cette loi a été modifiée par la loi du 6 août 2013, qui encourage à favoriser les recherches alternatives à celles sur l'embryon humain ainsi que celles conformes à l'éthique et qui intensifie l'interdiction de la création d'embryons transgéniques ou chimériques (formés de minimum deux types de cellules génétiquement différentes). Afin de pouvoir mener une étude sur l'embryon, la décision légitimée prise par l'Agence de la Biomédecine jointe à l'approbation du conseil d'orientation doivent être transmises aux ministres chargés de la Santé et de la Recherche (Agence de la Biomédecine, 2020). Plus récemment, le projet de la loi santé voté en 2015 permet le transfert des embryons ayant servi à la recherche dans l'utérus lors d'une PMA (Inserm, 2018).
  
- Nous avons vu que les CSM utilisables en thérapie cellulaire peuvent provenir soit de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du cordon ombilical ou encore de l'organe dentaire. Les cellules de la moelle osseuses nécessitent une hospitalisation pour un prélèvement qui s'avère invasif pour le patient (que la source soit allogénique ou autologue). Les ACS quant à eux, requièrent un prélèvement par lipoaspiration, technique qui peut les fragiliser au risque de les abîmer (Wagner, 2005). Le domaine d'utilisation des cellules du sang du cordon ombilical étant restreint, peu de cellules sont disponibles. En France, le sang placentaire ne peut être utilisé que de façon allogénique, anonyme et gratuite (Inserm, 2015).

Les cellules souches dentaires ne sont pas une source constante. En effet, leur disponibilité dépend du nombre de dents de sagesse avulsées. De plus elles impliquent une conservation cryogénique.

La thérapie cellulaire implique également un certain coût. Une analyse rapporte un prix pouvant aller de 10.000 à 20.000€ pour un médicament de thérapie cellulaire, c'est-à-dire lorsque le produit cellulaire s'adresse à la fabrication industrielle (Inserm, 2015 ; Cuisinier, 2016 ).

Une autre étude parle de 98.000 à 150.000€ pour une allogreffe de cellules souches hématopoïétique (Debals-Gonthier, 2018).

En dépit des résultats encourageants des études énoncées précédemment, les mécanismes de fonctionnement des CSM ne sont pas encore tous élucidés.

Et bien que les meilleurs milieux de culture des CSM et de différenciation ostéoblastique semblent être connus, les supports ainsi que les procédés d'implantation *in vivo* divergent trop pour établir à ce jour un protocole fiable et reconnu. La base de données cliniques attestant de la fiabilité de la thérapie sur le long terme est donc insuffisante. Les mécanismes biologiques associés à la transplantation *in vivo* des cellules souches nécessitent d'avantage d'éclaircissement. De plus il y a un manque d'études qui comparent l'efficacité des techniques de transplantation de CSM aux autres techniques n'impliquant pas ce type de cellules (Si et coll., 2010).

L'utilisation des CSM en tant qu'acteur de la régénération osseuse est certes confirmée, mais nécessite davantage d'études sur le long terme. Cela implique non seulement des moyens financiers importants mais également des intérêts scientifiques et médicaux justifiés.

## 4. Conclusions

Les cellules souches mésenchymateuses suscitent de plus en plus l'intérêt de la communauté scientifique lorsqu'il s'agit de régénération osseuse.

En effet, grâce à leurs caractéristiques telles que la multipotence, l'auto-renouvellement et la différenciation en lignée ostéoblastique elles sont capables d'induire une régénération osseuse efficace dans un environnement spécifique.

Cet environnement se doit de posséder une structure ressemblant le plus possible à celle du tissu osseux. De nombreux biomatériaux de support ont été mis au point afin d'induire au mieux une différenciation ostéoblastique des cellules souches afin qu'elles synthétisent une matrice osseuse minéralisée. Or à ce jour, il n'existe pas de gold standard du biomatériau idéal.

L'impression 3D apporte sa contribution dans ce domaine, car elle permet la production de matériaux de support de façon standardisée et reproductible.

Les cellules souches mésenchymateuses étudiées les plus prometteuses, se sont révélées être les cellules souches de la moelle osseuse, du tissu adipeux, mais également les cellules de la sphère orale comme celles de la pulpe dentaire et des dents lactéales.

Cependant, les BMSCs ainsi que les ACSs ayant fait leurs preuves lors d'expériences *in vitro* et *in vivo*, les traitements sur l'Homme impliquant les cellules souches de la sphère orale manquent quelque peu. Les études menées sur ces dernières sont probablement trop peu nombreuses pour permettre un protocole de régénération osseuse les impliquant. Les accusations peuvent se porter entre autre sur la législation mais également sur les coûts de fabrication.

Toutefois, l'avenir verra possiblement émerger des solutions de régénération osseuse associant les cellules souches orales et l'impression 3D. En avulsant les dents sources, le chirurgien-dentiste serait donc acteur actif de cette thérapie innovante, ce qui apporterait une réelle nouveauté à notre métier.

## 5. Références bibliographiques

1. Akkouch A. Conception et validation d'un biomatériau hybride pour la régénération osseuse. [thèse de doctorat]. [Quebec] : Université Laval. Faculté de médecine ; 2012. 255p.
2. Alsulaimani R, Ajlan S, Aldahmash A, Alnabaheen M, Ashri N. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. *Saudi Med J.* 2016 ; 37(5) : 551-560.
3. Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *J Clin Exp Dent.* 2019 ; 11(4) : 373-381.
4. Andreotti Lambersend C. Étiopathogénie des ostéites maxillaires d'origine odontologique. [Thèse d'exercice]. [Nancy] : Université de Nancy. Faculté de chirurgie dentaire ; 2005. 121p.
5. Aumailley S. Régénération dentaire complète par ingénierie tissulaire: revue systématique de la littérature. [Thèse d'exercice]. [Bordeaux] : Université de Bordeaux. Faculté d'odontologie ; 2019. 103p.
6. Boyer A. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo-silicatées. [thèse de doctorat]. [Saint-Étienne] : École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne. Génie des procédés ; 2014. 224p.
7. Boyle M, Chun C, Strojny C, Narayanan R, Bartholomew A, Sundivakkam P, et coll. Chronic Inflammation and Angiogenic Signaling Axis Impairs Differentiation of Dental-Pulp Stem Cells. *PLoS ONE.* 2014 ; 9(11) : 113419-113436.
8. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 ; 9(5) : 641-650.
9. Charbord P, Casteilla L. La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *Med Sci (Paris).* 2011 ; 27(3) : 261-267.

10. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008 ; 40(5) : 815-820.
11. Cohen G. Les cellules souches pour induire la régénération osseuse. [Thèse d'exercice]. [Marseille] : Université d'Aix-Marseille. Faculté d'Odontologie de Marseille ; 2019. 90p.
12. Colangeli W, Riccelli U, Giudice A, Barca I, Caruso D, Novembre D, et coll. Jaw bones regeeneration using mesenchymal stem cells. *Ann Ital Chir.* 2017 ; 89(1) : 20-23.
13. Cristaldi M, Mauceri R, Tomasello L, Pizzo G, Pizzolanti G, Giordano C, et coll. Dental pulp stem cells for bone tissue engineering : a review of the current literature and a look to the future. *Regen Med.* 2018 ; 13(2) : 207-218.
14. Csobonyeiova M, Polak S, Zamborsky R, Danisovic L. iPS cell technologies and their prospect for bone regeneration and disease modeling: A mini review. *J Adv Res.* 2017 ; 8(4) : 321-327.
15. Cuisinier R. L'utilisation des cellules souches dentaires : une avancée médicale à fort potentiel ? [Thèse d'exercice]. [Strasbourg] : Université de Strasbourg. Faculté de chirurgie dentaire ; 2016. 87p.
16. Dave JR, Tomar GB. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Crit Rev Biomed Eng.* 2018 ; 46(5) : 429-468.
17. Debals-Gonthier M, Siani C, Faucher C, Touzani R, Lemarié-Basset C, Chabannon C, et coll. Analyse coût-efficacité de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques de donneur apparenté haploidentique chez les patients de plus de 55 ans. *Rev épidémiol santé publique.* 2018 ; 66(3) : 139.
18. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et coll. McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten F. Mesenchymal multipotency

of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006 ; 54(4) : 1209-1221.

19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et coll. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006 ; 8(4) : 315-317.
20. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 ; 56(3) : 151-165.
21. Galler KM, D'Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med.* 2011 ; 6(1) : 111-124.
22. Ghaderi H, Razmkhah M, Kiany F, Chenari N, Haghshenas MR. Comparison of Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Ability of Buccal Fat Pad Derived Mesenchymal Stem Cells and Gingival Derived Cells. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* 2018; 19(2) : 124-131.
23. Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, Rojewski M, Gjengedal H, Yassin MA, et coll. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2018 ; 9(1) : 213.
24. Gutiérrez-Prieto SJ, Perdomo-Lara SJ, Diaz-Peraza JM, Sequeda-Castañeda LG. Analysis of *In Vitro* Osteoblast Culture on Scaffolds for Future Bone Regeneration Purposes in Dentistry. *Adv Pharmacol Sci.* 2019 ; 2019 : 5420752.
25. Haj J, Haj Khalil T, Falah M, Zussman E, Srouji S. An ECM-Mimicking, Mesenchymal Stem Cell-Embedded Hybrid Scaffold for Bone Regeneration. *BioMed Res Int.* 2017 ; 2017 : 8591073.
26. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials.* 2018 ; 180 : 143-62.

27. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 ; 111(6) : 700-708.
28. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res.* 2009 ; 88(9) : 792-806.
29. Jin SH, Lee JE, Yun JH, Kim I, Ko Y, Park JB. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *J Periodont Res.* 2014 ; 50(4) : 461-467.
30. Jordana F, Le Visage C, Weiss P. Substituts osseux. *Med Sci (Paris).* 2017 ; 33(1) : 60-65.
31. Ju C, Liu R, Zhang YW, Zhang Y, Zhou R, Sun J, et coll. Mesenchymal stem cell-associated lncRNA in osteogenic differentiation. *Biomed Pharmacother.* 2019 ; 115 : 108912.
32. Jukes JM, Van Blitterswijk CA, De Boer J. Skeletal tissue engineering using embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010 ; 4(3) : 165-180.
33. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016 ; 34(3) : 312-319.
34. Karantalis V, Schulman IH, Balkan W, Hare JM. Allogeneic Cell Therapy: A New Paradigm in Therapeutics. *Circ Res.* 2015 ; 116(1) : 12-15.
35. Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019 ; 25(1) : 78-88.
36. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells : regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007 ; 9(1) : 204.

37. Lamy B. Biomécanique - Biomatériaux - Structure, comportement mécanique et endommagement des tissus vivants. Matériaux de substitution. Paris : Ellipses ; 2018. Chapitre 1, Les os ; p. 9-16.
38. Le Doan V, Marcil V. Ostéocalcine et métabolisme du glucose : Les leçons des études chez l'homme. Med Sci (Paris). 2017 ; 33(4) : 417-422.
39. Li J, Xu SQ, Zhao YM, Yu S, Ge LH, Xu BH. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. Mol Med Rep. 2018 ; 18(6) : 4969-4977.
40. Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. Med Sci (Paris). 2001 ; 17(12) : 1252-1259.
41. Marieb EN, Hoehn K. Anatomie et physiologie humaines. Montréal : Pearson Education ; 2019. Chapitre 6, Les os et le tissu osseux ; p 199-227.
42. Miles KB, Maerz T, Matthew HWT. Scalable MSC-derived bone tissue modules : *In vitro* assessment of differentiation, matrix deposition, and compressive load bearing. Acta Biomater. 2019 ; 95 : 395-407.
43. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et coll. SHED : Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci. 2003 ; 100(10) : 5807-5812.
44. Mokry J, Soukup T, Micuda S, Karbanova J, Visek B, Brcakova, et coll. Telomere Attrition Occurs during Ex Vivo Expansion of Human Dental Pulp Stem Cells. J Biomed Biotechnol. 2010 ; 2010 : 673513.
45. Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, et coll. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2018 ; 497(3) : 876-882.

46. Nyberg EL, Farris AL, Hung BP, Dias M, Garcia JR, Dorafshar AH, et coll. 3D-Printing Technologies for Craniofacial Rehabilitation, Reconstruction, and Regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2017 ; 45(1) : 45-57.
47. Pastoureau P. Physiologie du développement du tissu osseux. *INRA Prod Anim.* 1990 ; 3(4) : 265-273.
48. Patel H, Bonde M, Srinivasan G. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends Biomater Artif Organs.* 2011 ; 25(1) : 20-29.
49. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circ Res.* 2004 ; 95(1) : 9-20.
50. Reppel L. L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire : nouvelle approche thérapeutique ? Application à l'ingénierie du cartilage [Thèse d'exercice]. [Nancy] : Université Henri Poincaré – Nancy 1. Faculté de Pharmacie ; 2011. 181p.
51. Roubeix C. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome. [Thèse de Doctorat]. [Paris] : Université Pierre et Marie Curie. Physiologie ; 2014. 146p.
52. Sansac C, Assou S, Bouckenheimer J, Lemaître JM, De Vos J. Les cellules souches pluripotentes induites : un nouveau paradigme pour l'étude des tissus humains. *Biol Aujourd'hui.* 2016 ; 210(1) : 1-8.
53. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, et coll. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008 ; 14(5) : 428-434.
54. Shanbhag S, Suliman S, Pandis N, Stavropoulos A, Sanz M, Mustafa K. Cell therapy for orofacial bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2019 ; 46(Suppl. 21) : 162-182.
55. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD. MSCs : Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.* 2010 ; 10(1) : 93-103.

56. Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, et coll. Adipose-derived stem cells : Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother.* 2019 ; 114 : 108765.
57. Son JW, Kim BC, Yoon JH, Lee J, Lim HJ. Mandibular Regeneration With Autologous Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to Treat Unicystic Ameloblastoma: A Clinical Report. *J Craniofac Surg.* 2018 ; 30(3) : 187-189.
58. Stanko P, Kaiserova K, Altanero V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014 ; 158(3) : 373-377.
59. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006 ; 126(4) : 663-676.
60. Thomas T, Martin A, Lafage-Proust M-H. Physiologie du tissu osseux. Dans : *EMC - Appareil locomoteur.* 2008 ; 3(1) : 1-16. [Article 14-002-B-10]
61. Thirvikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin N Am.* 2017 ; 61(4) : 835-856.
62. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et coll. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 ; 393(3) : 377-383.
63. Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement osseux. *Ann Med Vet.* 2004 ; 148 : 1-13.
64. Tortora GJ, Derrickson B. Principes d'anatomie et de physiologie. Bruxelles : De Boeck & Larcier S.A. ; 2007. Chapitre 6, Système squelettique : le tissu osseux et les os ; p. 183-207.

65. Usunier B. Étude de l'effet de l'injection de Cellules Strtomaes Mésenchymateuses sur un modèle de fibrose colorectale radio-induite chez le rat. [Thèse de Doctorat]. [Paris] : Université Pierre et Marie Curie. Physiologie, physiopathologie et thérapeutique ; 2016. 444p.
66. Vinatier C, Bordenave L, Guicheux J, Amédée J. Les cellules souches en ingénierie des tissus ostéoarticulaires et vasculaires. *Med Sci (Paris)*. 2011 ; 27(3) : 289-296.
67. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Eastbourne : Elsevier Inc ; 2015. Chapitre 1, An Introduction to Stem Cell biology and Tissue Engineering ; p. 1-11.
68. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U et coll. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 ; 33(1) : 1402-1416.
69. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et coll. Characterization of Stem Cells from Alveolar Periodontal Ligament. *Tissue Eng Part A*. 2011 ; 17(7-8) : 1015-1026.
70. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et coll. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012 ; 57(9) : 1231-1240.
71. Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue Engineering for Bone Regeneration Using Differentiated Alveolar Bone Cells in Collagen Scaffolds. *Tissue Eng*. 2003 ; 9(6) : 1167-1177.
72. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells : past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019 ; 10(1) : 68.
73. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2018 ; 84 : 16-33.

74. Zipori D. À la recherche d'une définition moléculaire plus que descriptive pour les cellules souches. *Med Sci (Paris)*. 2011 ; 27(3) : 303-307.

## 6. Références bibliographiques électroniques

1. Agence de la Biomédecine. Avis du Conseil d'orientation : Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) : état des lieux, perspectives et enjeux éthiques. [Internet]. 2016 [consulté le 5 janvier 2021]. Disponible sur : [https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/delib.2016-co-04\\_annexe\\_avis\\_co\\_ips.pdf](https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/delib.2016-co-04_annexe_avis_co_ips.pdf)
2. Agence de la Biomédecine. La recherche sur l'embryon [Internet]. 2020 [consulté le 20 janvier 2021]. Disponible sur : <https://www.agence-biomedecine.fr/La-recherche-sur-l-embryon>
3. André JM, Catala M, Morère JJ, Escudier E, Katsanis G, Poirier J. Histologie : les tissus. tissus [cours]. [Paris] : Université Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine. 2008 [consulté le 2 avril 2020 ]. Disponible sur : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/histoP1.pdf>
4. Colat-Parros J, Jordana F. Les substituts osseux. Société francophone de Biomatériaux Dentaires [Internet]. 2009 [consulté le 16 novembre 2020]. Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr/odontologie/enseignement/chap223/site/html/cours.pdf>
5. David B. Cellules souches: ontogénie, caractéristiques, intérêt thérapeutique en pathologie tissulaire [Internet]. 2015 [consulté le 18 mars 2020]. Disponible sur : <https://hal-pasteur.archives-ouvertes.fr/pasteur-01348136/document>
6. Encyclopédie Larousse en ligne. Dysembryome ou tératome [Internet]. [consulté le 7 janvier 2021]. Disponible sur : <https://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/dysembryome/12624>
7. Haute Autorité de Santé. Rapport d'évaluation-Révision de catégories homogènes de dispositifs médicaux : Substituts osseux [Internet]. 2013 [consulté le 18 août 2020]. Disponible sur :

[https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-06/rapport\\_devaluation\\_des\\_substituts\\_osseux.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-06/rapport_devaluation_des_substituts_osseux.pdf)

8. Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale). Thérapie cellulaire-Greffer des cellules souches pour soigner durablement [Internet]. 2013 [consulté le 20 janvier 2021]. Disponible sur : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-cellulaire>
9. McLeer A. Le tissu osseux [cours]. [Grenoble] : Université Joseph Fourier. Faculté de médecine ; 2019 [consulté le 27 avril 2020]. Disponible sur : [http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/cms/docs/2019/stagepaces/mcleer\\_anne\\_p05/mcleer\\_anne\\_p05.pdf](http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/cms/docs/2019/stagepaces/mcleer_anne_p05/mcleer_anne_p05.pdf)
10. Nataf S. Enseignement d’Histologie Humaine. Le Tissu Osseux Osseux [cours]. [Lyon] : Université de Lyon. Faculté de médecine ; 2009 [consulté le 27 mars 2020]. Disponible sur : <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux--2009->

## Table des matières

Liste des figures.....	10
Liste des tableaux .....	14
<b>1. Introduction : Qu'est-ce que l'ingénierie tissulaire ?.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Données générales sur les substituts osseux actuels.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Définition d'un substitut osseux .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Cahier des charges.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Les différents types de substituts osseux.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 D'origine humaine .....	19
2.3.2 Les xéno greffes d'origine animale.....	20
2.3.3 Les xéno greffes d'origine végétal.....	21
2.3.4 D'origine synthétique.....	21
2.3.5 Les matériaux composites.....	22
<b>2.4 Les limites .....</b>	<b>23</b>
<b>3. L'intérêt des cellules souches dans la régénération osseuse.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Données générales sur les cellules souches mésenchymateuses.....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Définition .....	26
3.1.2 Caractéristiques .....	26
3.1.3 Intérêt des CSM .....	29
<b>3.2 La régénération osseuse.....</b>	<b>31</b>

3.2.1	La physiologie du tissu osseux.....	31
a)	Généralités.....	31
b)	Composition .....	31
c)	Classification .....	39
d)	Les enveloppes du tissu osseux / Les tissus conjonctifs associés.....	46
e)	Organisation du tissu osseux des maxillaires.....	47
f)	L’histogenèse du tissu osseux : formation et remodelage.....	49
3.2.2	Les acteurs de la régénération osseuse (tableau 3).....	53
<b>3.3</b>	<b>Protocole de production de substituts osseux à base de cellules souches.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Les cellules souches utilisées .....	60
a)	Les cellules souches allogéniques .....	61
b)	Les cellules souches autologues.....	61
c)	Les sources de cellules souches.....	62
d)	Isolation des DPSCs .....	73
3.3.2	Les matériaux de support pour la croissance tissulaire ou scaffold.....	75
3.3.3	Les différents facteurs bioactifs impliqués.....	80
3.3.4	La période de maturation .....	81
<b>3.4</b>	<b>Les différents PIT (produit d’ingénierie tissulaire) produits .....</b>	<b>82</b>
3.4.1	Production <i>in vitro</i> .....	82
a)	Prélèvement et culture des CSM.....	82
b)	Différenciation ostéoblastique .....	83
c)	Conception d’un organoïde osseux.....	84
d)	Utilisation de l’impression 3D .....	90
3.4.2	Production <i>in vivo</i> .....	92
a)	Cas N°1 (Colangeli et coll., 2017) .....	92
b)	Cas N°2 (Son et coll., 2018).....	94
c)	Cas N°3 (Gjerde et coll., 2018).....	97
3.4.3	Tableau récapitulatif .....	103
<b>3.5</b>	<b>Implantation et discussion.....</b>	<b>108</b>
3.5.1	Dans quels cas l’implantation de PIT est-elle possible ?.....	108

3.5.2	Protocole d'implantation .....	108
3.5.3	Taux de réussite et suivi.....	109
3.5.4	Discussion.....	109
<b>4.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>113</b>
<b>5.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Références bibliographiques électroniques.....</b>	<b>123</b>

Vu la demande du doyen de la faculté d'odontologie de Lorraine sur le rapport du jury :

Président : É. MORTIER – Professeur des universités  
Membre du jury : B. PHULPIN – Maître de conférences des universités (Co-directrice de thèse)  
Membre du jury : M. VINCENT – Maître de conférences des universités  
Membre du jury : S. CLERC – Assistant hospitalier universitaire (Co-directeur de thèse)

le président de l'université de Lorraine autorise

**Madame Camille RODDE**

née à METZ (Moselle) le 10 mars 1994,

à soutenir et imprimer sa thèse en vue d'obtenir le diplôme d'État de docteur en chirurgie dentaire intitulée :

**« L'INGÉNIERIE TISSULAIRE – IMPLICATION DES CELLULES SOUCHES  
DANS LA RÉGÉNÉRATION OSSEUSE »**

Nancy, le 16 février 2021

N° autorisation : M602C

Le président de l'université de Lorraine



## **RODDE Camille – L'ingénierie tissulaire – Implication des cellules souches dans la régénération osseuse**

Nancy 2021 : 134 pages, 59 figures, 9 tableaux

Th. : Chir.-Dent. : Nancy 2021

### **Mots-clefs :**

- Ingénierie tissulaire
- Substituts osseux
- Cellules souches
- Régénération osseuse
- Facteurs de croissance

### **Résumé :**

Les cellules souches suscitent de plus en plus l'intérêt de la communauté scientifique lorsqu'il s'agit de régénération osseuse. En effet, grâce à leurs caractéristiques telles que la multipotence, l'auto-renouvellement et la différenciation en lignée ostéoblastique elles sont capables d'induire une régénération osseuse efficace dans un environnement spécifique.

Ce travail a pour but d'étudier l'implication des cellules souches dans la thérapie cellulaire et dans l'ingénierie tissulaire osseuse afin de synthétiser des produits d'ingénierie tissulaire permettant le comblement de larges défauts osseux.

### **Jury :**

Président :	Pr. Éric MORTIER
Membre :	Dr. Marin VINCENT
Directeur de thèse :	Dr. Bérengère PHULPIN
Co-directeur de thèse :	Dr. Sébastien CLERC

### **Adresse de l'auteur :**

Camille RODDE  
99, rue du Sergent Blandan  
54000 NANCY