Cellules souches de la pulpe dentaire et matrice de collagène : une association au service de l'ingénierie tissulaire osseuse prévascularisée

Charlène Kichenbrand

▶ **To cite this version:**

Charlène Kichenbrand. Cellules souches de la pulpe dentaire et matrice de collagène : une association au service de l'ingénierie tissulaire osseuse prévascularisée. Ingénierie biomédicale. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0263 . tel-03264780

HAL Id: tel-03264780
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03264780

Submitted on 18 Jun 2021

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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

École Doctorale BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Charlène KICHENBRAND**

Cellules souches de la pulpe dentaire et matrice de collagène : une association au service de l'ingénierie tissulaire osseuse prévascularisée.

Soutenue le 17/12/2020

Membres du jury :

Rapporteurs :

Madame le Professeur Sophie GANGLOFF, PhD (PU, EA 4691 BIOS, Reims)

Monsieur le Professeur Jean-Christophe FARGES, PhD (PU-PH, UMR 5305 CNRS-UCBL, Lyon)

Examinateurs :

Monsieur le Professeur Patrick MENU, PhD (PU, UMR 7365 CNRS-UL, Nancy, directeur)

Madame le Docteur Vanessa MOBY, PhD (MCU-PH, UMR 7365 CNRS-UL, Nancy, co-directrice)

Monsieur le Docteur Maxime DUCRET, PhD (MCU-PH, UMR 5305 CNRS-UCBL, Lyon)

Invitée :

Madame le Docteur Anne SAPIN-MINET, PhD (MCU, EA 3452 UL, Nancy)

Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS-UL

9, avenue de la Forêt de Haye BP 20199

545050 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Remerciements

*À mon directeur de thèse, le professeur **Patrick Menu**, dont la bienveillance, le savoir et le soutien auront été d'une grande aide tout au long de ce travail.*

*À ma directrice de thèse, le docteur **Vanessa Moby**. Merci pour sa confiance, son énorme investissement personnel et professionnel pour me faire mener à bien ce travail, mais également pour m'avoir fait m'accomplir dans ma carrière hospitalo-universitaire, passer les obstacles, grandir et m'épanouir.*

*À la **direction et à tout le personnel d'IMoPA**, pour les liens tissés tout au long de ces années et les conseils dispensés. Merci aux professeurs **Jean-Yves Jouzeau** et **Bruno Charpentier** pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Merci en particulier aux docteurs **Astrid Pinzano, Reine El-Omar, Hervé Kempf, Frédéric Cailotto**, ainsi qu'à **Déborah Hellé, Christelle Henrionnet et Laurent Grossin** pour leur disponibilité et leur aide.*

*Aux docteurs **Maxime Ducret** et **Anne Sapin-Minet**, pour leurs conseils et leurs encouragements lors de ce travail.*
*Aux professeurs **Sophie Gangloff** et **Jean-Christophe Farges**, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et dont les commentaires et remarques seront d'un précieux concours.*

*A mes « colocataires » de bureau, et du bureau d'à côté. À mes anciens ou actuels co-doctorants : **Anne-Sophie, Gabriel, Benjamin, Paul, Elise, Adrien**. Ils ont rendu ces années inoubliables et riches.*

À ma famille et mes amis, piliers indéfectibles durant ces années.

A toi qui il y a 7 ans m'as fait lire un nom sur une porte. Qui aurait cru que nous en serions là aujourd'hui et que ce duo allait si bien fonctionner...Merci.

*Je dédie ce travail au docteur **Daniel Viennet**, MCU-PH en chirurgie orale, directeur de ma première thèse et regretté maître.*

Publications et communications issues de thèse

Publications dans des revues internationales :

Kichenbrand C, Grossin L, Menu P, Moby V.
Behavior of human dental pulp stem cell in high glucose condition: impact on proliferation and osteogenic differentiation.
Archives of Oral Biology, 2020, 118:104859

Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V.
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy.
Tissue Engineering Part B, 2019, 25:78-88

Publications dans des revues nationales :

Canceill T, Campana S, Blasco-Baque V, Monsarrat P, Kichenbrand C, Joniot S, Cazalbou C, Moby V.
Les concentrés plaquettaires en chirurgie orale. Quand la biologie et les matériaux ne font qu'un.
Biomatériaux cliniques, 2020, 5:2-10

Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V.
Les substituts osseux en odontologie. Partie 2 – Classification des substituts osseux.
Biomatériaux cliniques, 2019, 4:46-51

Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V.
Les substituts osseux en odontologie. Partie 1 - structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges.
Biomatériaux cliniques, 2018, 3:2-7

Communications orales :

Kichenbrand C, Moby V, Menu P.

Combined use of mesenchymal stem cells from dental pulp tissue (DPSCs) and natural coating surface from Wharton's jelly-extracellular matrix: benefits and promises in bone tissue engineering.

Journée de l'École Doctorale 2017, Université de Lorraine, Nancy.

Abréviations

A

α-MEM : *Alpha Minimal Essential Medium*

α–SMA : *α-Smooth Muscle Actin*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALP : Phosphatase Alcaline

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

B

β-TCP : *β-Tri Calcium Phosphate*

Bcl : *B cell lymphoma*

BCP : Phosphate de Calcium Biphasé

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

BMU : *Bone Multicellular Unit*

BSP : Sialoprotéine osseuse

C

$CaCl_2$: Chlorure de Calcium

CD : Cluster de Différenciation

CE : Cellule Endothéliale

CM : Milieu Conditionné

COL1A1 : *Collagen type I alpha 1 chain*

Coll I : Collagène I

CPE : Cellule Progénitrice Endothéliale

CSF : *Colony-Stimulating Factor*

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Souche Mésenchymateuse

CSM-CO : Cellule Souche Mésenchymateuse du Cordon Ombilical

CSM-FD : Cellule Souche Mésenchymateuse du Follicule Dentaire

CSM-GW : Cellule Souche Mésenchymateuse de la Gelée de Wharton

CSM-LP : Cellule Souche Mésenchymateuse du Ligament Parodontal

CSM-MO : Cellule Souche Mésenchymateuse de la Moelle Osseuse

CSM-PA : Cellule Souche Mésenchymateuse de la Papille Apicale

CSM-PD : Cellule Souche Mésenchymateuse de la Pulpe Dentaire

CSM-TA : Cellule Souche Mésenchymateuse du Tissu Adipeux

D

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DFPC : *Dental Follicle Progenitor Cells*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM-HG : *Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose*

DMEM-KO : *Dulbecco's Modified Eagle Medium Knock Out*

DMEM-LG : *Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose*

DMP : *Dentine Matrix Phosphoprotein*

DMSO : Dimethylsulfoxide

DPSC : *Dental Pulp Stem Cell*

DSP : *Dentine Sialophosphoprotein*

E

EGF : *Epidermal Growth Factor*

F

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

G

GAG : *Growth Arrest specific protein*

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*

H

HA : Hydroxyapatite

HES : Hématoxyline-Éosine-Safran

HG : *High Glucose*

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

I

IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine

ICAM : *Inter Cellular Adhesion Molecule*

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

IGF : *Insulin-like Growth Factor*

IL : Interleukine

iPS : Cellules induites Pluripotentes

ISCT : *International Society for Cellular Therapy*

ITS : Insuline Transferrine Sélénium

L

LDH : Lactate Déshydrogénase

LG : *Low Glucose*

LT : Lymphocyte T

M

M-CSF : *Macrophage-Colony Stimulating Factor*

MCP : *Monocyte Chemoattractant Protein*

MEC : Matrice Extracellulaire

MEPE : *Matrix Extracelllular Phosphoglycoprotein*

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)

N

NaCl : Chlorure de sodium

NGF : *Nerve Growth Factor*

NT-3 : Neurotrophine-3

O

OCN : Ostéocalcine

OPN : Ostéopontine

P

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PDLSC : *Periodontal Ligament Stem Cells*

PECAM : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*

PEG : Polyéthylène Glycol

PEGDA : Polyéthylène Glycol Di Acrylate

PGA : Acide PolyGlycolique

PHB : Polyhydroxybutyrate

PLA : Poly(l-acide lactique)

PLGA : Acide Poly-Lactique-co-Glycolique

PMMA : Polyméthylméthacrylate

POC : 1,8-octanediol-co-citrate

PTC : Produit de Thérapie Cellulaire

PTH : Parathormone

PVA : Alcool PolyVinylique

R

rh-BMP-2 : *Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2*

ROG : Régénération Osseuse Guidée

RT-qPCR : *real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

Runx2 : *Runt-related transcription factor 2*

S

SCAP : *Stem Cells from the Apical Papilla*

SHED : *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TGF : *Transforming Growth Factor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

Liste des figures

Figure 1 : structure macroscopique du tissu osseux.
Figure 2 : expression des marqueurs précoces et tardifs de différenciation ostéogénique.
Figure 3 : cycle et phases du remodelage osseux physiologique.
Figure 4 : cellules et cytokines impliquées dans le remodelage osseux.
Figure 5 : principe de la triade utilisée en ingénierie tissulaire osseuse.
Figure 6 : les différentes sources de cellules souches mésenchymateuses dentaires.
Figure 7 : anatomie de la dent.
Figure 8 : techniques d'isolement des CSM-PD.
Figure 9 : potentiel de différenciation des CSM-PD.
Figure 10 : champs d'application des thérapies de médecine régénérative utilisant les CSM-PD.
Figure 11 : photographie en microscopie électronique à balayage des nodules de minéralisation sur les fibres de collagène de type I *in vitro*.
Figure 12 : photographie en microscopie électronique à transmission des nanoliposomes de lécithine de soja produits au LIBio, Université de Lorraine.
Figure 13 : principe du développement de biomatériaux d'ingénierie tissulaire prévascularisés et de l'intérêt de la présence de facteurs de croissance dans le milieu conditionné.
Figure 14 : applications de l'utilisation du CM issu des CSM-PD en médecine régénérative.
Figure 15 : aspects radiologique et clinique des stades 5 (A), 6 (B) et 7 (C) de Nolla.
Figure 16 : technique des explants.
Figure 17 : biomatrice de collagène utilisée pour l'ensemencement des CSM-PD.
Figure 18 : répartition des 36 biomatériaux selon leur composition et leurs conditions de culture.
Figure 19 : analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaires des CSM-PD.
Figure 20 : aspect des CSM-PD en passage 3 en microcopie optique : cellules fusiformes à morphologie fibroblastique.
Figure 21 : effets de la concentration en nanoliposomes en termes de cytotoxicité sur les CSM-PD à 24 heures de culture.
Figure 22 : effets de la concentration en nanoliposomes sur la viabilité cellulaire des CSM-PD aux différents jours de culture.
Figure 23 : quantification de l'ADN (µg/µL) produit par les CSM-PD selon les différentes concentrations en glucose (5,5 mM *vs* 20 mM) en fonction du temps de culture.

Figure 24 : mesure de l'absorbance obtenue lors du test MTT normalisée par l'absorbance de l'ADN selon la concentration en glucose utilisée en fonction du temps de culture.
Figure 25 : effets de la concentration en glucose sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés.
Figure 26 : effets de la concentration en glucose sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés.
Figure 27 : effets de la concentration en glucose sur l'expression de gènes de différenciation ostéogéniques par les CSM-PD.
Figure 28 : quantification de l'ADN (µg/µL) produit par les CSM-PD selon la densité d'ensemencement aux différents jours de culture.
Figure 29 : viabilité des CSM-PD selon la densité d'ensemencement aux différents jours de culture.
Figure 30 : effets de la densité d'ensemencement sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés.
Figure 31 : aspect des CSM-PD après 28 jours de culture en milieu basal à densité classique (A), en milieu d'induction ostéogénique à densité classique (B) ou à faible densité (C).
Figure 32 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencées avec les CSM-PD.
Figure 33 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencées avec les CSM-PD.
Figure 34 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD.
Figure 35 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencées avec les CSM-PD.
Figure 36 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencées avec les CSM-PD.
Figure 37 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD, milieu basal.
Figure 38 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD, milieu de différenciation ostéogénique.
Figure 39 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 40 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 41 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 42 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 43 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD.
Figure 44 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 45 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.

Figure 46 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 47 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 48 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.
Figure 49 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD.

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition de la partie organique du tissu osseux.
Tableau 2 : propriétés mécaniques du tissu osseux.
Tableau 3 : propriétés biologiques du substitut osseux idéal.
Tableau 4 : propriétés mécaniques du substitut osseux idéal.
Tableau 5 : principaux marqueurs de surface cellulaire des CSM.
Tableau 6 : principaux marqueurs de surface cellulaire exprimés par les CSM-PD.
Tableau 7 : fonctions des marqueurs cellulaires exprimés par les CSM-PD.
Tableau 8 : marqueurs de surface exprimés négativement par les CSM-PD.
Tableau 9 : matrices utilisées pour l'ensemencement des CSM-PD *in vitro* et *in vivo*.
Tableau 10 : effets obtenus lors de l'ensemencement de CSM de moelle osseuse dans les matrices à base d'hydroxyapatite.
Tableau 11 : effets obtenus lors de l'ensemencement de CSM de diverses origines dans les matrices à base d'hydroxyapatite.
Tableau 12 : stades d'édification radiculaire selon la classification de Nolla.
Tableau 13 : anticorps utilisés en cytométrie en flux.
Tableau 14 : amorces utilisées lors de l'analyse par RT-qPCR.
Tableau 15 : résultats des analyses par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaires des CSM-PD.

Table des matières

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE
2. ÉTAT DE L'ART
   2.1. Le tissu osseux
      2.1.1. Os cortical et os spongieux
      2.1.2. Propriétés mécaniques
      2.1.3. Le remodelage osseux
      2.1.4. Les pertes de substance du tissu osseux
   2.2. Les options thérapeutiques actuelles pour pallier les pertes de substance osseuses
      2.2.1. Cahier des charges des substituts osseux
      2.2.2. La greffe osseuse autogène
      2.2.3. Les substituts osseux
         2.2.3.1 L'allogreffe
         2.2.3.2. La xénogreffe
         2.2.3.3. Les substituts osseux synthétiques
      2.2.4. L'alternative : l'ingénierie tissulaire osseuse
   2.3. Le contingent cellulaire
      2.3.1. Les cellules souches : généralités
      2.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)
         2.3.2.1. Généralités
         2.3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine dentaire
         2.3.2.3. Les cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD)
   2.4. Les matrices en ingénierie tissulaire osseuse
      2.4.1. Généralités
      2.4.2. L'utilisation des matrices de collagène en ingénierie tissulaire osseuse
      2.4.3. Intérêt de l'utilisation de matrices de collagène combinées à un hydrogel d'hydroxyapatite et alginate en ingénierie tissulaire osseuse
         2.4.3.1. Intérêt de l'ajout d'hydroxyapatite
         2.4.3.2. Intérêt de l'ajout d'alginate
   2.5. Influence de l'environnement sur les CSM-PD
      2.5.1. Facteurs de croissance
      2.5.2. Conditions de culture

2.6. Intérêt d'une co-différenciation angiogénique et ostéogénique des CSM-PD
2.7. Effet paracrine des CSM-PD et intérêt du milieu conditionné
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES
3.1. Culture cellulaire : isolement et expansion des CSM-PD
3.2. Caractérisation des CSM-PD par cytométrie en flux
3.3. Stimulations environnementales des CSM-PD
3.3.1. Étude des effets *in vitro* de vésicules de taille nanométriques (nanoliposomes) sur les CSM-PD
3.3.1.1. Évaluation de la cytotoxicité des nanoliposomes sur les CSM-PD
3.3.1.2. Évaluation de la prolifération cellulaire
3.3.1.3. Évaluation de la viabilité cellulaire
3.3.2. Étude des effets du glucose sur le comportement des CSM-PD
3.3.2.1. Étude de l'influence du glucose sur la prolifération cellulaire des CSM-PD
3.3.2.2. Étude de l'influence du glucose sur la viabilité cellulaire des CSM-PD
3.3.2.3. Étude de l'influence du glucose sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD
3.3.3. Étude de l'effet de la densité d'ensemencement sur les CSM-PD
3.3.3.1. Effets sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD
3.3.3.2. Effets sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD
3.4. Développement d'un biomatériau composite associant éponges de collagène et hydrogel, ensemencées par des CSM-PD
3.4.1. Biomatériaux utilisés
3.4.2. Préparation des hydrogels
3.4.3. Ensemencement des CSM-PD dans les biomatériaux et milieux de culture utilisés
3.4.4. Analyses histologiques
3.4.5. Analyses immunohistochimiques
3.5. Analyses statistiques
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION
4.1. Caractérisation phénotypique des CSM-PD par cytométrie en flux
4.2. Stimulations environnementales des CSM-PD

4.2.1. Étude des effets *in vitro* de vésicules de taille nanométriques (nanoliposomes) sur les CSM-PD

4.2.1.1. Évaluation de la cytotoxicité des nanoliposomes sur les CSM-PD

4.2.1.2. Évaluation de la prolifération et viabilité cellulaire

4.2.2. Étude des effets du glucose sur le comportement des CSM-PD

4.2.2.1. Étude de l'influence du glucose sur la prolifération cellulaire des CSM-PD

4.2.2.2. Étude de l'influence du glucose sur la viabilité cellulaire des CSM-PD

4.2.2.3. Étude de l'influence du glucose sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

4.2.3. Étude de l'effet de la densité d'ensemencement sur les CSM-PD

4.2.3.1. Effets sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD

4.2.3.2. Effets sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

4.3. Développement d'un biomatériau composite associant éponges de collagène et hydrogel, ensemencé par des CSM-PD.

4.3.1. Analyses histologiques

4.3.1.1. Coloration Hématoxyline-Éosine-Safran

4.3.1.2. Coloration Rouge Alizarine

4.3.1.3. Coloration de Von Kossa

4.3.2. Analyses immunohistochimiques

4.3.2.1. Ostéocalcine

4.3.2.2. CD31

4.3.2.3. Ostéopontine

4.3.2.4. VE-Cadhérine

5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Face à des pertes de substance osseuse de moyennes et grandes étendues, qu'elles soient d'origine traumatique, tumorale, congénitale ou infectieuse, les greffes osseuses autologues et les substituts osseux représentent les deux options thérapeutiques. Le substitut osseux peut être d'origine humaine avec l'allogreffe (os de banque), animale (xénogreffe) ou synthétique (céramiques (phosphates tricalciques, hydroxyapatites, céramiques biphasées, bioverres), composites) (1) (Annexe 4).

Un substitut osseux idéal doit être biocompatible, biorésorbable, ostéoinducteur, ostéoconducteur, ostéogénique et doit permettre une revascularisation du greffon (2) (Annexe 3). Il doit également posséder des qualités mécaniques proches de celles du tissu osseux natif et doit être facilement manipulable en clinique par le chirurgien. À ce jour, aucun substitut osseux ne rassemble toutes ces qualités et les autogreffes considérées comme le *gold standard* trouvent leurs limites : morbidité au niveau du second site de prélèvement, quantité disponible limitée et résorption difficile à anticiper. Les allogreffes et les xénogreffes présentent l'avantage d'être disponibles en plus grande quantité et sous différentes présentations pour le clinicien (blocs, granules) mais présentent des risques de transmission de pathogènes et les traitements appliqués pour réduire ce risque en font des matériaux qui ne sont quasiment plus qu'ostéoconducteurs (3). Les substituts osseux synthétiques disponibles en quantité suffisante sans nécessiter de prélèvement sur un second site, ne sont globalement qu'ostéoconducteurs et présentent de faibles qualités mécaniques. Les matériaux composites mimant le tissu osseux natif en associant une phase organique à une phase minérale, principalement composées de collagène et hydroxyapatite (HA) ou *β-tri calcium phosphate* (β-TCP) montrent à la fois des propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction mais les mêmes faiblesses mécaniques.

Face à ces limites, et en vue d'obtenir un substitut osseux idéal, l'ingénierie tissulaire ambitionne de développer un biomatériau bioactif, biocompatible, biorésorbable, qui permettrait de s'affranchir des inconvénients propres aux autres alternatives thérapeutiques. Pour cela, l'ingénierie tissulaire osseuse s'appuie sur l'association (1) de cellules aux propriétés ostéogéniques, (2) d'une matrice mimant l'architecture et la composition du tissu natif, et (3) de molécules bioactives favorisant la survie, la croissance et la différenciation des cellules ainsi que l'intégration du biomatériau.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont utilisées en ingénierie tissulaire osseuse pour leurs propriétés immunosuppressives, leur caractère non immunogène, leurs capacités d'autorenouvellement et leur multipotence. Parmi ces CSM, celles issues de la moelle osseuse

sont parmi les plus étudiées et les plus utilisées. Néanmoins, leur utilisation nécessite un prélèvement invasif et douloureux, le plus souvent sous anesthésie générale, avec une morbidité parfois importante au niveau du site de prélèvement. Par ailleurs, l'âge du donneur influe sur la qualité des cellules. De nombreuses autres sources de CSM sont disponibles dans l'organisme et parmi elles, les CSM de la pulpe dentaire (CSM-PD) représentent une alternative intéressante. En effet, ces cellules sont accessibles en grande quantité à la suite de gestes de routine de chirurgie-dentaire. Certaines dents extraites pour des raisons thérapeutiques comme les dents de sagesse chez l'adolescent ou le jeune adulte sont considérées comme des déchets opératoires et donc non valorisées. Pourtant, ces CSM-PD possèdent les mêmes propriétés que les CSM de moelle osseuse (CSM-MO). Elles sont d'ailleurs capables de se différencier non seulement en lignées chondrogéniques, ostéogéniques et adipocytaires, mais également en cellules endothéliales (CE) ou neurales et de régénérer *in vivo* de nombreux tissus (tissu nerveux, osseux, vasculaire, musculaire, cardiaque, pancréatique, hépatique, pulmonaire, dentaire). Ces CSM-PD pourraient donc constituer une alternative intéressante à d'autres sources de CSM.

La régénération d'un tissu osseux fonctionnel nécessite l'utilisation d'un support tridimensionnel favorable à la survie et la différenciation ostéogénique des cellules en son sein et à l'établissement d'une néovascularisation. L'optimisation de la matrice doit également permettre d'améliorer ses propriétés mécaniques, toujours dans une finalité d'utilisation *in vivo*. Ainsi, l'utilisation d'une matrice de collagène I semble constituer le support idéal pour les CSM-PD puisque c'est le constituant majoritaire à la fois de la matrice extracellulaire (MEC) de la pulpe dentaire mais également de la trame organique du tissu osseux. Néanmoins, les matrices à base de collagène seul ne sont qu'ostéoconductrices et présentent de faibles propriétés mécaniques, rendant leur utilisation délicate en clinique. Il semble ainsi intéressant de leur adjoindre un hydrogel combinant alginate et hydroxyapatite (HA), afin d'une part de permettre une meilleure encapsulation des cellules ensemencées dans le biomatériau (propriétés de l'alginate) et d'autre part d'optimiser les propriétés mécaniques de nos substituts et de potentialiser les capacités intrinsèques des CSM-PD (propriétés de l'HA).

Notre projet vise ainsi à créer un biomatériau cellularisé fonctionnel pour la régénération osseuse à partir d'une seule source tissulaire (la pulpe dentaire) et d'une matrice biologique à base de collagène, d'alginate et d'HA.

Les objectifs de ce travail de thèse ont été de :

(1) Créer une banque de CSM-PD. Issues de dents immatures prélevées lors d'une inclusion de patients dans le protocole CELSORDINO, ces CSM-PD ont été isolées et caractérisées phénotypiquement.

(2) Évaluer l'influence de l'environnement sur la prolifération, la viabilité et la différenciation ostéogénique des CSM-PD : culture en présence de nanoliposomes issus de lécithine de colza (vecteurs potentiels de facteurs de croissance), variations de la teneur en glucose de l'environnement et de la densité d'ensemencement cellulaire.

(3) Créer une matrice tridimensionnelle innovante en associant des éponges de collagènes à des hydrogels d'alginate enrichi en hydroxyapatite.

(4) Étudier le comportement et la différenciation ostéogénique et angiogénique des CSM-PD ensemencées dans ces matrices tridimensionnelles optimisées.

2. ÉTAT DE L'ART

2.1. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé et vascularisé d'origine mésenchymateuse qui participe avec le cartilage à la constitution du squelette.

Morphologiquement, le squelette est constitué par des os de taille et de forme différentes qu'on peut classer en trois grandes catégories : les os longs, les os courts et les os plats.

Macroscopiquement, l'os est organisé en deux structures distinctes ; la partie externe formée d'une couche dense et épaisse (l'os cortical ou compact) et la partie interne, moins dense, contenant un grand nombre de travées (l'os trabéculaire ou spongieux) (Figure 1).

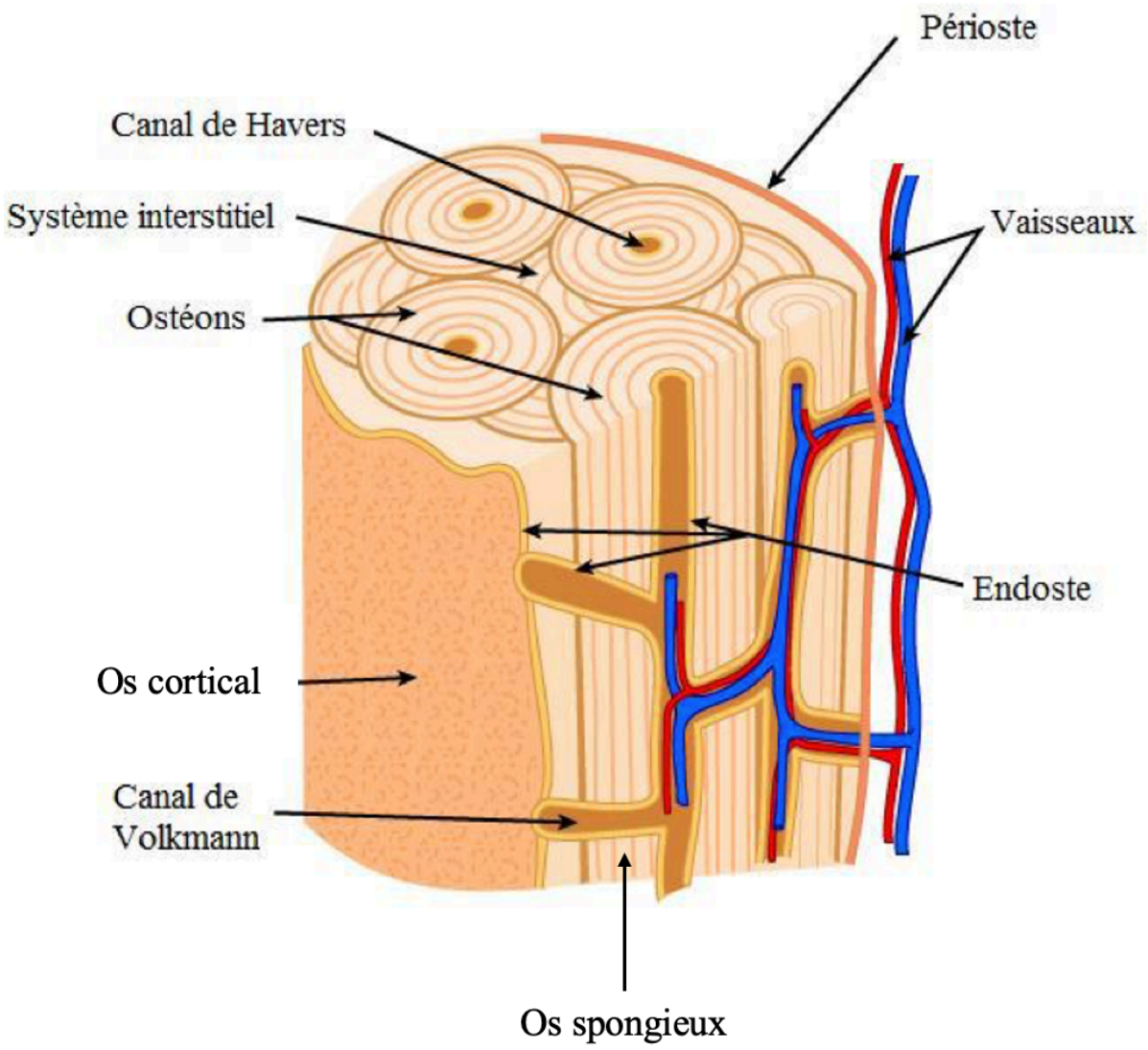


Figure 1 : structure macroscopique du tissu osseux, d'après (4).

2.1.1. Os cortical et os spongieux

L'os cortical, localisé à la périphérie des os, apporte une composante rigide et résistante au tissu osseux. Il est organisé en lamelles cylindriques (ostéons) orientées longitudinalement par rapport à l'os et ordonnées autours d'un canal renfermant nerfs et vaisseaux sanguins (canal de Havers). La taille de ses pores est comprise entre 10 et 50 μm (5).
L'os trabéculaire, central, très poreux, est formé par un réseau de trabécules osseuses d'un diamètre compris entre 200 et 600 μm au sein desquelles se trouve la moelle osseuse. La microstructure de l'os trabéculaire est constituée de lamelles osseuses disposées parallèlement à la surface des trabécules (5).
Le tissu osseux permet à la fois d'assurer un rôle mécanique dans le mouvement en servant de support aux muscles et tissus mous qui lui sont attachés, de protéger les organes internes, et de participer à la régulation du métabolisme phosphocalcique via le stock de minéraux (phosphate et calcium) qui le constitue.
Le tissu osseux, qu'il soit cortical ou trabéculaire, est constitué de deux composantes fondamentales synergiques et indissociables : les cellules osseuses et la MEC osseuse.

- La matrice extracellulaire osseuse

Elle confère à l'os ses propriétés mécaniques. Elle est composée d'une fraction organique (30%) et d'une fraction minérale (70%).

La fraction organique représente environ 25% de la masse du tissu osseux (6) et est majoritairement composée de protéines collagéniques (90%), essentiellement du collagène I (Coll I) et de petites protéines non collagéniques (10%) (ostéocalcine (OCN), ostéopontine (OPN), ostéonectine, sialoprotéine osseuse (BSP)), de facteurs de croissance ainsi que de glycosaminoglycanes, protéoglycanes, fibronectine et élastine (Tableau 1) (2) (Annexe 3).

PROTÉINES NON COLLAGÉNIQUES	PROTÉINES COLLAGÉNIQUES
Ostéocalcine (20%)	Collagène de type I (97%)
Ostéonectine (20%)	Collagène de type V (3%)
Sialoprotéines osseuses (12%)	
Protéoglycanes (10%)	
Ostéopontine	
Fibronectine	
Glycoprotéines	
Facteurs de croissance	

Tableau 1 : composition de la partie organique du tissu osseux (d'après (7)).

La fraction minérale est constituée essentiellement de phosphates de calcium, minéraux assemblés sous forme de cristaux d'HA de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (8). On retrouve au sein de cette matrice osseuse de nombreux espaces non minéralisés où se logent les vaisseaux sanguins responsables de la vascularisation du tissu osseux (7).

- Les lignées cellulaires du tissu osseux

Les cellules du tissu osseux (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) n'ont pas la même origine embryologique et ne se différencient pas depuis les mêmes lignées cellulaires.

Les cellules de la lignée ostéoblastique dérivent de CSM formées dans la moelle osseuse. De ces CSM dérivent les cellules ostéoprogénitrices qui se différencient finalement en ostéoblastes. Les ostéoblastes constituent 10% des cellules du tissu osseux et sont situées à la surface de l'os quand ils sont actifs. Ils ont pour fonction de synthétiser la matrice organique ostéoïde et de contrôler sa minéralisation. Les ostéoblastes régulent également l'activité des ostéoclastes et jouent ainsi un rôle dans le maintien de l'homéostasie du tissu osseux. La différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules ostéoprogénitrices et en ostéoblastes est sous le contrôle de facteurs de transcription tels Osterix et *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) qui permettent la différenciation ostéogénique et l'activation de gènes exprimés par les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes matures. Les cellules ostéoblastiques expriment des marqueurs de différenciation précoces (Runx2, phosphatase alcaline (ALP), Coll 1, OPN) et tardifs (OCN, sialoprotéine osseuse) (Figure 2).

Par ailleurs, les ostéoblastes peuvent également dériver de précurseurs cellulaires apportées par la vascularisation locale : les péricytes. Ces cellules de la lame basale de l'endothélium vasculaire capillaire semblent en effet posséder la capacité de se différencier en ostéoblastes (9).

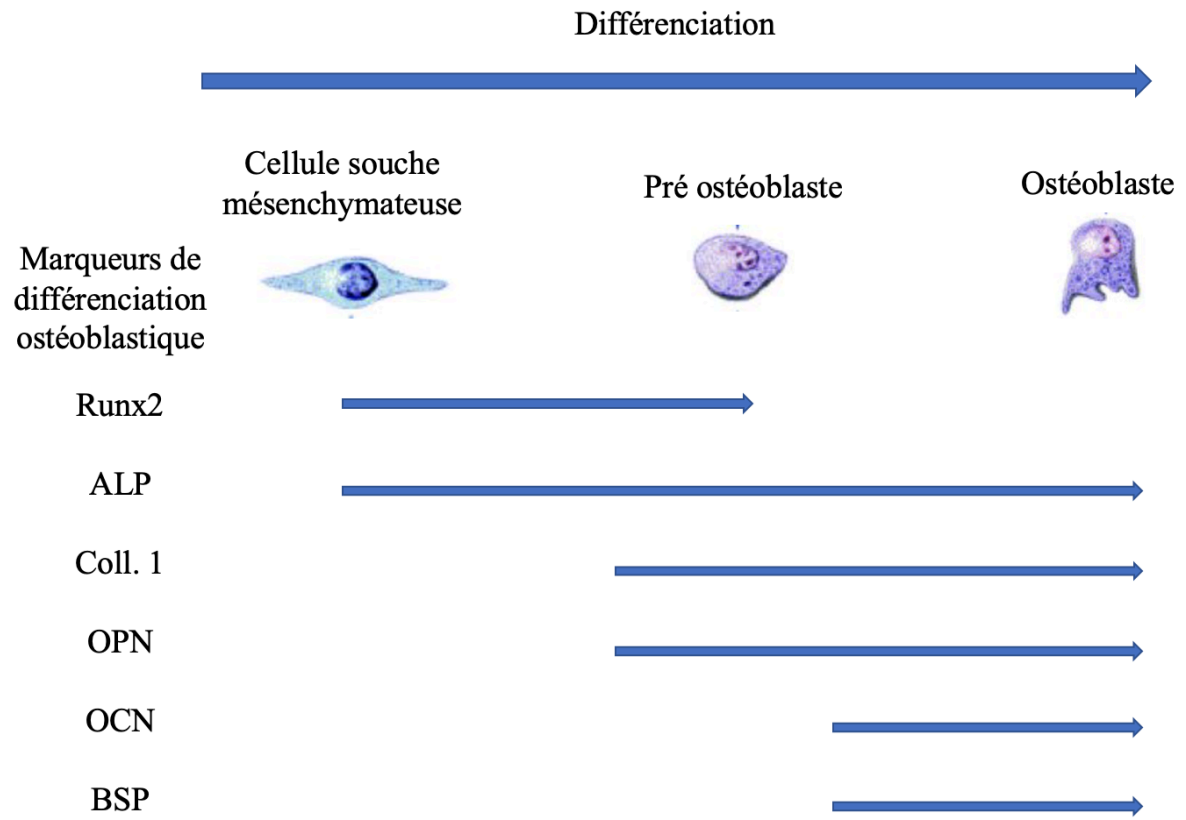


Figure 2 : expression des marqueurs précoces et tardifs de différenciation ostéogénique (ALP : phosphatase alcaline, Coll 1 : collagène I, OPN : ostéopontine, OCN : ostéocalcine, BSP : sialoprotéine osseuse). D'après (10).

Les ostéoblastes sécrètent des facteurs de croissance impliqués dans l'ostéogénèse : le *Transforming Growth Factor* (TGF-β), les protéines morphogéniques osseuses ou *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) et le *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (11). Ils contrôlent également la concentration locale en phosphate inorganique et en calcium et permettent l'initiation de la minéralisation par fixation de l'HA sur la matrice organique ostéoïde qu'ils ont synthétisée (12).

Les ostéocytes constituent 90% des cellules osseuses et sont des ostéoblastes à différenciation terminale, ou emprisonnés dans les logettes (ostéoplastes) de la matrice qu'ils ont synthétisée

(13). Ils ne sont plus capables d'élaborer le tissu ostéoïde. Ils détectent les signaux de stress mécanique subits par le tissu osseux et régulent en fonction l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ils participent ainsi à l'homéostasie du tissu osseux (8).

Les ostéoclastes (1% des cellules osseuses) sont des cellules géantes plurinucléées différenciées à partir de progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes sous l'influence de plusieurs facteurs. Ainsi, le *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) sécrété par les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes ainsi que le RANK sécrété par les ostéoblastes et les CSM induisent leur différenciation en ostéoclastes à partir des monocytes (7). Ils résorbent le tissu osseux sous le contrôle des ostéoblastes, via une digestion et une dissolution de la matrice osseuse au niveau des lacunes de Howship. Les ostéoblastes régulent la différenciation et l'activité des ostéoclastes.

2.1.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de l'os sont variables selon qu'il s'agisse d'os cortical ou d'os trabéculaire et sont principalement influencées par son architecture intrinsèque et sa porosité. La porosité de l'os cortical varie entre 5 et 13% tandis que celle de l'os trabéculaire est comprise entre 30 et 90% (14).
Plus la porosité de l'os est importante, moins ses propriétés mécaniques en résistance à la compression, flexion et tension seront importantes (Tableau 2).

Type d'os	**Taux de porosité (%)**	**Résistance à la flexion (MPa)**	**Résistance à la compression (MPa)**	**Résistance à la tension (MPa)**	**Module d'élasticité de Young (GPa)**
Os cortical	5-13	135-193	130-180	50-151	12-18
Os trabéculaire	30-90	-	4-12	1-5	0,1-0,5

Tableau 2 : propriétés mécaniques du tissu osseux (2).

Le comportement biomécanique de l'os repose sur un concept central de déformation ou déplacement induit par une charge ou effort appliqué sur la structure osseuse (15). Ainsi, sous l'effet de forces extérieures, le tissu osseux est soumis à l'établissement de contraintes qui

entrainent des déformations. Une fois les capacités de déplacement et de résistance à la contrainte dépassées, c'est la rupture. Ces propriétés et ces contraintes sont variables suivant les zones du squelette et diffèrent par exemple entre les os du système locomoteur et ceux de l'appareil manducateur. Les contraintes exercées sur les os du système locomoteur résultent majoritairement de l'action des muscles, ligaments et tendons qui s'y rattachent, là où les contraintes mécaniques de l'os mandibulaire sont également liées à la denture et aux forces occlusales et masticatoires. Le remaniement osseux mandibulaire est constant et lié à la présence de l'organe dentaire, l'édentation entrainant une résorption mandibulaire et maxillaire importante (15).

2.1.3. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant remaniement et participe ainsi via les phénomènes d'apposition et de résorption osseuse, à la régulation du métabolisme phosphocalcique et à la modification de l'architecture osseuse en réponse aux contraintes mécaniques. Ces phénomènes constants de remodelage du tissu osseux sont équilibrés en conditions physiologiques et permettent également la réparation des pertes de substance osseuse jusqu'à une certaine limite dans la taille du défaut osseux à réparer.

Le remodelage osseux implique une action coordonnée et un dialogue cellulaire entre ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes. Initiée par l'activation ostéoclastique, la résorption du tissu osseux ancien est suivie d'une inversion de la dynamique de remodelage avec instauration de la phase de synthèse osseuse médiée par les ostéoblastes, suivie d'une minéralisation de la matrice osseuse synthétisée (16). Les cellules de la lignée ostéoblastique et de la lignée ostéoclastique sont ainsi organisées en unités fonctionnelles spécialisées appelées unités multicellulaires osseuses ou BMU (*Bone Multicellular Unit*) (17). Le cycle complet de remodelage osseux est composé de six phases successives : l'activation, la résorption, l'inversion, la formation, la minéralisation, et la quiescence (Figure 3).

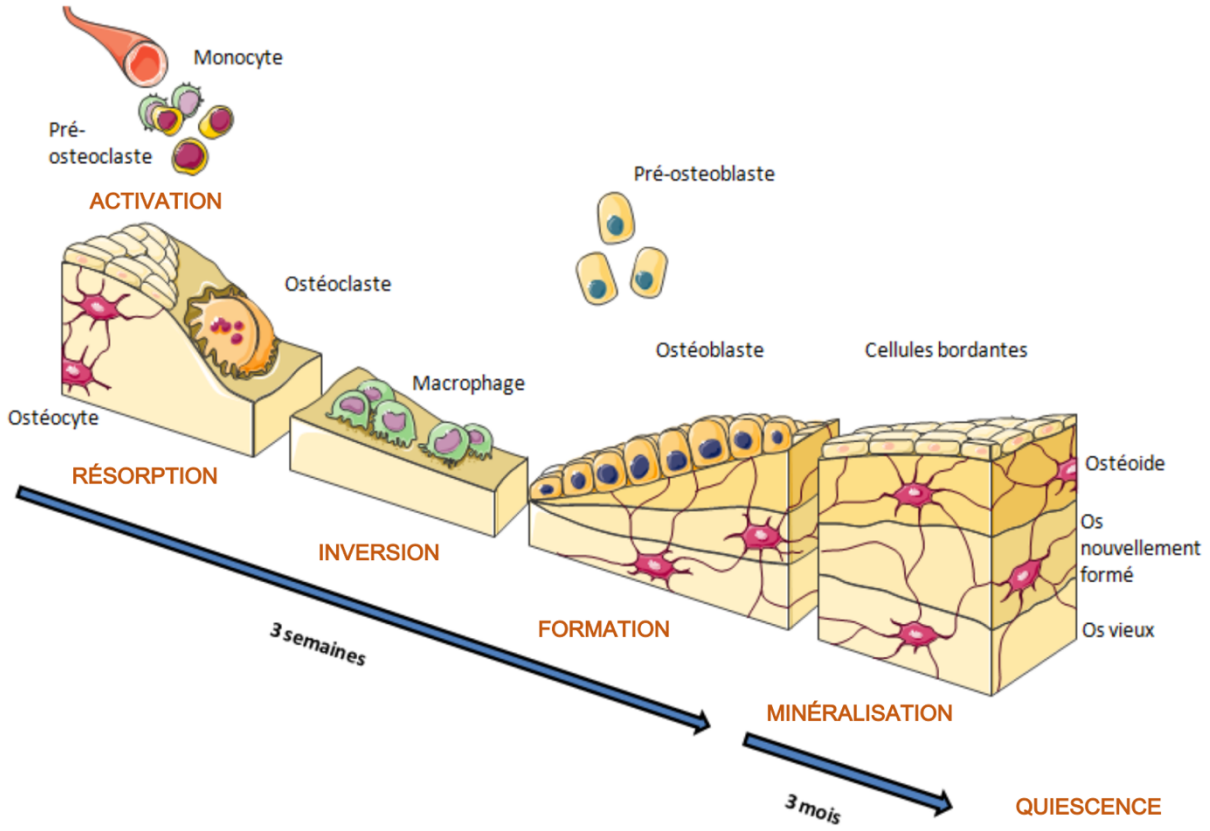


Figure 3 : cycle et phases du remodelage osseux physiologique (d'après (18)).

Lors de la phase d'activation, les précurseurs des ostéoclastes, dérivés des monocytes comme nous l'avons vu précédemment, sont activés et se différencient en ostéoclastes sous l'influence du RANK et du M-CSF sécrétés par les ostéoblastes et les cellules ostéoprogénitrices. Les ostéoclastes forment à la surface osseuse inactive une lacune de résorption (lacune de Howship) en se fixant à la MEC. L'ostéoclasie se déroule alors en deux étapes successives : 1) une dissolution de la phase minérale de la matrice extra cellulaire osseuse par acidification de la lacune de résorption et sécrétion d'ions H+, 2) la sécrétion d'enzymes protéolytiques lysosomales qui vont dégrader la matrice. Ces deux phénomènes se produisent suite à la différenciation de la membrane plasmique de l'ostéoclaste en bordure en brosse, au niveau de laquelle des pompes à protons permettent la sécrétion des ions H+ et le relargage des enzymes de digestion (collagénases, métalloprotéinases, phosphatase acide). Lorsque la MEC de l'os ancien est dégradée, des cellules mononuclées de type macrophage prennent la place des ostéoclastes afin de lisser le fond de la lacune, avant d'être remplacés par les cellules de la lignée ostéoblastique, réalisant ainsi la phase dite d'inversion. Les ostéoblastes, différenciés comme nous l'avons vu à partir de CSM ou de péricytes, synthétisent au fond de la lacune une MEC non minéralisée : le tissu ostéoïde. Les ostéoblastes initient ensuite la minéralisation du

tissu ostéoïde en augmentant la concentration locale en ions phosphates et calcium, qui vont précipiter sur les fibres collagéniques de la MEC (7,8,17).

Le remodelage osseux est contrôlé par des facteurs systémiques, principalement de nature hormonale, et des facteurs du microenvironnement local.

Ainsi, plusieurs hormones interviennent dans la régulation du métabolisme osseux : la parathormone (PTH), la calcitonine, l'œstradiol, la progestérone, les glucocorticoïdes et l'hormone de croissance ou somatotropine (17). La PTH et les glucocorticoïdes augmentent l'activation des ostéoclastes tandis que la calcitonine et les hormones gonadiques tendent à l'inhiber.

Par ailleurs, plusieurs facteurs de croissance et cytokines sont impliqués dans la régulation du remodelage osseux : la famille des BMP, l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF), le TGF-ß, l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) et son récepteur ou le FGF (17). Les BMP sont des protéines du tissu osseux impliquées dans l'induction de l'ostéogénèse, le recrutement et la différenciation ostéoblastique. Le FGF et l'IGF sont des facteurs de croissance permettant de stimuler la prolifération et la croissance ostéoblastique. Le TGF-ß quant à lui est associé à la production de la MEC osseuse, la maturation cellulaire et stimule la synthèse du collagène et des protéines non collagéniques constituant la phase organique de la MEC (19). Ostéoblastes et ostéoclastes produisent ces différentes cytokines et en sont (ou leurs précurseurs) mutuellement les cibles (Figure 4).

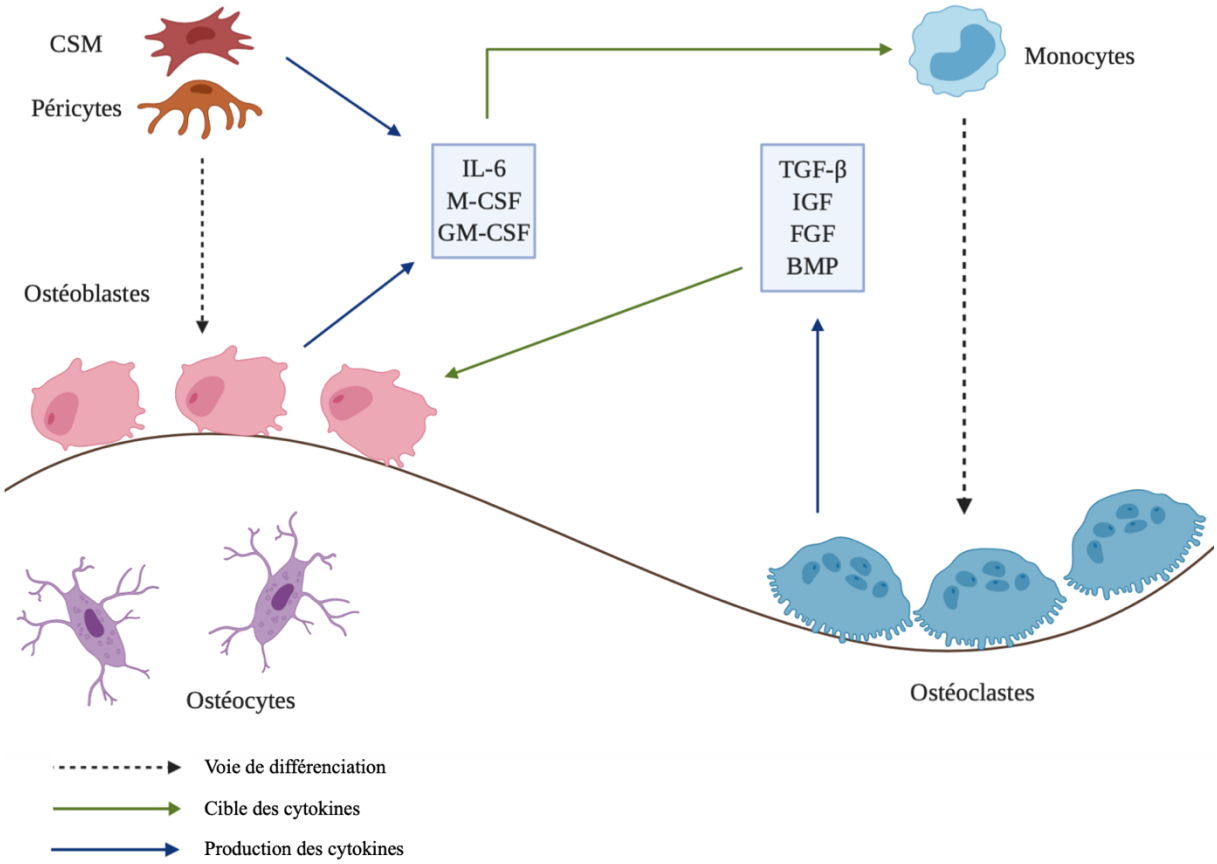


Figure 4 : cellules et cytokines impliquées dans le remodelage osseux (d'après (19)). CSM : cellules souches mésenchymateuses.

La durée du cycle de remodelage osseux physiologique est de trois mois, avec un remodelage plus fréquent et plus important de l'os trabéculaire (25% de la masse totale renouvelée chaque année) par rapport à celui de l'os cortical (4%) (19).

2.1.4. Les pertes de substance du tissu osseux

La faculté du tissu osseux de s'auto-renouveler et d'être en constant remaniement lui permet également de déployer une intéressante capacité d'autoréparation. Ainsi, à la suite d'une perte de substance osseuse qu'elle soit d'origine traumatique, tumorale, chirurgicale ou infectieuse, une guérison et régénération osseuse peuvent survenir spontanément et combler le défaut osseux par de l'os néoformé si les conditions le permettent. Cela se produit généralement si la perte de substance est de petite taille et/ou si la géométrie du défaut à réparer est favorable. Néanmoins, dans les cas de défaut osseux de moyenne et grande étendue ou en l'absence de continuité entre les zones d'os résiduel (défaut osseux de taille critique), les capacités naturelles d'auto-régénération du tissu osseux sont dépassées et vont nécessiter la mise en place de greffes

osseuses autogènes ou de substituts osseux (20). La notion de défaut osseux de taille critique a été introduite dès 1985 et est définie comme le plus petit défaut osseux sur un site anatomique qui ne cicatrise pas de façon spontanée et totale sur une durée donnée (21). La taille à partir de laquelle un défaut osseux est dit critique est propre à chaque espèce suivant l'os considéré. À titre d'exemple, bien qu'il n'existe pas de consensus formel à ce jour, cette taille à la mandibule est généralement considérée de 5 mm de diamètre chez le rat (22) et de 5 cm chez le grand animal (23). La reconstruction des défauts osseux de taille critique notamment en chirurgie maxillo-faciale demeure un challenge et impose d'obtenir non seulement un résultat fonctionnel (mastication, parole) mais aussi esthétique. La non-cicatrisation des défauts osseux de taille critique est principalement due à l'absence de revascularisation de l'os ou des substituts osseux greffés, entrainant nécrose, exposition osseuse et infections, ou encore à l'interposition de tissu fibro-épithélial dans les zones de greffe à la place d'un tissu osseux fonctionnel (22).

2.2. Les options thérapeutiques actuelles pour pallier les pertes de substance osseuses

Actuellement, à disposition du clinicien, peuvent être proposées deux types de solutions pour réparer les défauts osseux : la greffe d'os autogène ou l'utilisation de substituts osseux qu'ils soient d'origine humaine (allogreffe), animale (xénogreffe) ou synthétiques. Un substitut osseux peut être défini comme « tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, destiné à l'implantation chez l'homme, dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux, qu'il s'agisse du renforcement d'une structure osseuse, du comblement d'une perte de substance, d'origine traumatique ou orthopédique, de la consolidation d'une fracture ou de son équivalent » (Société Française de Recherche en Chirurgie Orthopédique et Traumatologique). Ils doivent répondre à un cahier des charges précis et posséder des propriétés biologiques et mécaniques appropriés à l'utilisation clinique.

2.2.1. Cahier des charges des substituts osseux (d'après (2) (Annexe 3))

Un substitut osseux idéal utilisable en clinique doit donc présenter à la fois des qualités biologiques compatibles avec une implantation *in vivo* (Tableau 3) et des qualités mécaniques se rapprochant au plus près de celles du tissu osseux natif (Tableau 4).

BIOCOMPATIBILITE	BIOACTIVITÉ	BIODÉGRADABILITE
Absence de toxicité Présence d'interactions favorables entre le substitut osseux et l'organisme receveur Non immunogénicité N'entraine pas de contaminations virales, parasitaires ou bactériennes	Ostéoconducteur : support physique pour la formation osseuse et l'invasion vasculaire Ostéoinducteur : permet le recrutement et la différenciation de cellules ostéogéniques Ostéogénique : contient tous les éléments y compris les cellules nécessaires à la néoformation osseuse	Capacité de dégradation du substitut adéquate dans le temps pour permettre le remplacement du biomatériau par de l'os néoformé

Tableau 3 : propriétés biologiques du substitut osseux idéal.

POROSITÉ	MALLÉABILITE	STABILITÉ DIMENSIONNELLE	PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES
Macroporosité (pores>100µm de diamètre) facilitant l'ostéoconduction Microporosité (pores < 5 µm de diamètre) permettant la diffusion des molécules et fluides dans le biomatériau	Adaptation aux défauts osseux Utilisation simplifiée pour le praticien	Ancrage primaire Respect des tissus environnants	Les plus proches possibles du tissu osseux natif (résistance en traction et compression)

Tableau 4 : propriétés mécaniques du substitut osseux idéal.

2.2.2. La greffe osseuse autogène

Considérée comme le *gold standard*, la greffe d'os autogène consiste à prélever et à implanter chez le même patient une quantité d'os adaptée à la perte de substance à combler. L'os autogène

présente comme avantage majeur d'être similaire biologiquement et mécaniquement à l'os natif à remplacer. Il est ostéoconducteur, ostéoinducteur et ostéogénique (1,19). Néanmoins, les limites majeures du choix de la greffe d'os autogène résident dans la faiblesse de la quantité d'os pouvant être prélevée selon les conditions anatomiques et la taille du défaut à combler, ainsi que dans la nécessité d'un second site opératoire exposant à une morbidité plus importante pour le patient. Par ailleurs, la résorption de l'os autogène greffé est difficile à anticiper. Les principales sources d'os autogène sont les côtes, la crête iliaque, la scapula, la fibula, l'os pariétal, le ramus mandibulaire et la symphyse mandibulaire (25).

2.2.3. Les substituts osseux

2.2.3.1 L'allogreffe

L'allogreffe consiste à transplanter chez un sujet receveur de l'os d'un sujet donneur, appartenant tous deux à la même espèce. L'os allogénique peut provenir de donneurs vivants (prélèvement lors de chirurgies orthopédiques) ou être prélevé sur des cadavres. L'os allogénique présentant des risques de transmission virale et de rejet lié au contenu cellulaire et moléculaire du greffon, les prélèvements subissent des procédés industriels de déminéralisation, déprotéinisation et stérilisation qui aboutissent à l'obtention d'un substitut osseux qui n'est quasiment plus qu'ostéoconducteur (2,3). De l'absence de propriétés ostéogéniques de l'allogreffe découle une durée de régénération osseuse plus longue qu'avec l'utilisation d'une greffe d'os autogène. Les allogreffes conservent néanmoins les propriétés mécaniques du tissu osseux, favorisant ainsi la néo-angiogenèse et autorisant la colonisation du greffon par les cellules ostéogéniques (26). Elles présentent également l'avantage d'éviter un deuxième site de prélèvement sur le patient et d'ainsi diminuer la morbidité du geste opératoire. Néanmoins, en cas de taille trop importante du défaut à combler, l'os greffé ne se revascularise que faiblement et son remodelage reste faible (27). Les allogreffes sont considérées depuis 2016 comme des dispositifs médicaux.

2.2.3.2. La xénogreffe

La xénogreffe consiste à greffer chez un individu receveur un substitut osseux provenant d'une autre espèce, le plus souvent de l'os bovin ou porcin (3). Comme pour l'allogreffe, le greffon a subi des procédés industriels visant à éliminer ses composantes organique et cellulaire,

immunogènes, qui retentissent sur ses propriétés biologiques. L'os d'origine animale subit notamment un traitement thermique à haute température afin d'éliminer les risques de transmission d'encéphalopathie spongiforme bovine (28). Ces substituts osseux, comme les substituts allogéniques, ne sont donc plus qu'ostéoconducteurs et conservent leurs propriétés mécaniques et leur biocompatibilité. On les considère comme des hydroxyapatites biologiques et peuvent être utilisés en clinique seuls ou en association avec de l'os autogène ou d'autres substituts osseux. Ils peuvent être retrouvés sous forme de granules d'os spongieux ou associés à une phase organique de collagène porcin facilitant son utilisation clinique, sa malléabilité et son adaptation au défaut osseux (1) (Annexe 4). Tout comme les allogreffes, les substituts osseux xénogéniques sont considérés comme des dispositifs médicaux depuis 2009.

2.2.3.3. Les substituts osseux synthétiques

Ces substituts osseux peuvent être composés uniquement d'une phase minérale mimant celle de l'os (sels de calcium et bioverres) ou couplés à une phase organique (matériaux composites).

La famille des céramiques bioactives est la plus utilisée. Elles sont en majorité ostéoconductrices, disponibles en quantité illimitée, ne présentent pas d'antigénicité et n'entrainent pas de risque de transmission de pathogènes (1) (Annexe 4). Parmi les céramiques bioactives, on retrouve les sels de calcium et les bioverres. Les céramiques permettent l'établissement d'une connexion entre os et matériau grâce à la formation *in vivo* d'une couche d'apatite carbonatée.

Les phosphates de calcium sont des matériaux poreux généralement présentés sous forme de granulés qui sont fragiles et présentent une faible résistance mécanique, limitant leurs indications cliniques (29). Il peut s'agir soit d'hydroxyapatites de synthèse monophasées de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ avec un rapport Ca/P de 1,67, de phosphates tricalciques monophasés ou β-TCP de formule $Ca_3(PO_4)_2$ avec un rapport Ca/P de 1,5 ou de céramiques biphasées appelées phosphates de calcium biphasés (BCP) constituées d'une association de différents matériaux monophasés, notamment l'HA et le β-TCP (1). Cette dernière classe de céramique possède des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices (30).

Les sulfates de calcium, connus sous le nom de « plâtre de Paris » ont été parmi les premiers matériaux utilisés comme substituts osseux en chirurgie dès la fin du 19ème siècle (27). D'utilisation plutôt anecdotique en clinique, ces céramiques monophasées à base de calcium ostéoconducteurs sont très rapidement résorbées (1) (Annexe 4).

Les bioverres possèdent une composition chimique très similaire à celle du tissu osseux : silice, calcium, phosphate. Ils sont dépourvus de porosité et leur résorption est variable en fonction de leur teneur en minéraux. La résistance mécanique des bioverres est supérieure à celle des phosphates de calcium. Lorsqu'ils sont placés au contact du tissu osseux, leur dissolution entraîne la formation d'une couche de phosphate de calcium à leur surface qui favorise la régénération osseuse en stimulant la prolifération et la différenciation ostéogénique (31).

Les matériaux composites visent à se rapprocher de la composition du tissu osseux natif et de sa MEC en associant une phase organique à une phase minérale. Si la phase organique apporte une capacité d'ostéoinduction, ces matériaux composites, comme les céramiques, ne présentent que de faibles propriétés mécaniques. Il peut s'agir d'association d'HA, de β-TCP, ou de BCP avec des polymères naturels ou synthétiques tels que le collagène, la cellulose, l'acide hyaluronique, le polyéthylène glycol (PEG) ou le polyméthylméthacrylate (PMMA) (1) (Annexe 4). En revanche, l'ajout de la phase organique permet d'améliorer la mouillabilité et la malléabilité du biomatériau.

2.2.4. L'alternative : l'ingénierie tissulaire osseuse

Chaque option thérapeutique choisie par le clinicien, que ce soit la greffe d'os autogène ou l'utilisation de substituts osseux, présente donc des limites et ne peut répondre efficacement à toutes les situations cliniques, notamment les plus critiques (défaut osseux important, anatomie complexe ou contraintes mécaniques élevées). La limitation provient soit de la disponibilité de l'os autogène à greffer, de l'absence de revascularisation du greffon, ou de la faiblesse des propriétés bioactives ou biomécaniques du substitut osseux. Face à cette absence de solution idéale pour pallier les pertes de substance osseuses, la recherche d'un biomatériau idéal s'est tournée vers l'ingénierie tissulaire osseuse prévascularisée.

L'ingénierie tissulaire osseuse repose sur l'utilisation d'une triade (Figure 5) : un contingent cellulaire, une matrice ou « *scaffold* » constituant un biomatériau support des cellules, et l'ajout de molécules bioactives adjuvantes permettant la fonctionnalisation du substitut osseux.

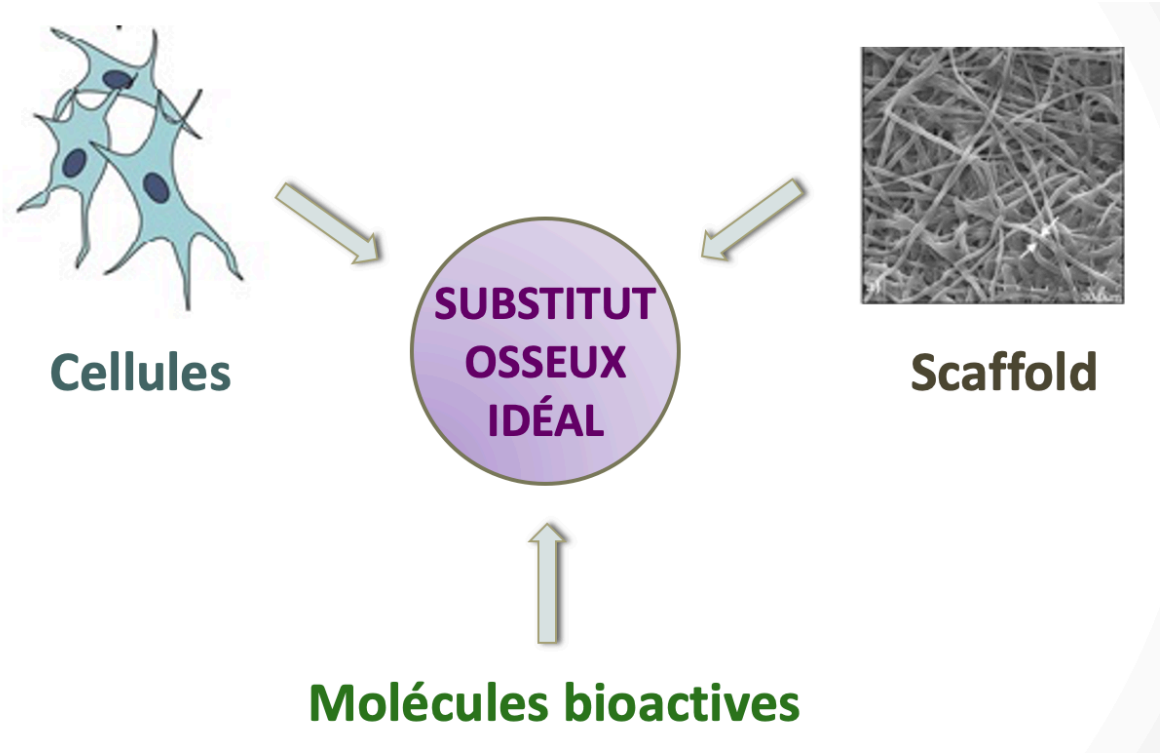


Figure 5 : principe de la triade utilisée en ingénierie tissulaire osseuse.

2.3. Le contingent cellulaire

Les cellules souches représentent une source cellulaire intéressante pour l'ingénierie tissulaire osseuse et la médecine régénérative plus généralement. En effet, contrairement aux cellules matures, elles possèdent non seulement des capacité d'autorenouvellement (multiplication cellulaire à l'infini et formation de clones quasiment identiques à la cellule initiale) et de différenciation dans différentes lignées mais également des propriétés immunomodulatrices (32–34).

2.3.1. Les cellules souches : généralités

Les cellules souches sont donc définies par leurs capacités d'autorenouvellement, de différenciation en de multiples lignées cellulaires et par leur capacité à former *in vivo* un tissu spécialisé fonctionnel (34). Les cellules souches peuvent être d'origine embryonnaire, fœtales ou adultes. Selon le type de cellules souches, elles ne sont pas toutes capables de se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme. On parle ainsi de cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes.

Les cellules totipotentes ont la capacité de constituer un organisme entier ainsi que les annexes embryonnaires : placenta et cordon ombilical. Ce sont les cellules embryonnaires qui sont produites lors des premières divisions du développement de l'embryon, du zygote (deux cellules) à la morula (30 cellules). A partir des stades suivants du développement embryonnaire, les cellules qui forment le blastocyste sont qualifiées de pluripotentes.
Les cellules pluripotentes peuvent donner naissance aux trois lignées germinales pouvant constituer tous les types cellulaires d'un organisme lors du développement embryonnaire : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme.
Les cellules unipotentes possèdent elles des capacités de différenciation limitées à un seul type cellulaire. Elles permettent d'assurer l'homéostasie des différents tissus de l'organisme et leur régénération en cas de lésion.
Les cellules multipotentes sont des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation d'un des trois feuillets embryonnaires : mésodermique, endodermique ou ectodermique. Elles sont présentes dans les tissus fœtaux ou adultes et peuvent se différencier par exemple en lignées hématopoïétiques médullaires (cellules souches hématopoïétiques (CSH)) ou en différentes lignées de tissus mésenchymateux dont l'os, le tissu adipeux, le cartilage ou le muscle (CSM) (32).

2.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

2.3.2.1. Généralités

Les CSM sont des cellules multipotentes qui peuvent être isolées à partir de plusieurs sources de l'organisme adulte ou fœtal : moelle osseuse (32), placenta (35), gelée de Wharton du cordon ombilical (36,37), tissu adipeux (38), membrane et liquide synovial (39,40), endomètre et sang menstruel (41) ou tissus dentaires (42) (ligament, pulpe) notamment.
En plus de leur capacité d'autorenouvellement, les CSM peuvent être définies par trois critères : (i) une capacité d'adhésion au plastique, (ii) une capacité de différenciation à minima vers les lignées chondrogéniques, ostéogéniques et adipogéniques, (iii) l'expression de marqueurs de surface CD73, CD90, CD105, et l'absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques CD 34, CD45 et HLA de classe II (HLA-DR) (Tableau 5) (43).

MARQUEURS	EXPRESSION	FONCTION
CD73	>95%	Ecto-5'-nucléotidase
CD90	>95%	Glycoprotéine de surface THY1
CD105	>95%	Récepteur du TGF-β : endogline
CD34	<5%	Protéine de surface (progéniteurs hématopoïetiques primitifs)
CD45	<5%	Tyrosine phosphatase (signalisation cellulaire)
HLA-DR	<5%	Complexe majeur d'histocompatibilité II

Tableau 5 : principaux marqueurs de surface cellulaire des CSM (d'après (43)).

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé des CSM issues des tissus dentaires : les CSM pulpaires. En effet, celles-ci présentent de nombreux avantages que nous allons développer ci-après.

2.3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine dentaire

Les CSM d'origine dentaire constituent un des axes principaux sur lequel s'est basé notre travail. La cavité orale et les tissus dentaires abritent plusieurs sources de CSM (44). Parmi elles, sont retrouvées les cellules souches mésenchymateuses du follicule dentaire (CSM-FD ou *Dental Follicle Progenitors Cells* : DFPC), du ligament parodontal (CSM-LP ou *Periodontal Ligament Stem Cells* : PDLSC), de la papille apicale (CSM-PA ou *Stem Cells from the Apical Papilla* : SCAP), des dents déciduales exfoliées (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* : SHED) ou de la pulpe dentaire (CSM-PD ou *Dental Pulp Stem Cells* : DPSC) (Figure 6). Parmi ces types cellulaires, les CSM-PD sont les plus utilisées en recherche et en ingénierie tissulaire (45).

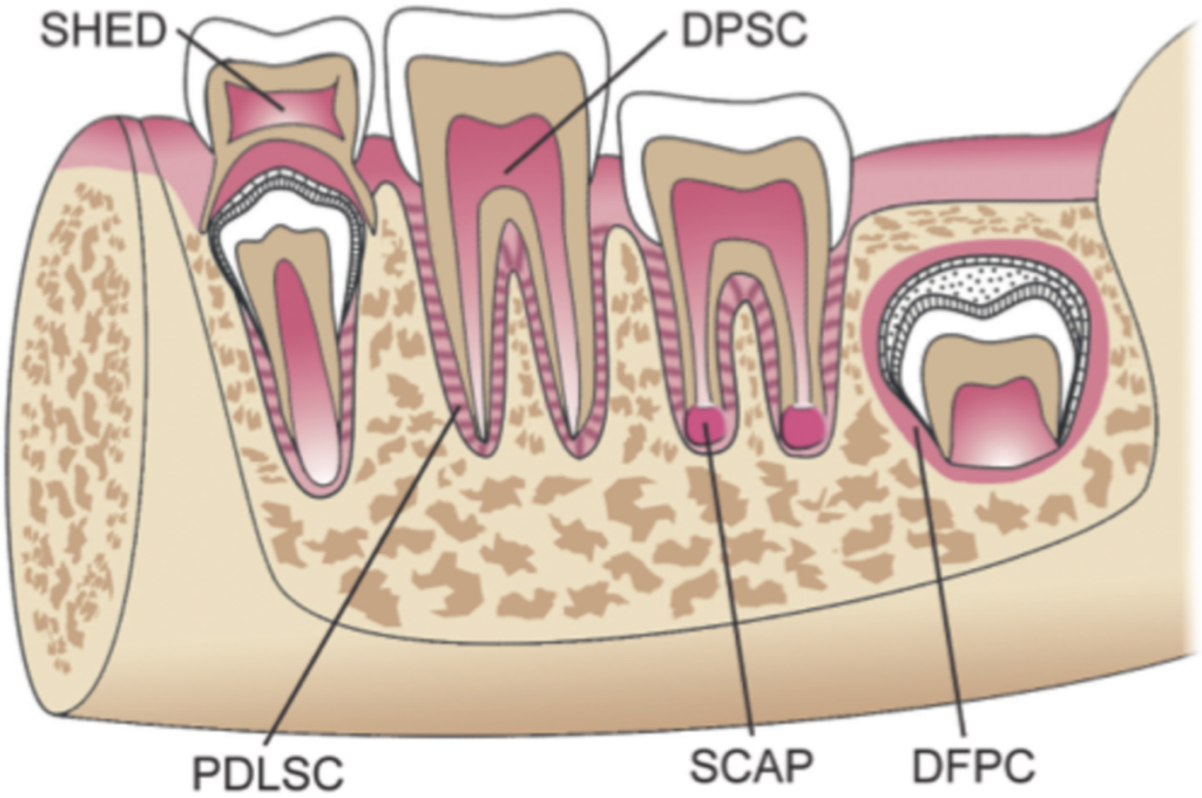


Figure 6 : les différentes sources de cellules souches mésenchymateuses dentaires (46) (SHED : *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*, DPSC : *Dental Pulp Stem Cells*, PDLSC : *Periodontal Ligament Stem Cells*, SCAP : *Stem Cells from the Apical Papilla*, DFPC : *Dental Follicle Progenitor Cells*).

2.3.2.3. Les cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD)

La pulpe dentaire est un tissu conjonctif non minéralisé, vascularisé et innervé contenu dans la cavité pulpaire des dents et communiquant avec le tissu de soutien parodontal via le foramen apical (Figure 7).

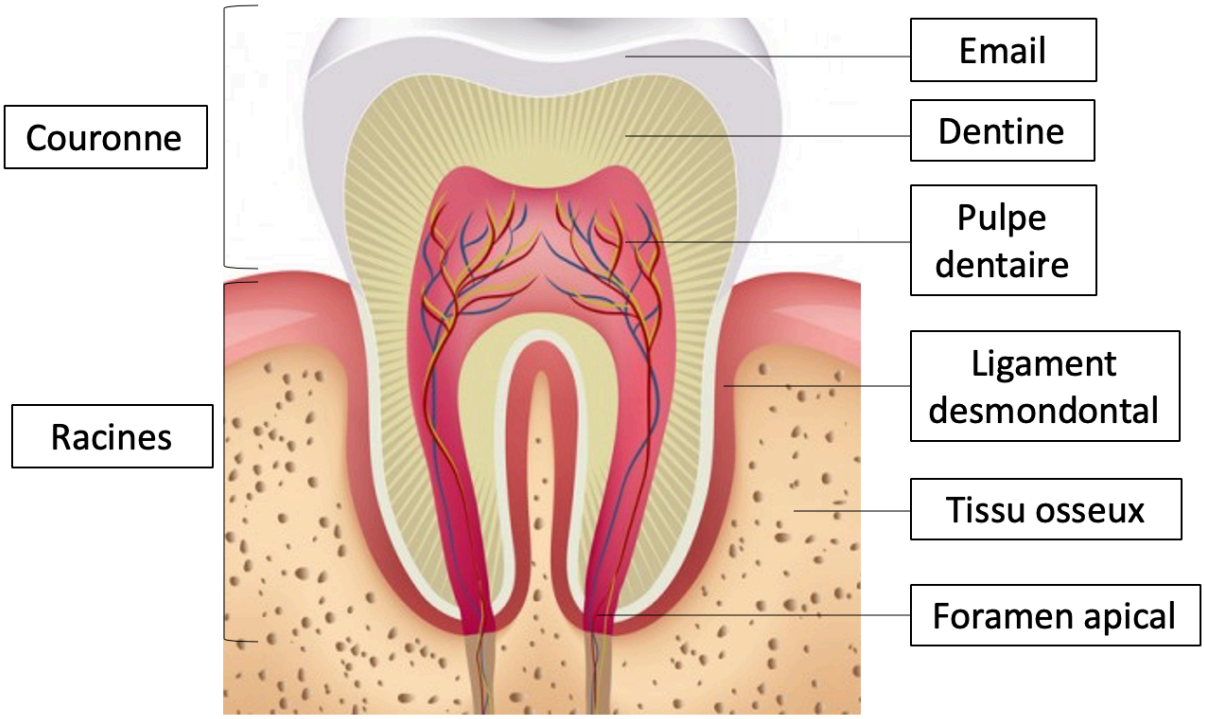


Figure 7 : anatomie de la dent.

La pulpe dentaire contient plusieurs types cellulaires dont des neurones, des fibroblastes, des CE, des odontoblastes et des CSM indifférenciées localisées dans des niches cellulaires périvasculaires (47–49).
Les CSM-PD dérivent des cellules des crêtes neurales et ont été isolées en 2000 par l'équipe de Gronthos (50). Chaque pulpe dentaire contient environ un million de CSM-PD et est facilement accessible lors de gestes dentaires chirurgicaux de routine.

Les CSM-PD peuvent être isolées du tissu pulpaire par digestion enzymatique ou par la technique mécanique des explants (51) (Figure 8). Ces deux techniques ont été largement décrites et utilisées avec succès dans la littérature pour isoler les CSM-PD (50,52) mais également les CSM issues du tissu adipeux (CSM-TA) (38,53) et du cordon ombilical (CSM-CO) (54,55). La technique de digestion enzymatique consiste à appliquer au contact du tissu pulpaire deux enzymes, la dispase et la collagénase, afin de le digérer. Ces deux enzymes vont permettre de dégrader la MEC du tissu et d'isoler les CSM pulpaires qui y sont contenues (52). La méthode des explants est basée à la fois sur l'aptitude des CSM-PD à adhérer au plastique et sur leur capacité à proliférer à partir de fragments du tissu pulpaire (51). Ainsi, la fragmentation mécanique de la pulpe dentaire en pièces d'environ 1 mm^3 puis leur mise en culture permet d'isoler les CSM-PD et facilite leur croissance hors des explants. La méthode

d'isolement choisie doit permettre à la fois de conserver le caractère « souche » des cellules obtenues ; notamment de préserver leurs capacités d'autorenouvellement et à s'engager dans différentes lignées de différenciation. Si des études comparatives de ces deux techniques ont montré une efficience similaire en termes de différenciation odontoblastique et ostéogénique des CSM-PD (52,56), les travaux de Hilkens ont également permis de démontrer que les deux techniques permettent d'obtenir un taux de prolifération des CSM-PD similaire et un maintien de leur phénotype de cellules souches (51). Néanmoins, des travaux récents montrent qu'isoler les CSM-PD par la technique des explants semble présenter plusieurs avantages par rapport à la technique digestion enzymatique. La présence du tissu pulpaire originel lors de la mise en culture initiale fournit aux cellules non seulement un support matriciel physique aux cellules, mais également un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines permettant à la fois de réduire le stress cellulaire de la culture primaire, mais aussi de stimuler la croissance et la prolifération cellulaire (57). Ainsi, la présence de *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), FGF, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) et TGF-ß a été mise en évidence dans le tissu pulpaire (58). De plus, la méthode des explants permet d'éviter le stress protéolytique de la digestion enzymatique pour les cellules, diminue le risque de contamination biologique et, bien que plus long, est plus économique (57). Dans notre travail, nous avons donc choisi de privilégier cette technique d'isolement.

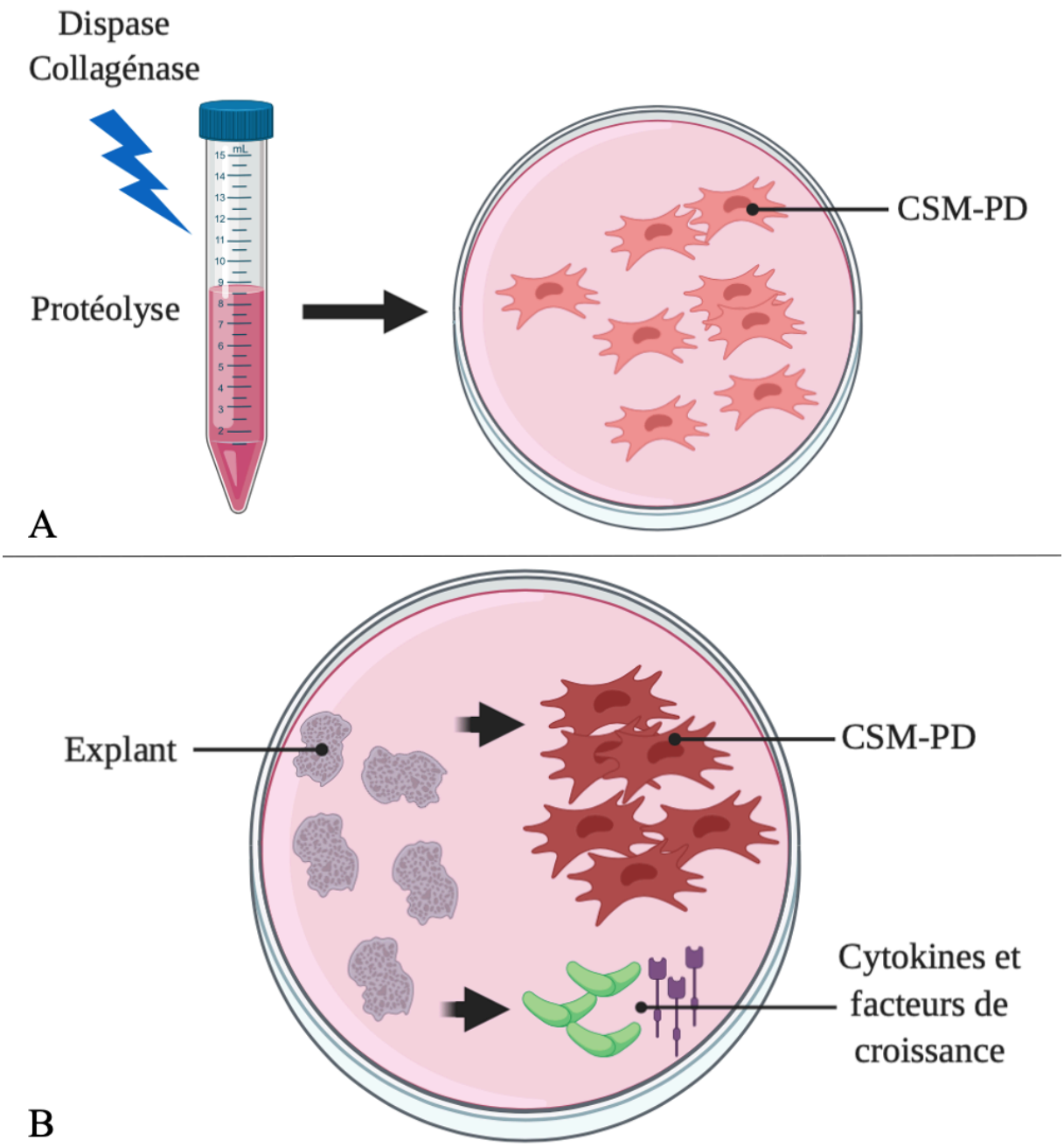


Figure 8 : techniques d'isolement des CSM-PD. A : technique de digestion enzymatique, B : technique des explants.

Les CSM-PD sont caractérisées par un ensemble de marqueurs phénotypiques de surface, exprimant ainsi positivement des clusters de différenciation (CD) incluant CD29, CD44, CD 73, CD90, CD105, CD146 et CD166 et n'exprimant pas les marqueurs hématopoïétiques HLA-DR, CD34 et CD45 (42,47). Leur caractérisation phénotypique a toutefois permis de déterminer que les CSM-PD sont en fait constituées par une population cellulaire hétérogène et des sous types de population au phénotype différent (47). Les marqueurs de surface exprimés par les

CSM-PD sont plus variés et nombreux que ceux retrouvés sur d'autres types de CSM comme celles de la moelle osseuse, avec notamment des marqueurs neuronaux, probablement liés à leur origine ectodermique (papille ectomésenchymateuse). Les marqueurs de surface exprimés positivement par les CSM-PD peuvent être retrouvés dans le tableau 6, la fonction de ces marqueurs dans le tableau 7, et les marqueurs exprimés négativement par les CSM-PD dans le tableau 8.

Marqueurs définis par l'ISCT	**Marqueurs mésenchymateux**	**Marqueurs « souche »**	**Marqueurs neuronaux**	**Autres**
CD73	CD13	OCT3/4	Nestine	CD40
CD90	CD29	SSEA4	ß-III tubuline	CD120a
CD105	CD44	NANOG	S100	CD261
	CD146		Notch1	CD262
	CD166		CD271	CD264
			Synaptophysine	CD266
				Intégrines alpha-4, 6 et 10
				CD121a
				CD130
				CD213a1
				CD217
				CDw210b

Tableau 6 : principaux marqueurs de surface cellulaire exprimés par les CSM-PD (d'après (42,47)). ISCT : *International Society for Cellular Therapy*.

MARQUEUR	FONCTION
CD13	Aminopeptidase N
CD29	Intégrine béta-1
CD44	Glycoprotéine membranaire
CD73	Ecto-5'-nucléotidase
CD90	Glycoprotéine de surface THY1
CD105	Endogline
CD146	Molécule d'adhésion cellules mélanocytaires
CD166	Molécule d'adhésion cellulaire des leucocytes activés
CD271	Récepteur à la neurotrophine
OCT3/4	Octamer binding transcription factor-3/4
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen 4
NANOG	Facteur de transcription homéoboite
S100	Protéine de liaison du calcium
Notch1	Récepteur transmembranaire
CD40, CD120a, CD261, CD262, CD264, CD266	Protéines de la superfamille des récepteurs du *Tumor Necrosis Factor* (TNF)
CD121a, CD130, CD213a, CD217, CDw210b	Récepteurs des interleukines (IL)

Tableau 7 : fonctions des marqueurs cellulaires exprimés par les CSM-PD (d'après (42,47)).

MARQUEUR	FONCTION
CD14	Glycoprotéine du système immunitaire inné
CD31	Protéine d'adhésion des cellules endothéliales (ou PECAM1 : P*latelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)*
CD34	Antigène des cellules progénitrices hématopoïétiques
CD45	Protéine tyrosine phosphatase, récepteur otype C
CD79a	Antigène, récepteur des lymphocytes B
CD117	Récepteur du facteur de croissance des cellules souches mésenchymateuses
CD133	Prominine 1
HLA-DR	Complexe majeur d'histocompatibilité II

Tableau 8 : marqueurs de surface exprimés négativement par les CSM-PD (d'après (42,47)).

Les CSM-PD possèdent des propriétés immunomodulatrices et immunosuppressives (59). Elles auraient ainsi la capacité d'induire *in vitro* l'apoptose des lymphocytes T (LT) activés et de réduire *in vivo* les dégâts tissulaires engendrés par l'inflammation chronique dont ils sont un des acteurs majeurs (60). D'autres travaux ont démontré que les CSM-PD peuvent inhiber la prolifération des LT et pourraient donc être utilisées après transplantation d'organe ou de moelle hématopoïétique afin de diminuer l'allo-réactivité des LT et ainsi prévenir le phénomène de rejet qu'ils entrainent (61). Si les mécanismes exacts de l'immunomodulation par les CSM-PD ne sont pas totalement élucidés, des travaux ont mis en lumière le rôle majeur joué par des facteurs solubles sécrétés par les cellules, dont le TGF-ß, l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) ou l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (62). Les propriétés immunomodulatrices des CSM-PD et leur faible immunogénicité font d'elles d'excellents candidats utiles dans le cadre de thérapies de transplantation allogénique.

Les CSM-PD de par leur origine embryologique, peuvent s'engager dans les lignées de différenciation mésodermique (CE, adipocytes, odontoblastes, ostéoblastes, chondrocytes), ectodermique (neurones) et endodermique (systèmes digestif et respiratoire) (44) (Figure 9).

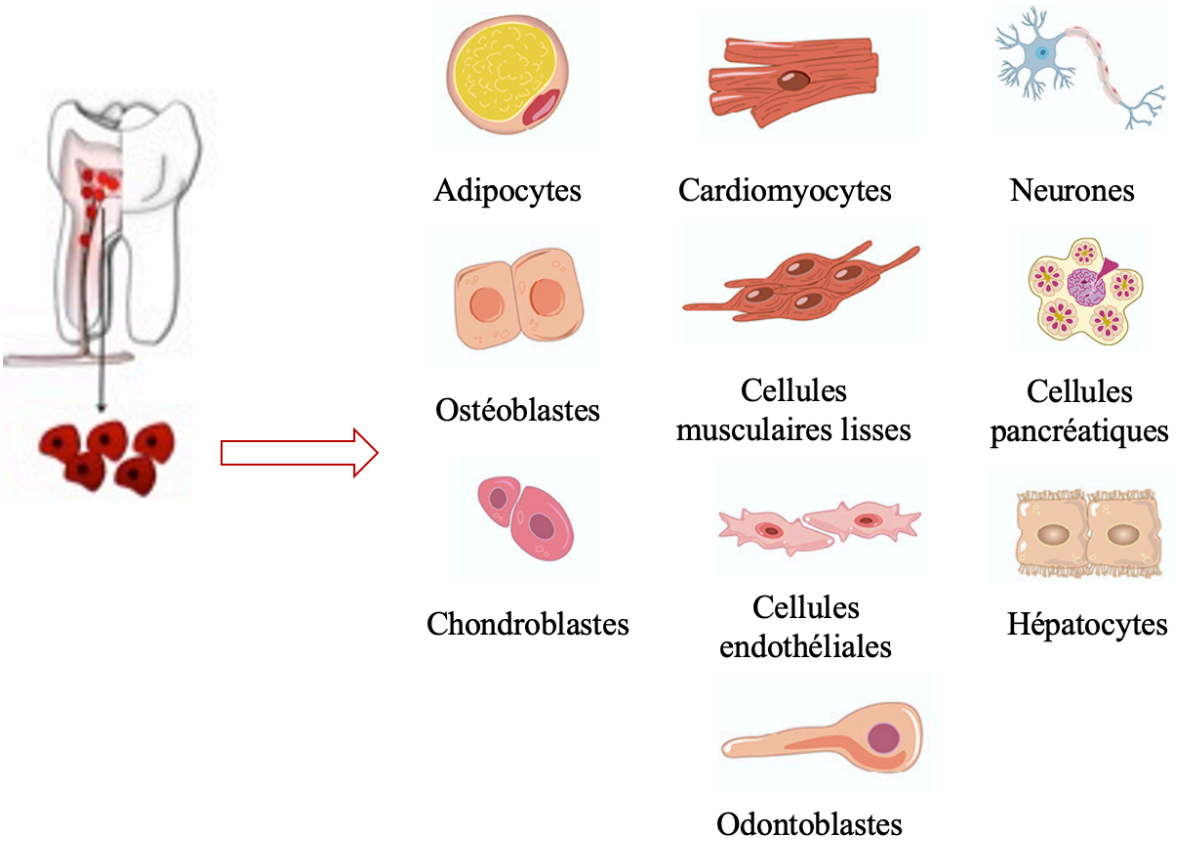


Figure 9 : potentiel de différenciation des CSM-PD.

La différenciation en lignées cellulaires adipogéniques des CSM-PD peut être induite par l'ajout au milieu de culture d'insuline, de dexaméthasone, de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et d'indométacine (63–65). L'adipogénèse est généralement objectivée par la coloration au Oil Red O et le phénotype adipocytaire des cellules confirmé par l'expression de marqueurs comme la *fatty acid bingind protein 4*, la lipoprotéine lipase, le *peroxisome proliferator-activated receptor γ* ou le glucose transporteur de type 4 (65,66).

Les CSM-PD peuvent s'engager dans la voie de différenciation chondrogénique sous l'induction de cocktails de différenciation composés d'insuline, transferrine, sélénium, dexaméthasone, acide ascorbique, proline et pyruvate de sodium (51,67). Les CSM-PD engagées dans cette voie expriment des protéines spécifiques : agrécanes, SOX9 et collagène de type II et X (63,67). La différenciation chondrogénique peut être mise en évidence par les colorations au bleu alcian, à la safranine O et au bleu de toluidine (42).

La différenciation odontogénique est une des capacités premières des CSM-PD, et a été démontrée par Gronthos dès les années 2000 (50). D'autre travaux ont par la suite confirmé ces résultats, obtenant des cellules odontoblastiques après ensemencement de CSM-PD sur une

surface dentinaire *in vitro* (68). L'engagement dans la lignée odontogénique peut être mis en évidence par l'analyse de l'expression de marqueurs dentinogéniques et odontogéniques comme la *dentine sialophosphoprotein* (DSP), la d*entine matrix phosphoprotein 1* (DMP1) et la *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE) (69). Ce potentiel a été par la suite largement étudié afin de l'appliquer à la régénération des tissus dentaires, la maladie carieuse à l'origine de la destruction de ces tissus représentant une des pathologies les plus répandues dans le monde (70). La recherche en dentisterie régénérative s'est notamment appliquée à combiner les CSM-PD à différentes matrices afin d'optimiser la régénération tissulaire dentaire (71). Les CSM-PD ont ainsi été combinées à des matrices nanofibreuses de poly(l-acide lactique) (PLA) (72), de poly (ε-caprolactone/gélatine) (73), à des hydrogels (74,75) et à des structures composées de fibres d'acide hyaluronique (76), *in vitro* (72–76) et *in vivo* (72,73). Yang *et al* (73) ont par ailleurs démontré que l'ajout d'HA à la matrice de poly (ε-caprolactone/gélatine) permettait de promouvoir la différenciation odontoblastique des CSM-PD *in vivo*.

La plasticité des CSM-PD autorise également leur différenciation vers d'autres lignées.

Les CSM-PD sécrètent de multiples facteurs impliqués dans l'angiogenèse ; il a ainsi été démontré que leur sécrétome contient notamment du VEGF, du *Colony-Stimulating Factor* (CSF), du *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), de l'endothéline, de l'angiopoïétine, de l'angiogénine et de l'*urokinase-type plasminogen activator* (77,78). Sous l'induction du VEGF, les CSM-PD peuvent se différencier en CE et présenter une organisation en structures capillaires tubulaires (79). Les CSM-PD ont aussi démontré *in vitro* leurs propriétés d'induction paracrine de la migration endothéliale et de la formation tubulaire vasculaire (80). Ces mêmes effets ont été démontré *in ovo* dans un modèle de membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet, les CSM-PD y augmentant significativement la croissance vasculaire (77,78). Les CSM-PD ayant donc la capacité de promouvoir l'angiogenèse et la vasculogénèse, elles ont reçu un intérêt croissant en médecine régénérative pour réduire les conséquences de l'ischémie liée aux pathologies thromboemboliques (81,82) ou pour la régénération pulpaire (80,83).

Les CSM-PD ont aussi été utilisées avec succès dans la reconstruction cornéenne *in vitro* grâce à leur capacité de se différencier en cellules du limbe de la cornée (84), résultats confirmés *in vivo* dans un modèle animal (lapin) de dégénérescence cornéenne (85).

Enfin, des travaux ont montré leur capacité de différenciation en cardiomyocytes (86) et en cellules musculaires lisses (87).

Dérivées des crêtes neurales, les CSM-PD peuvent également se différencier en cellules de la lignée neurale comme les cellules neuronales, les neurones dopaminergiques, les

oligodendrocytes et les cellules de Schwann (88–91), et présentent un intérêt majeur en médecine régénérative pour traiter les pathologies neurodégénératives et les atteintes nerveuses (42). Les protocoles de culture utilisés pour induire une différenciation neurale diffèrent et impliquent l'ajout de multiples facteurs : EGF, FGF, *Nerve Growth Factor* (NGF), acide rétinoïque, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), forskoline, *sonic hedgehog*, adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ou neurotrophine-3 (NT-3) (86,92–94). La différenciation en cellules de la lignée neurale peut être objectivée par l'expression de marqueurs neuronaux comme la molécule d'adhésion cellulaire neurale, la synapsine I, la protéine gliale fibrillaire, la *growth associated protein 43*, la *neuron specific class III B-tubulin*, la protéine myélinique, la *microtubule associated protein 2*, la *neuronal differentiation 1* ou la *paired box protein 6* (89,91,93,94). Il a ainsi été démontré que les CSM-PD sont capables d'acquérir *in vitro* et *in vivo* un phénotype neuronal fonctionnel (95) et les CSM-PD ont été utilisées avec succès dans des modèles animaux pour traiter des pathologies neurodégénératives ou réparer des atteintes nerveuses (96–100). Ainsi, l'utilisation de CSM-PD a montré son efficacité dans le traitement de la maladie de Parkinson (97,98) ou d'Alzheimer (98) ainsi que dans la récupération nerveuse dans des modèles animaux de lésions nerveuses corticales centrales (73,97,100) ou périphériques (99,100).

Les CSM-PD ont également démontré leur potentiel de différenciation *in vitro* en cellules similaires aux cellules des îlots pancréatiques, capables d'exprimer des marqueurs pancréatiques spécifiques et de sécréter de l'insuline (101,102). Ces travaux permettent d'envisager l'utilisation des CSM-PD dans le traitement du diabète.

Elles présentent également des capacités de différenciation en lignée hépatocytaire ; des travaux ont permis de démontrer *in vitro* l'expression de marqueurs hépatocytaires spécifiques par les CSM-PD (103,104). Ces résultats ont été obtenus sur des CSM-PD isolées à partir de troisièmes molaires (103) ou d'autres dents définitives (104), mises en culture avec des agents de différenciation hépatocytaires (oncostatine, dexaméthasone, HGF).

Ces larges capacités de différenciation ont permis aux CSM-PD d'être utilisées *in vitro* et *in vivo* dans un vaste champ d'application en médecine régénérative comme illustré en figure 10.

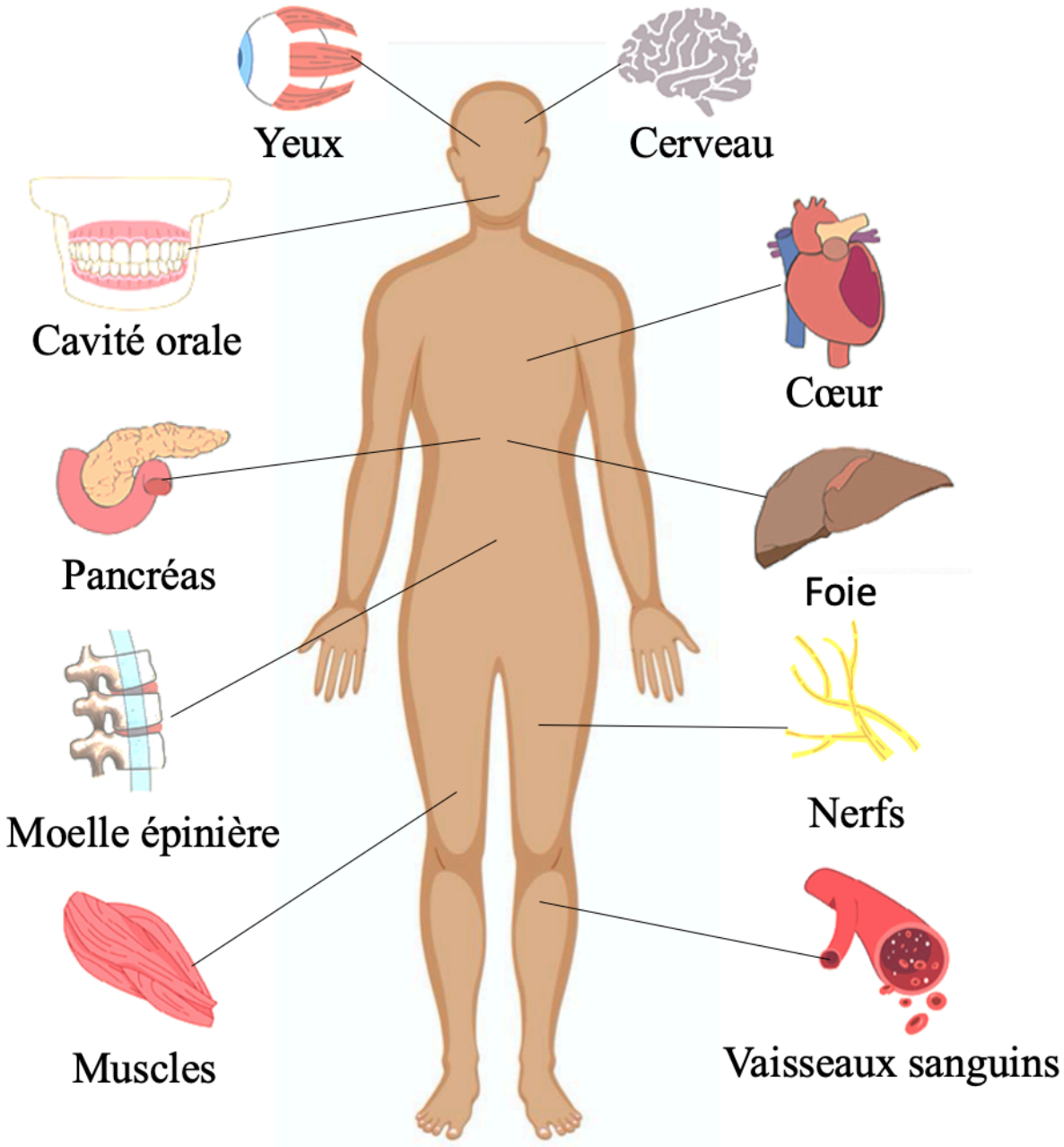


Figure 10 : champs d'application des thérapies de médecine régénérative utilisant les CSM-PD (d'après (42)).

Dans le cadre de leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse, les CSM-PD ont démontré leur capacité de différenciation ostéogénique en ostéoblastes *in vitro* après induction par l'ajout dans le milieu de culture de dexaméthasone, acide ascorbique et β-glycérophosphate (105,106), *in vivo* chez le petit animal (107–109) et chez l'homme dans la réparation de défauts mandibulaires (110). Elles ont également démontré leur capacité à sécréter une MEC osseuse et de l'os fibrillaire (111).

Enfin, il a été démontré que les CSM-PD peuvent être combinées efficacement à de nombreuses matrices utilisables pour l'implantation *in vivo* en ingénierie tissulaire osseuse (48).

Les CSM-PD ont également la faculté de bien supporter la cryoconservation. Des travaux ont démontré que même après plusieurs mois et jusqu'à plusieurs années, elles conservent leur propriétés morphologiques et fonctionnelles ainsi que leur capacité de différenciation ostéogénique (48). De plus, les CSM-PD après cryoconservation expriment les mêmes marqueurs de surface, confirmant ainsi leur intégrité cellulaire et phénotypique (112,113). Cette faculté permet de disposer de CSM-PD viables et fonctionnelles pour des applications cliniques futures, là où nous savons que ces cellules présentent une réduction de leur potentiel « souche » évoluant en parallèle avec l'augmentation de l'âge du donneur. Il est donc possible d'isoler les CSM-PD lors d'actes chirurgicaux de routine chez les donneurs jeunes puis de stocker ces CSM en constituant des bio-banques, de façon pérenne, sans altérer leurs propriétés.

Comparativement aux CSM-MO classiquement considérées comme le *gold standard*, les CSM-PD présentent comme nous l'avons vu l'avantage d'être obtenues sans procédure invasive et de pouvoir être obtenues en très grand nombre à partir de chaque prélèvement. De plus, les CSM-PD semblent maintenir leur propriété « souches » après de nombreux passages *in vitro*, contrairement aux CSM-MO (114).

Il a aussi été démontré *in vitro* que les CSM-PD présentent une cinétique de croissance plus rapide (61) et un degré de prolifération plus important (61,115,116) que les CSM-MO. L'analyse en cytométrie en flux du cycle cellulaire de ces deux types de CSM (passage trois) a montré que les CSM-PD s'engageaient principalement en mitose (phase G2/M), alors que les CSM-MO présentaient majoritairement un arrêt du cycle cellulaire (phase G0/G1) (116).

Si ces deux types de CSM déploient des propriétés immunosuppressives en particulier sur la réponse immunitaire cellulaire des LT, ces propriétés semblent plus importantes pour les CSM-PD que pour les CSM-MO. Ainsi, des travaux ont démontré que les CSM-PD peuvent entrainer *in vitro* une suppression de la réponse cellulaire des LT de 95% *vs* 75% pour les CSM-MO, et une diminution de l'activité de ces LT de 25% pour les CSM-MO contre 9% pour les CSM-PD (61).

Les capacités de différenciation des CSM-PD diffèrent également de celles des CSM-MO (44,117–123). Si ces deux types cellulaires sont capables de s'engager dans les lignées de différenciation adipogéniques, chondrogéniques et ostéogéniques, certaines études ont démontré un potentiel de différenciation ostéogénique plus élevé pour les CSM-PD *in vitro*

(117,119), avec notamment un taux de marqueurs de différenciation ostéogénique comme l'ALP plus élevé après trois semaines de culture pour les CSM-PD (117). D'autres travaux réalisés *in vivo* ont démontré des capacités similaires de régénération osseuse de ces deux lignées cellulaires dans des modèles de défauts de calvaria chez la souris (118). Les CSM-PD semblent également posséder des capacités de différenciation plus importantes que les CSM-MO dans les lignées neurales et épithéliales, probablement dues à leur origine embryologique (123). Le potentiel de régénération tissulaire odontogénique semble lui aussi plus marqué pour les CSM-PD, avec l'obtention de structure ostéo-dentinaires et amélaires *in vivo*, là ou uniquement des complexes pulpo-dentinaires atypiques sans formations amélaires ont été obtenus avec les CSM-MO (122). Enfin, la capacité de différenciation endothéliale des CSM-PD semble également plus importante que celle des CSM-MO. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'ischémie murin que les CSM-PD pouvaient promouvoir l'angiogenèse de façon plus importante que les CSM-MO, avec un plus grand nombre de cellules positives pour les marqueurs endothéliaux (facteur de von Willebrand) et une réduction plus importante de l'ischémie dans le groupe CSM-PD (120). D'autres travaux ont également démontré *in vivo,* dans un modèle de traumatisme thermique chez le rat, que l'obtention d'une néovascularisation était plus importante avec les CSM-PD qu'avec les CSM-MO (124).

A l'inverse, il semble que le potentiel de différenciation adipogénique des CSM-PD soit plus faible que celui des CSM-MO *in vitro* (119).

Ces différences pourraient être expliquées par le profil d'expression différent des gènes de pluripotence, cytokines et facteurs de croissance exprimés et sécrétés par ces deux types de CSM (115,121,123). *In vitro*, les CSM-PD et les CSM-MO mises en culture dans les mêmes conditions expriment des différences dans l'expression de gènes de pluripotence, avec une régulation positive significativement plus importante de Sox2 et E-cadhérine, et une régulation négative de Sox 17, Oct 3-4 et Snail significativement plus faible pour les CSM-PD comparativement aux CSM-MO (115). Ces différences d'expression génique semblent favoriser les capacités de régénération cellulaire des CSM-PD, via le maintien 1) du mésoderme embryonnaire, de la survie et migration cellulaire (E-cadhérine, Snail) et 2) du phénotype souche au sein du système nerveux et des capacités de différenciation neuronale des CSM-PD (Oct3-4, Sox 2 et 17). Les CSM-PD présentent également une régulation positive de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules β-pancréatiques (PDX-1/IPF-1) (115). La caractérisation des cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les CSM-PD et CSM-MO a également permis de mettre en évidence une expression plus importante par les CSM-PD de facteurs impliqués dans la régénération tissulaire comme VEGF (123), TGF-β,

IGF, PDGF, *Inter Cellular Adhesion Molecule-3* (ICAM-3), *Matrix MetalloProteinase-3* (MMP-3) (121,123), ainsi que des facteurs de croissance impliquées dans la différenciation ostéogénique et la formation du tissu osseux comme BMP 2 (123), 7 (121) et 4 (125).
Les CSM-PD semblent ainsi présenter des qualités et une supériorité intéressantes par rapport aux CSM-MO en médecine régénérative et plus particulièrement en ingénierie osseuse, en plus d'être obtenues de façon non invasive lors de gestes de dentisterie de routine.

2.4. Les matrices en ingénierie tissulaire osseuse

2.4.1. Généralités

L'utilisation des matrices en ingénierie tissulaire osseuse vise à recréer un microenvironnement tridimensionnel optimal et des conditions physico-chimiques locales autorisant la survie, la prolifération, la communication et la différenciation cellulaire en leur sein. Elles doivent permettre de promouvoir non seulement une interaction favorable entre cellules et biomatériau, mais aussi la synthèse par ces cellules d'une nouvelle MEC et pour cela, assurer une diffusion suffisante des nutriments et facteurs de croissance nécessaires au métabolisme cellulaire. La matrice doit ainsi permettre une implantation locale des cellules dans un environnement favorable et le plus similaire possible au tissu à recréer, pour favoriser la régénération tissulaire (126). Le produit d'ingénierie tissulaire obtenu doit donc être biocompatible, posséder idéalement des capacités d'ostéoconduction, d'ostéoinduction et d'ostéogénèse, des propriétés mécaniques adéquates, et n'induire qu'un degré minime d'inflammation ou de toxicité *in vivo* (127).
Les CSM ont été ensemencées dans de nombreux types de biomatériaux afin d'optimiser la régénération osseuse, qu'il s'agisse de substituts osseux classiquement utilisés seuls en clinique (HA biologique, TCP), de biomatériaux d'ingénierie tissulaire sous forme de polymères synthétiques (polycaprolactone, PEG, acide polyglycolique (PGA), PLA, acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA)), de polymères ou de fibres naturelles (alginate, élastine, membrane amniotique, chitosan, soie, collagène, gélatine, acide hyaluronique), ou d'hydrogels (gels de polymères naturels ou synthétiques enrichis ou non en particules minérales ou en nanoparticules) (42,128).
In vitro, les CSM-PD ont été utilisées combinées à des biomatrices à base de fibrine (129), de PLGA (130), d'éponge de collagène (131), d'hydrogels peptidiques ou de polyéthylène glycol di acrylate (PEGDA)/acide hyaluronique/gélatine (132,133), de

chitosan/collagène/calcium/aluminate (134), d'HA/collagène/PLA (108) et de chitosan/alcool polyvinylique (PVA) (135) (Tableau 9).

Différentes matrices ont été utilisée en ingénierie tissulaire osseuse *in vivo* pour l'ensemencement des CSM-PD. Dans la littérature, les matrices les plus utilisées sont celles à base de collagène (64,110,136–141) et d'HA/TCP (113,142–151). Parmi les autres matrices utilisées, on retrouve des matrices à base d'HA (152–157) ou de β-TCP seuls (158–162), de BCP (163,164), des membranes de PLGA (165–167), des substituts osseux xénogéniques (159,160) et plus rarement des matrices de PGA (168), de calcium/phosphate (169), de gélatine, de soie (170), de poly ε-caprolactone (109), des hydrogels (171) ou des bioverres (172) (Tableau 9).

La régénération osseuse a été obtenue *in vivo* dans des modèles murins (64,113,136,138,139,142–147,149–160,163–167,169–175), de lapin (109), de cochon d'inde (148,161), de chien (141) ou chez l'homme (110,137,140,162) en site ectopique (142,144–146,149,150,153–155,157,158,163–166,168,169,171,174) ou dans des défauts osseux crâniaux (64,136,138,143,170) et notamment de calvaria (109,113,147,151,152,156,159,160,167,175), mandibulaires (110,137,139–141,161) et parodontaux (148,162).

UTILISATION	TYPE DE MATRICE	RÉFÉRENCE
In vitro	Éponge de collagène	Riccio *et al* (131)
	Fibrine	Pecci-Lloret *et al* (129)
	Hydrogels -peptidique - PEGDA/acide hyaluronique/gélatine	Jones *et al* (132) Tsukamoto *et al* (133)
	Chitosan/collagène/calcium/aluminate	Soares *et al* (134)
	Chitosan/PVA	Ghasemi Hamidabadi *et al* (135)
	PLGA	Bhuptani *et al* (130)
	HA/collagène/PLA	Ling *et al* (108)
In vivo	HA	Abe *et al* (153) Abe *et al* (154) Bressan *et al* (152) Hilkens *et al* (157) Ikeda *et al* (155) Morito *et al* (169) Petridis *et al* (156)

	β-TCP	Annibali *et al* (159) Annibali *et al* (160) Kawanabe *et al* (158) Kuo *et al* (161) Li *et al* (162) Ling *et al* (108)
	HA/TCP (BCP)	Asutay *et al* (147) Cao *et al* (148) Chen *et al* (142) Jeon *et al* (164) Kang *et al* (150) Kim *et al* (163) Kraft *et al* (146) Ma *et al* (113) Miura *et al* (143) Otaki *et al* (144) Qian *et al* (149) Seo *et al* (151) Zhang *et al* (145)
	Bioverre	El-Gendy *et al* (172)
	Collagène	Behnia *et al* (141) Chamieh *et al* (107) d'Aquino *et al* (137) de Mendonça Costa *et al* (136) Giuliani *et al* (110) Jahanbin *et al* (139) Maraldi *et al* (138) Monti *et al* (140) Niu *et al* (174)
	Gélatine	Riccio *et al* (170)
	Hydrogel de méthoxy-polyéthylène-glycol- poly ε-caprolactone et tampon phospate	Jang *et al* (171)
	Soie	Riccio *et al* (170)
	PLGA	Acasigua *et al* (167) Graziano et al (165) Graziano et al (166)
	PGA	d'Aquino *et al* (168)
	Poly ε-caprolactone	Wongsupa *et al* (109)
	HA/collagène/PLA	Ling *et al* (108)

Tableau 9 : matrices utilisées pour l'ensemencement des CSM-PD *in vitro* et *in vivo*.

Combiner des polymères naturels ou synthétiques à une phase minérale ou à des biomatériaux synthétiques permet d'améliorer les propriétés biologiques et biomécaniques du produit d'ingénierie tissulaire osseuse et de mieux contrôler sa dégradation (176).

2.4.2. L'utilisation des matrices de collagène en ingénierie tissulaire osseuse

Comme nous l'avons décrit, le principal constituant de la matrice organique du tissu osseux est le collagène de type I dont la synthèse est une des principales fonctions des ostéoblastes. Dans la matrice osseuse native, les molécules fibrillaires de collagène présentent à leur surface la précipitation des composés minéraux (calcium et phosphate) et la minéralisation de la MEC synthétisée par les ostéoblastes (177).

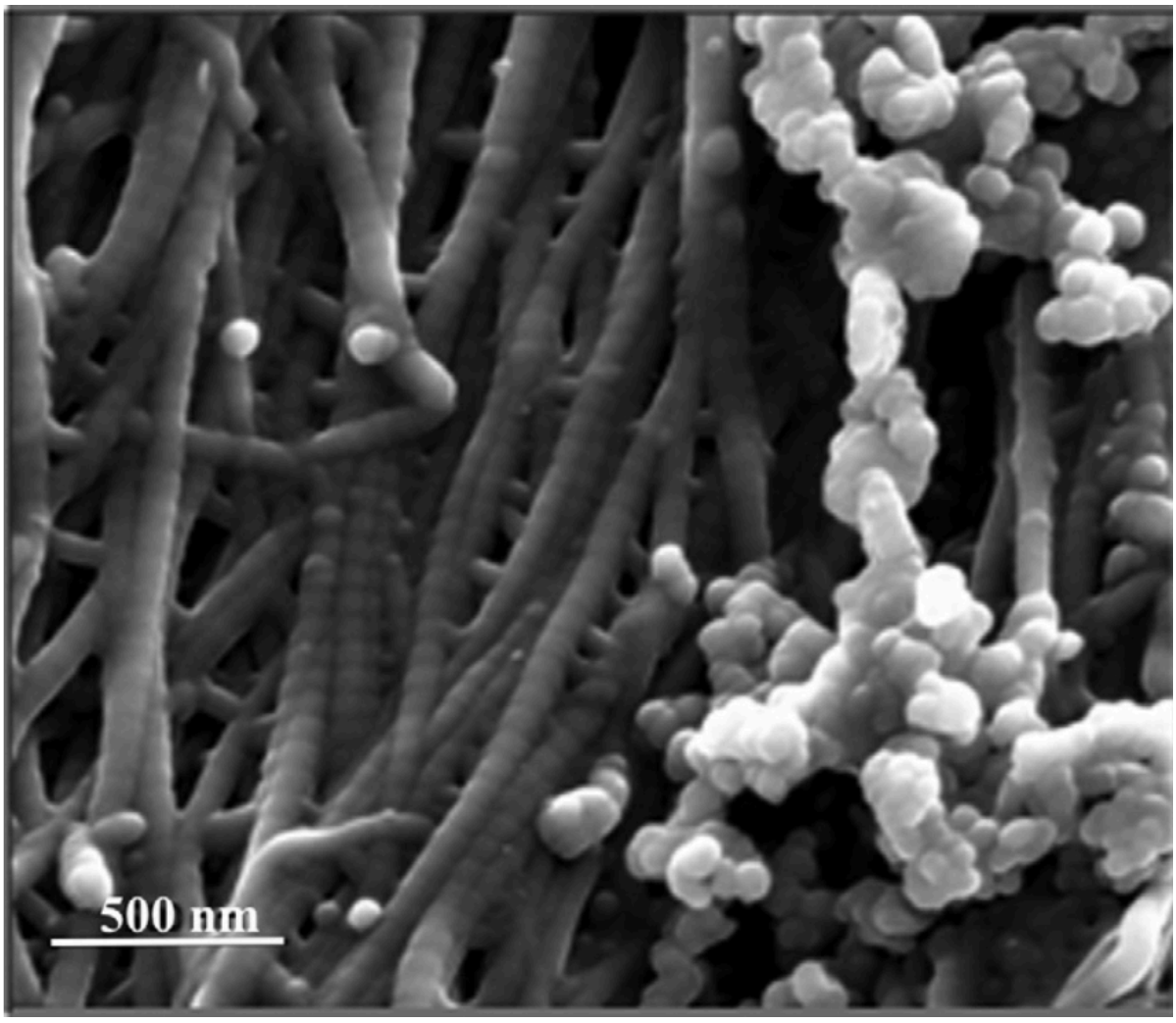


Figure 11 : photographie en microscopie électronique à balayage des nodules de minéralisation sur les fibres de collagène de type I *in vitro* (178).

L'assemblage des monomères de collagènes en fibrilles fournit à la matrice osseuse son ultra structure et sert de trame supportant la minéralisation. Cette organisation collagénique confère également à l'os certaines de ses propriétés mécaniques, notamment la résistance à la traction et la rigidité à la torsion (179).

Ces dernières années, le collagène a été largement utilisé en ingénierie tissulaire en tant que biomatériau de par ses excellentes propriétés physicochimiques et sa biocompatibilité. Ainsi, les biomatériaux à base de collagène démontrent une haute hydrophilie (favorable au développement cellulaire), sont peu immunogènes, sont résorbables *in vivo*, peuvent être facilement modifiés (taille, forme, ajout d'une phase minérale) pour ajuster leurs propriétés biologiques ou mécaniques, présentent une bonne compatibilité cellulaire (adhésion, croissance, prolifération), permettent la différenciation cellulaire en leur sein et donc de promouvoir la régénération tissulaire (180).

En ingénierie osseuse, les biomatériaux à base de collagène peuvent être utilisés sous plusieurs formes : hydrogels, membranes ou éponges (178).

Les hydrogels de collagène, réseau de polymères hydrophiles, peuvent absorber de 20 à 100 fois leur poids sec en eau, cette propriété permettant de favoriser en leur sein l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (181). Leur utilité a été démontrée en ingénierie tissulaire osseuse pour encapsuler des cellules et être utilisés sous forme injectable dans des traitements mini-invasifs (178).

Les membranes de collagène résorbables sont largement utilisées en clinique pour la régénération osseuse guidée (ROG) ou tissulaire, notamment en chirurgie orale. Elles permettent principalement d'éviter une colonisation du site osseux par les cellules épithéliales et d'obtenir une régénération tissulaire optimale. Si leur biocompatibilité est très importante, leurs propriétés mécaniques sont extrêmement limitées.

Les éponges de collagène ont reçu une attention croissante en ingénierie tissulaire osseuse et font partie des biomatériaux les plus utilisés pour l'ensemencement des CSM en leur sein (64,110,136–141,174,182–187).

Il a été démontré que l'ensemencement de CSM-MO au sein de matrices de collagène permet d'obtenir une différenciation ostéogénique et une minéralisation osseuse *in vitro* (174,182,183,185–187) ainsi qu'une formation osseuse *in vivo* après implantation dans des défauts osseux chez le rat (188), le lapin (186,189), et chez l'homme (185).

In vitro, les CSM-PD ont également démontré leurs capacités de différenciation ostéogénique après ensemencement dans des éponges de collagène (131). Dans cette étude, des CSM-PD

isolées à partir de troisièmes molaires humaines ont été ensemencées à la densité de 1000 cellules/mm^3 dans des éponges de collagène de 500 mm^3, et mises en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique. Après 40 jours, les CSM-PD avaient sécrété abondamment des fibrilles de collagène I et produit une matrice osseuse minéralisée au sein des éponges de collagène. La distribution des CSM-PD au sein des éponges de collagène mimait la structure et l'architecture natives du tissu osseux, avec une colonisation des couches superficielles comparable au périoste osseux (cellules moins différenciées, à la morphologie plus plate) et des cellules dans les couches profondes avec une morphologie cuboïde ostéoblastique et exprimant des taux importants d'OCN.

L'ensemencement et l'utilisation des CSM-PD dans des éponges de collagène *in vivo* ont été étudiés pour la régénération osseuse chez le rat (136,138,139), le chien (141) et l'homme (110,137,140). Des CSM-PD humaines ensemencées dans des éponges de collagène ont ainsi été employées avec succès pour régénérer des défauts osseux mandibulaires (110,137,139–141) ou crâniaux (136,138). Dans ces travaux *in vivo*, 10^6 CSM-PD en passage 3 ont été ensemencées dans des éponges de 8 sur 5 mm (251 mm^3) (136,139) ou 9 sur 5 mm (318 mm^3) (141). Maraldi *et al* ont choisi une densité d'ensemencement plus faible, avec $0{,}3.10^6$ CSM-PD en passage 3 ensemencées dans des éponges de 13 sur 1,5 mm (199 mm^3) (138). L'implantation a ensuite été réalisée immédiatement (140), après 24 heures (136), 48 heures (141) et 21 jours (137) de culture dans du milieu basal ou après 8 (138) et 21 jours (139) de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique. Dans tous ces travaux, l'implantation d'éponges de collagène ensemencées avec des CSM-PD a permis d'aboutir à la formation d'os néoformé *in vivo* et à la régénération des défauts osseux implantés, comparativement à l'implantation de matrices de collagène seules sans CSM.

Néanmoins, si les polymères naturels comme le collagène représentent une option intéressante en ingénierie tissulaire osseuse, leur dégradation rapide *in vivo* et leurs faibles propriétés mécaniques ont conduit à les combiner à une composante minérale comme l'HA afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques et de se rapprocher d'une structure tridimensionnelle et physico-chimique plus proches de celle du tissu osseux natif (177).

2.4.3. Intérêt de l'utilisation de matrices de collagène combinées à un hydrogel d'hydroxyapatite et alginate en ingénierie tissulaire osseuse

2.4.3.1. Intérêt de l'ajout d'hydroxyapatite

L'HA, de composition $Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$, est un minéral chimiquement similaire aux minéraux de la phase inorganique osseuse (190). Cette similarité fait de l'HA une option intéressante en ingénierie tissulaire osseuse de par ses propriétés ostéoconductrices (191). L'HA présente une bonne biocompatibilité *in vitro* (192–195) et *in vivo* chez l'homme et l'animal (196,197), et est lentement résorbable *in vivo* par les ostéoclastes (198). La porosité de l'HA permet la colonisation et la croissance des structures vasculaires ainsi que la diffusion des nutriments et de l'oxygène essentiels à la croissance cellulaire au sein du biomatériau (191).

Cependant, l'HA utilisée seule présente de médiocres propriétés mécaniques freinant son utilisation en ingénierie tissulaire osseuse. Combinée à d'autres composants afin d'en améliorer ses propriétés et son efficacité, elle a permis d'obtenir un biomatériau aux caractéristiques les plus proches possibles du tissu natif et qui a été ensemencé avec différents types de CSM.

L'HA a été combinée à des matériaux naturels (collagène (192–195,199–203)), fibronectine (202,204), gélatine (205,206), chitosan (204,207–211), acide hyaluronique (208), soie (212)) ou synthétiques (polycaprolactone (203,213–215), 1,8-octanediol-co-citrate (POC) (216), PVA (217), PLGA (199,210,218), polyhydroxybutyrate (PHB) (219), BCP (214,217), ß-TCP (220), carbonate de calcium (221)).

Différents types de CSM ont été ensemencés dans les biomatériaux à base d'HA : CSM humaines (194,195,211,222) et murines (195), CSM-MO (193,199,202,204,205,207–209,212,213,215–218,220,221,223), CSM de cordon ombilical (201,206,210,219), CSM-TA (214), CSM-PD (192,202) ou CSM-LP (195).

Les effets obtenus suite à l'ensemencement des différents types CSM dans les matrices à base d'HA *in vitro* (192–195,199,202,204–209,211–214,216–219,222,223) et *in vivo* (201,210,215,220,221,223) sont résumés dans les tableaux 10 et 11. Les biomatériaux contenant de l'HA ont ainsi démontré une amélioration de la viabilité et prolifération cellulaire, de l'adhésion et de la répartition des cellules au sein des matrices, de meilleures propriétés mécaniques, une augmentation de la différenciation ostéogénique, de la synthèse collagénique, de la minéralisation et l'obtention d'une meilleure formation ou régénération osseuse *in vivo* (Tableaux 10 et 11).

SOURCE DE CSM	TYPE DE MATRICE	UTILISATION	EFFETS	RÉFÉRENCE
CSM-MO	TCP/HA (BCP)	*In vivo*	Régénération osseuse	Behnia *et al* (220)
	Coralline HA/carbonate de calcium	*In vivo*	↑ ALP, ↑ synthèse de collagène et formation osseuse	Fu *et al* (221)
	Collagène/HA	*In vitro*	↑ propriétés mécaniques, ↑ viabilité cellulaire et colonisation matrice	Laydi *et al* (193)
	Collagène/HA	*In vitro* *In vivo*	↑ adhésion cellulaire, ↑ prolifération, ↑ migration cellulaire dans la matrice, néoformation osseuse	Liu *et al* (223)
	Gélatine/HA	*In vitro*	↑ ALP	Rungsiyanont *et al* (205)
	Soie/HA	*In vitro*	↑ collagène I, ↑ BSP, ↑ OCN, ↑ dépôts calciques	Bhumiratana *et al* (212)
	Chitosan/HA	*In vitro*	↑ ALP	Ambre *et al* (211)
	Chitosan/HA	*In vitro*	↑ adhésion et prolifération cellulaire, ↑ expression *RUNX2*	Kazimierczak *et al* (207)
	Chitosan/HA	*In vitro*	↑ ALP, ↑ expression génique *COL1A* et *RUNX2*, ↑ OCN	Kim *et al* (209)
	Chitosan/acide hyaluronique//HA	*In vitro*	↑ ALP	Chen *et al* (208)
	Chitosan/HA/fibronectine	*In vitro*	↑ dépôts calciques, ↑ collagène, ↑ synthèse protéique	Wang *et al* (204)
	Fibronectine/collagène/HA	*In vitro*	↑ adhésion cellulaire	Weszl *et al* (202)
	POC/HA	*In vitro*	↑ ALP	Chung *et al* (216)
	Polycoprolactone/HA	*In vivo*	Formation osseuse	Amorosa *et al* (215)
	Polycoprolactone/HA	*In vitro*	↑ ALP, ↑ coloration rouge alizarine, ↑ BMP2	Xia *et al* (213)
	Polycoprolactone/Collagène/HA	*In vitro*	↑ viabilité et prolifération cellulaire, ↑ différenciation	Wang *et al* (203)

			ostéogénique, ↑ expression *RUNX2, ALP, OCN*	
	PLGA/HA	*In vitro*	↑ ALP, ↑ coloration rouge alizarine, ↑ OPN, ↑ OCN	Lv *et al* (218)
	PLGA/Collagène/HA	*In vitro*	↑ ALP, ↑ expression génique *OCN, RUNX2, ALP*, ↑attachement cellulaire et colonisation	Yang *et al* (199)
	PVA/BCP	*In vitro*	Caractéristiques morphologiques favorables	Nie *et al* (217)

Tableau 10 : effets obtenus lors de l'ensemencement de CSM de moelle osseuse dans les matrices à base d'hydroxyapatite.

SOURCE DE CSM	TYPE DE MATRICE	UTILISATION	EFFETS	RÉFÉRENCE
CSM-CO	HA/gélatine	*In vitro*	Viabilité cellulaire dans la matrice	Barbani *et al* (206)
CSM-CO	Collagène/HA	*In vivo*	↑ densité osseuse, ↑ formation osseuse, ↑ formation MEC	Yang *et al* (201)
CSM-CO	PHB/gélatine/HA	*In vitro*	↑ ALP	Ramier *et al* (219)
CSM-CO	Chitosan/PLGA/HA	*In vivo*	↑ ALP, ↑ OCN, ↑ formation de tissu ostéoïde	Wang *et al* (210)
CSM -TA	Polycoprolactone /BCP/HA	*In vitro*	↑ expression RUNX2, ↑ OCN, ↑ OPN, ↑ BSP	Lu *et al* (214)
CSM-PD	HA/collagène	*In vitro*	↑ Attachement cellulaire, prolifération, différenciation ostéogénique (↑ ALP, OPN)	Trivedi *et al* (192)
CSM-PD	Fibronectine/collagène/HA	*In vitro*	↑ adhésion cellulaire	Weszl *et al* (202)
CSM-LP	Collagène/HA	*In vitro*	↑ adhésion et prolifération cellulaire	Ning *et al* (195)
CSM humaines	Collagène/fibronectine/HA	*In vitro*	Viabilité cellulaire dans la matrice	Antebi *et al* (194)
CSM murines ($C_3H_{10}T_{1/2}$)	Collagène/HA	*In vitro*	↑ adhésion et prolifération cellulaire	Ning *et al* (195)
CSM humaines	Alginate/Cellulose/HA	*In vitro*	↑ propriétés mécaniques, ↑ viabilité cellulaire, ↑ prolifération cellulaire	Tohamy *et al* (222)

Tableau 11 : effets obtenus lors de l'ensemencement de CSM de diverses origines dans les matrices à base d'hydroxyapatite.

Nous avons choisi dans nos travaux d'élaborer une matrice combinant collagène et HA, visant à se rapprocher encore davantage de la structure native du tissu osseux. Si ces deux composants sont ostéoconducteurs et permettent chacun séparément de promouvoir la différenciation

ostéogénique (224), leur association a démontré une accélération du processus d'ostéogénèse (225), de meilleurs propriétés ostéoconductrices (226) et une bonne biocompatibilité *in vivo* chez l'homme et chez l'animal (197,227). Ce biomatériau composite présente également de meilleures propriétés mécaniques, l'HA conférant au polymère de collagène une plus grande stabilité et une plus grande résistance tridimensionnelle (228).

2.4.3.2. Intérêt de l'ajout d'alginate

Comme nous l'avons vu, des polymères naturels peuvent être incorporés dans les biomatériaux destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse. Parmi eux, l'alginate, polysaccharide extrait de l'algue brune marine, est capable de former des hydrogels stables lorsqu'il polymérise en présence de certains cations divalents comme le calcium (229). Biocompatible, très hydrophile, économique, il est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire (230) mais également en ingénierie tissulaire et cellulaire pour ses propriétés d'encapsulation (231–236). Néanmoins, l'emploi de matrices composées uniquement d'alginate en ingénierie tissulaire osseuse est limité par leurs faibles propriétés mécaniques, leur dégradation non contrôlée et leurs limitations en termes d'adhérence cellulaire au sein de l'hydrogel d'alginate (237). Ainsi, plusieurs travaux ont cherché à développer des biomatériaux combinant alginate et composés inorganiques dans une perspective de biomimétisme du tissu osseux (229,238–242). L'alginate a été combiné *in vitro* (229,239–242) et *in vivo* (238) à des matrices de bioverre et PEG (238), à de la silice et de la gélatine (239,240), à de l'HA (229), à du silicate de calcium (241) et à du phosphate de calcium (242). Ces combinaisons ont permis d'obtenir une augmentation de la minéralisation osseuse (240), de la prolifération et de la différenciation ostéogénique des CSM-MO (241,242), une amélioration des propriétés mécaniques (241,242) et une réparation osseuse dans un modèle de défaut crânial chez le rat (238).
L'ajout d'HA en poudre à un hydrogel d'alginate (ratio 1 :1) permet d'améliorer à la fois les propriétés mécaniques des matrices, ainsi que l'adhérence et la prolifération des cellules (lignée cellulaire ostéoblastique murine) qui y sont ensemencées (229).

Dans notre travail, nous avons ainsi ambitionné de développer un biomatériau alliant éponges de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en HA, et d'y ensemencer des CSM-PD, afin d'obtenir un produit d'ingénierie tissulaire osseuse optimal.

2.5 Influence de l'environnement sur les CSM-PD

L'utilisation des CSM-PD en ingénierie tissulaire *in vivo* est dépendante de plusieurs facteurs ainsi que du microenvironnement local que ces cellules doivent affronter. L'optimisation des propriétés des CSM-PD dépend donc de la modulation de certains facteurs de l'environnement comme la teneur en oxygène, la composition du milieu de culture, la densité d'ensemencement ou l'utilisation de facteurs de croissance.

2.5.1. Facteurs de croissance

Régénérer le tissu osseux *in vivo* implique d'élaborer un biomatériau imitant au mieux le tissu natif à remplacer, capable de favoriser la synthèse d'une MEC fonctionnelle. L'idée est alors de vouloir potentialiser cette production, d'une part comme nous l'avons développé plus haut, en ensemençant le biomatériau avec des cellules aux propriétés ostéogéniques, et d'autre part en encapsulant dans le biomatériau des molécules bioactives adjuvantes.

Certaines protéines intrinsèques du tissu osseux possèdent des propriétés ostéoinductrices importantes, dont les BMP, membres de la superfamille des TGF-β (243). Localisée dans la matrice osseuse déminéralisée, cette famille de facteurs de croissance joue un rôle primordial dans l'ostéogénèse en agissant sur le recrutement, la prolifération et la différenciation ostéogénique (244,245). BMP2, 4, 5, et 7 possèdent des capacités ostéogéniques importantes (246) et l'utilisation de BMP2 et BMP 7 *in vivo* dans la réparation des pertes de substance osseuses a été plus particulièrement étudiée. Ainsi, il a été démontré que BMP-2 induit la formation osseuse (247) et augmente l'expression de marqueurs de différenciation osseuse comme l'OCN (248). De la même façon, des travaux ont mis en évidence la capacité de BMP-7 d'induire l'expression de marqueurs ostéoblastiques comme l'ALP et d'accélérer la minéralisation osseuse (249,250).

L'utilisation clinique des BMP concerne principalement des applications en chirurgie orthopédique, mais leur utilisation est très limitée par la réglementation. En France, seule la *Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2* (rh-BMP-2) a ainsi une autorisation de mise sur le marché (AMM), uniquement en tant qu'alternative à l'autogreffe dans certaines pathologies du rachis et dans le traitement des fractures tibiales. Commercialisée sous le nom d'INDUCTOS®, elle est utilisée combinée à une matrice de collagène bovin de type I disponible sous différentes tailles, allant de 1 à 8 cm^3.

L’utilisation de facteurs de croissance en ingénierie tissulaire impose de contrôler spatialement et chronologiquement leur délivrance afin de reproduire la cinétique physiologique de la molécule *in vivo*. La molécule bioactive peut ainsi être soit combinée à une matrice ou un biomatériau de substitution osseuse, soit utilisée avec un vecteur destiné à protéger la molécule, contrôler la quantité utilisée et améliorer sa cinétique de relargage dans l’environnement tissulaire.

Une des solutions pour vectoriser ces molécules bioactives et facteurs de croissance est de recourir à l’encapsulation dans des nanovésicules : les nanoliposomes. Composés par des constituants issus de l’agroressource, ces nanoliposomes sont des vecteurs utilisables de manière sûre et efficace pour transporter des molécules actives dans des systèmes biologiques (251). Constitués de phospholipides, ils sont utilisés dans différents domaines d’application comme la cosmétique, l’alimentation et l’ingénierie tissulaire (252).

Les nanoliposomes d’origine naturelle (lécithine de soja, de colza ou de saumon) sont élaborés par hydrolyse enzymatique lipidique, sonication, et sont formulés sous forme de suspension pour leur utilisation en ingénierie tissulaire. La taille des nanoliposomes ainsi obtenus varie entre 125 nm (nanoliposomes de lécithine de colza), 130 nm (nanoliposomes de lécithine de saumon) et 136 nm (nanoliposomes de lécithine de soja) (251) (Figure 12).

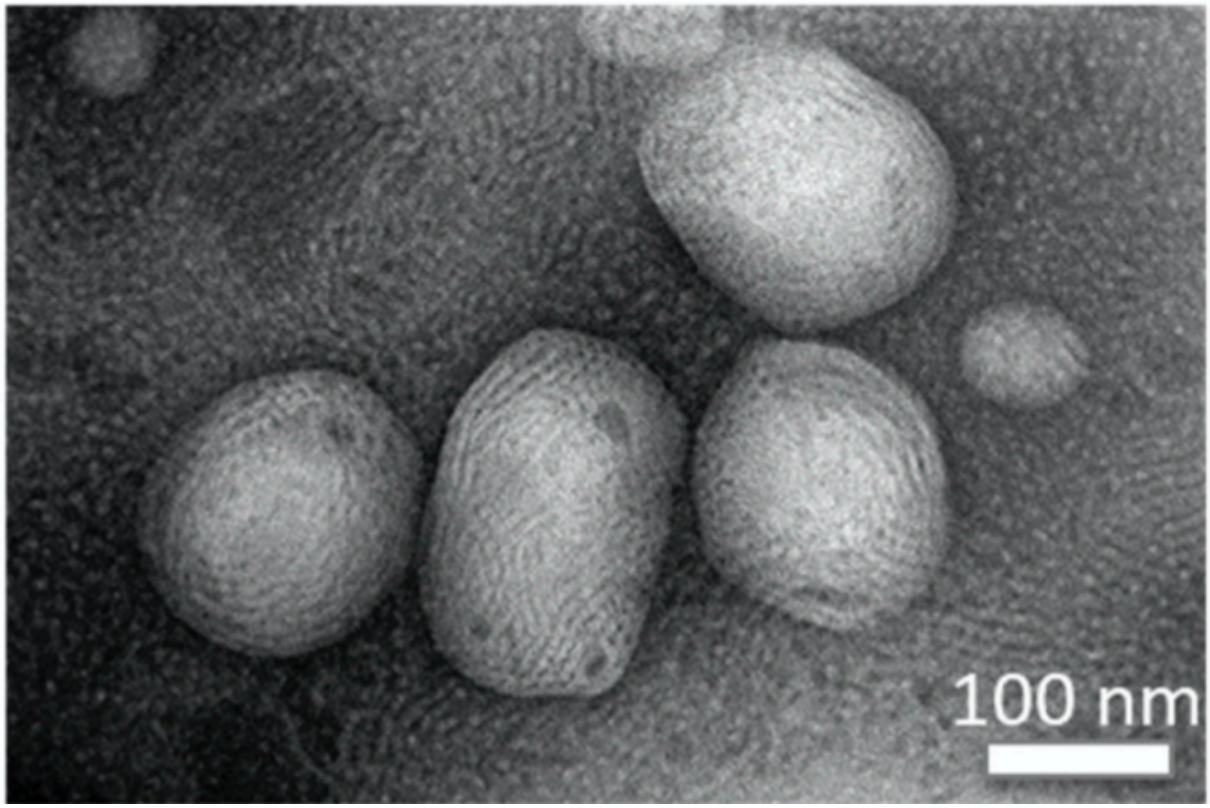


Figure 12 : photographie en microscopie électronique à transmission des nanoliposomes de lécithine de soja produits au LIBio, Université de Lorraine (253).

L'étude des effets de ces trois types de nanoliposomes sur la prolifération cellulaire de CSM-MO a permis de démontrer une stimulation de la prolifération cellulaire concentration-dépendante en fonction du type de nanoliposomes. (251). Une autre étude évaluant la biocompatibilité de ces nanoliposomes de colza sur des chondrocytes de rats en fonction de leur concentration dans le milieu de culture (de 20 à 1000 µg/mL) suggère une absence de toxicité cellulaire à l'exception de la concentration la plus élevée (1000 µg/mL) (253). Enfin, des travaux précédents réalisés au sein de notre laboratoire ont également démontré l'innocuité des nanoliposomes vis-à-vis de cellules progénitrices endothéliales (CPE) issues de sang de cordon et de CSM issues de la gelée de Wharton (CSM-GW) du cordon ombilical à une concentration inférieure à 500 µg/mL. A ce jour, la biocompatibilité des nanoliposomes vis-à-vis des CSM-PD n'a pas encore été étudiée.

2.5.2. Conditions de culture

Des conditions de culture adéquates doivent être choisies afin de permettre aux CSM-PD une adhésion, une croissance et une différenciation optimales.

- La densité d'ensemencement

Elle représente un facteur majeur permettant d'optimiser la survie, la prolifération et la différenciation des CSM-PD. Il a été démontré que le comportement et le fonctionnement cellulaire des CSM varient avec la densité d'ensemencement (254,255). La distance entre cellules représenterait ainsi un facteur clef dans la communication et la modulation des signaux inter cellulaires, variant de 300 µm pour des densités d'ensemencement de 1.10^3 à 2.10^3 cellules/cm^2 à 150 µm pour des densités de 4.10^3 à $1{,}6.10^4$ cellules/cm^2 (255). Ainsi, plus la distance intercellulaire sera importante, moins la communication et les signaux intercellulaires seront efficaces. La prolifération des CSM-MO pour des densités d'ensemencement de 1.10^5 à 1.10^6 cellules/cm^2 varie ainsi de 80 000 à $1{,}6.10^6$ cellules obtenues après 21 jours de culture en deux dimensions. Les plus grands nombres de cellules ont été obtenus pour les densités initiales de 4.10^5 et 1.10^6 cellules/cm^2, et le plus faible nombre pour les densités initiales de 1.10^5 et 2.10^5 cellules/cm^2 (256). La prolifération des CSM-PD est également impactée par la densité d'ensemencement, avec une prolifération proportionnelle à la densité d'ensemencement (de 1.10^2 à 1.10^4 cellules/cm^2). Le temps de doublement de la population cellulaire le plus faible a été observé pour des densités de 1.10^2 et 5.10^2 cellules/cm^2, et le plus rapide avec des densités de 1.10^3, 5.10^3 et 1.10^4 cellules/cm^2, sans différence significative entre ces différents groupes (257).

En ingénierie tissulaire osseuse, les variations dans la densité d'ensemencement des cellules au sein des matrices influencent la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la synthèse de MEC et la formation osseuse (258–263). La densité d'ensemencement dans des matrices en trois dimensions impacte également la survie et le potentiel de différenciation ostéogénique des CSM ainsi que leur capacité à former du tissu osseux (264–267).

Une densité d'ensemencement trop faible pourrait induire une communication intercellulaire insuffisante, là où une densité trop élevée pourrait aboutir à un microenvironnement défavorable par limitation des transports de nutriments (262). Des travaux sur les CSM-MO ont démontré qu'une densité cellulaire minimale (8.10^4 cellules/cm^3 de matrice) est indispensable

pour l'obtention d'une différenciation ostéogénique *in vitro*, avec une densité cellulaire optimale de 8.10^6 cellules/cm^3. Les plus faibles densités d'ensemencement (8.10^2 et 8.10^3 cellules/cm^3) n'ont pas permis d'obtenir une différenciation ostéogénique efficiente (260). D'autres études ont démontré que l'expression génique des facteurs de croissance spécifiques de la différenciation osseuse par les CSM-MO varie en fonction du temps selon la densité d'ensemencement initiale (259). Ainsi, une différenciation ostéogénique précoce semble stimulée par une plus faible densité cellulaire d'ensemencement ($2{,}4.10^5$ cellules/cm^3), et une différenciation tardive ainsi que la minéralisation osseuse par une densité d'ensemencement plus élevée (2.10^6 cellules/cm^3). Cette dernière semble en effet diminuer la prolifération cellulaire des CSM-MO et favoriser leur engagement dans la lignée de différenciation ostéogénique, augmentant la minéralisation et la synthèse d'ALP (262,266,267). Déterminer une densité d'ensemencement optimale est donc primordial en ingénierie tissulaire osseuse. Dans notre travail, nous avons choisi une densité d'ensemencement de 5.10^3 cellules/cm^2 pour la culture en deux dimensions de nos CSM-PD (255–257) et une densité de 6.10^6 cellules/cm^3 pour l'ensemencement dans nos biomatériaux, en nous basant sur les travaux préexistants disponibles dans la littérature (260,262,265–267).

- La composition du milieu de culture

Le milieu utilisé pour la culture des CSM-PD est très variable dans la littérature. Les plus utilisés sont le *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), le *DMEM-low glucose* (DMEM-LG), l'*alpha-Minimal Essentiel Medium* (α-MEM), le *DMEM-Knock Out* (DMEM-KO) et le *DMEM/Ham's F12 nutrient medium* (DMEM/F12) (268). La culture des CSM-PD a également été réalisée à l'aide de *MegaCell DMEM* (269), de milieu à 60% de DMEM-LG et 40% de *chick fibroblast basal medium* (MCDB-201)(270), de *non hematopoietic stem cell expansion medium* (152), de milieu RPMI-1640 (271), de MesenCult (272), de MegaCell (168), de F12 *Coon's and Ambesi's modified medium*-199 (273), d'*Endothelial cell Basal Medium 2* (274), ou de human *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* (275). Si peu de données sont disponibles dans la littérature sur une comparaison en conditions identiques des performances des différents milieux de culture, l'α-MEM et le DMEM semblent être optimaux pour l'isolement et la culture des CSM-PD (268). Dans notre travail, nous avons donc choisi d'utiliser le DMEM comme milieu de culture.

Les différentes études démontrent également le recours à une supplémentation du milieu par du sérum xénogénique à différentes concentrations pour la culture des CSM-PD, concentration variant de 2 (270,276,277) à 20% (50,113,142,278,279), avec une large majorité de travaux préférant une concentration de 10% (268).

Le sérum xénogénique, classiquement du sérum de veau fœtal (SVF), est largement utilisé pour l'isolement et la croissance des CSM, y compris pour les CSM-PD (116). Si l'utilisation de sérum animal soulève la problématique du risque d'infection, de transmission de pathogènes et de réaction immunologique lors de son utilisation *in vivo*, la culture primaire des CSM-PD est difficile dans des conditions dépourvues en sérum (280). Notre choix pour la supplémentation en sérum s'est ainsi porté sur l'ajout de 10% de SVF au milieu de culture.

- La teneur en glucose du milieu de culture

Malgré les résultats prometteurs obtenus avec l'utilisation des CSM en médecine régénérative tissulaire, une des limitations majeures pour l'utilisation clinique réside dans le fort taux de mort cellulaire lors de la transplantation *in vivo* (281). En effet, après implantation, les cellules rencontrent un environnement ischémique et pauvre en nutriments nécessaires à leur survie et croissance, comme le glucose (282). Si nombre d'études se sont intéressées au rôle central de l'oxygène pour la survie, le métabolisme, la prolifération et la différenciation des cellules (283) (284), le glucose semble également jouer un rôle primordial et pourrait promouvoir la survie cellulaire même en conditions hypoxiques (282). Véritable « carburant » pour le métabolisme cellulaire, son rôle sur le comportement des CSM n'est pas complétement élucidé. Les effets de la concentration en glucose du milieu ont été étudiés sur plusieurs types de CSM dont les CSM-MO (285–289) les CSM-TA (290), CSM-LP (291,292), les CSM de tendon (293) les cellules souches embryonnaires (294) ou les CSM-PA (295). Une seule étude s'est intéressée à l'impact du glucose sur les CSM-PD (296). A ce jour, ces études publiées sur l'influence du glucose sur la prolifération et la différenciation ostéogénique des CSM ont donné des résultats contradictoires et n'ont pas clairement fourni de réponse sur le rôle exact du glucose, notamment concernant les CSM-PD. Une meilleure compréhension des facteurs influençant le microenvironnement local des CSM-PD et notamment le glucose, qui est un paramètre facilement ajustable *in vitro* via le milieu de culture, est primordial et pourrait améliorer la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire *in vivo* (297).

- La teneur en oxygène

Réguler la teneur en oxygène lors de la culture des CSM-PD *in vitro* est un point pivot central en ingénierie tissulaire afin d'améliorer les capacités de prolifération, survie et différenciation cellulaires. En effet, les niches de CSM *in vivo* sont soumises à un environnement à faible teneur en oxygène (298) et ces conditions peuvent être mimées *in vitro* par des conditions d'hypoxie lors de la culture. L'hypoxie est également considérée comme un des facteurs permettant de maintenir la plasticité des CSM et leur capacité d'autorenouvellement (299). Néanmoins, actuellement, la culture cellulaire se réalise très majoritairement en condition de normoxie (21% d'oxygène) et il persiste des controverses quant aux effets de l'hypoxie (1-3% d'oxygène) sur les CSM-PD *in vitro* (300). Ainsi, selon les études, l'hypoxie semble avoir soit augmenté la prolifération des CSM-PD (301,302), soit ne pas avoir eu d'effet significatif comparativement aux conditions normoxiques (296,303). Ces différences peuvent être expliquées par les conditions d'expérimentation et à la teneur d'oxygène différentes dans ces travaux (2% pour Kanafi *et al* (296) et Zhou *et al* (303) *vs* 3% pour Sakdee *et al* (301) et Iida *et al* (302)). Par ailleurs, Iida *et al* se sont intéressés à l'effet de l'hypoxie sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD, avec des résultats semblant montrer une inhibition de cette différenciation par les conditions hypoxiques (302).
Dans notre travail axé sur l'ingénierie tissulaire osseuse et en nous basant sur ces résultats, nous avons choisi de privilégier des conditions de culture normoxiques pour nos CSM-PD.

- Le support de culture : le collagène

Différentes études se sont focalisées sur l'intérêt d'utiliser le collagène pour améliorer la culture primaire et le potentiel de différenciation des CSM (199,304–312) et plus particulièrement des CSM-PD (269,280,313). Le collagène est en effet un composant majoritaire de la phase organique du tissu osseux ainsi que du tissu pulpaire.
Réaliser un *coating* des plaques de culture avec du collagène permet en effet de recréer un microenvironnement favorable et proche de la MEC physiologique (268).
Ainsi, il a été démontré que le collagène permet d'améliorer les capacités d'adhésion et de migration ou la prolifération des CSM de cordon ombilical (304), des CSM issues du muscle (306), des CSM dérivées de cellules induites pluripotentes (iPS) (311) et des CSM-MO (304,305,310,312).

Il permet par ailleurs de potentialiser les capacités de différenciation ostéogénique des CSM-MO (199,305,309,312), des CSM-TA (308) et des CSM dérivées d'iPS (311).
Des effets similaires ont été observés sur les CSM-PD (269,280,313). Il a ainsi été démontré que la culture des CSM-PD en plaques coatées au collagène permet de réduire la mort cellulaire (280), d'augmenter l'adhérence cellulaire et la prolifération (269,280,313) ainsi que les capacités de différenciation ostéogénique des CSM-PD (313). Peu de données sont disponibles dans la littérature sur le protocole de *coating* au collagène pour la culture des CSM-PD, néanmoins des travaux ont démontré l'efficacité de l'utilisation d'une solution de collagène I diluée dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) (10 µg/mL) pour réaliser un *coating* à 1 µg de collagène par cm^2 (313).
Dans ce travail, nous avons ainsi choisi de réaliser un *coating* de nos plaques de culture à 0,5 µg de collagène I par cm^2 dans du PBS.

2.6. Intérêt d'une co-différenciation angiogénique et ostéogénique des CSM-PD

Une des stratégies en ingénierie tissulaire osseuse est de développer des matrices pré vascularisées pour améliorer la survie des biomatériaux implantés et la régénération osseuse par l'obtention d'une néo-angiogenèse efficace au sein du matériau (314). En effet, la vascularisation est un processus indispensable à la croissance et au développement osseux (315) et l'absence de revascularisation est un des obstacles majeurs dans la reconstruction des grands défauts osseux. Elle conduit à la mort cellulaire dans les biomatériaux d'ingénierie tissulaire implantés par manque de diffusion des nutriments et de l'oxygène indispensables à la survie cellulaire (316,317).
L'existence d'une relation étroite fonctionnelle et d'un dialogue cellulaire synergique entre ostéoblastes et CE a été démontrée ces dernières années (314,318). Ainsi, la communication entre cellules est possible soit par connections directes entre les cellules (molécules membranaires ou connections cytoplasmiques) soit par effet paracrine d'une cellule sur l'autre via la sécrétion de facteurs de croissance ou d'activation de voies de signalisation moléculaire (BMP2, BMP4, BMP7, FGF, TGF β, VEGF, IGF) (314).

Des travaux *in vitro* de modèles de co-culture entre CE et CSM ont suggéré un comportement ostéoinducteur des CE sur les CSM (319) permettant leur engagement dans la différenciation ostéogénique via une régulation positive de marqueurs de différenciation ostéogénique comme

Runx2 ou ALP (320). Il a également été démontré que la co-culture cellulaire de cellules ostéoblastiques ou mésenchymateuses avec des CE, dans des modèles en deux et trois dimensions, promeut la formation d'un réseau prévascularisé structuré et stimule l'expression des marqueurs osseux (314). Une régénération osseuse optimale dépendrait donc des interactions entre ces deux types cellulaires qui produiraient des facteurs de croissance, et de la présence de ces facteurs dans le milieu. (321,322) (Figure 13).

L'utilisation de ce milieu de culture cellulaire enrichi en facteurs sécrétés par effets paracrine par les cellules (milieu conditionné (CM)) représente une piste prometteuse en médecine régénérative.

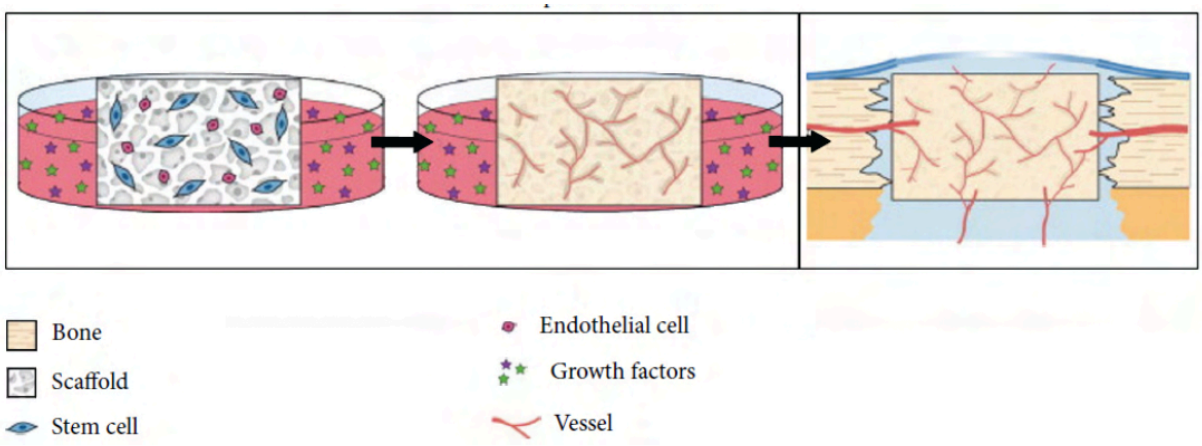


Figure 13 : principe du développement de biomatériaux d'ingénierie tissulaire prévascularisés et de l'intérêt de la présence de facteurs de croissance dans le milieu conditionné (d'après (323)).

2.7. Effet paracrine des CSM-PD et intérêt du milieu conditionné

Il est reconnu que le potentiel thérapeutique des CSM est lié à la sécrétion et au relargage de facteurs et molécules dans leur environnement extracellulaire (324), exerçant ainsi une activité paracrine. Ces éléments sont constitués de facteurs solubles (protéines, acides nucléiques, lipides) et de vésicules extracellulaires qui constituent le sécrétome (70). Le sécrétome est contenu *in vitro* dans le CM issu de la culture cellulaire des CSM. Si une caractérisation protéomique complète du CM des CSM d'origine dentaire n'a pas été réalisée à ce jour à notre connaissance, elle l'a été sur d'autres sources de CSM et a permis d'identifier plus de mille protéines relarguées dans le CM issu de ces cellules, dont une grande variété de facteurs de

croissances et de cytokines (325–327). L'utilisation du CM issu des CSM-PD en médecine régénérative a fait l'objet d'une revue systématique de littérature dans le cadre de notre travail (disponible en annexe 1). Elle a permis de mettre en évidence son potentiel d'utilisation thérapeutique dans de nombreux aspects de médecine régénérative, incluant la réduction de l'inflammation, la réparation des tissus dentaires, la promotion de l'angiogenèse et de la neurogénèse, la réduction de l'ischémie et la régénération d'organes solides.

Le CM issu des CSM-PD représente une alternative thérapeutique intéressante pour la régénération des tissus dentaires, dont la destruction par la pathologie carieuse peut être liée à un manque d'hygiène orale, l'alimentation, ou certains traitements comme la radiothérapie. Les travaux réalisés sur le CM des CSM-PD ont démontré qu'il permet de promouvoir la différenciation odontoblastique *in vitro* (328) et *in vivo* (329). Cet effet serait lié à la présence dans le CM de cytokines impliquées dans la différenciation ostéogénique comme la neurotrophine 3 ou la BMP (330). Par ailleurs, comparativement à l'effet des CM issus de moelle osseuse ou de tissu adipeux, l'efficacité du CM issus des CSM-PD sur la régénération des tissus dentaires semble plus importante (70).

Dans le champ d'application thérapeutique des pathologies vasculaires, le CM des CSM-PD semble également prometteur. Ainsi, la réduction de l'ischémie et la promotion de la néo vascularisation après un évènement thrombotique sont deux piliers pour réduire la morbidité inhérente aux pathologies vasculaires. Des travaux ont démontré que le CM issu des CSM-PD peut promouvoir la migration (78) et la prolifération (331) des CE et démontre des capacités anti-apoptotiques sur les CE de veines de cordon ombilical (331), les fibroblastes (332) et les myocytes (333). Le CM des cellules souches d'origine dentaire est également capable de promouvoir la différenciation endothéliale ou la formation de structures capillaires à partir de cellules embryonnaires musculaires (329), de fibroblastes (334) ou de CE de veines de cordon ombilical (328,334,335) *in vitro* et ces résultats ont été confirmés *in vivo* (329). Ces effets paracrines du CM pourraient être liés à la présence en son sein de facteurs angiogéniques tels que le MCP-1, le VEGF, l'IL-8, l'IGF, l'endostatine, la MMP3 ou le *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) (70).

Le CM issu des CSM-PD a également démontré son intérêt clinique dans la réduction de l'inflammation impliquée dans certaines pathologies comme l'arthrose. Des études ont démontré la capacité du CM à induire un environnement anti-inflammatoire *in vitro* (336,337) et à réduire les signes cliniques d'inflammation *in vivo* (337,338).

Le CM issu des CSM-PD présente également un potentiel de différenciation ostéogénique et a démontré la capacité d'induire *in vitro* la différenciation ostéogénique des CSM-PD (339,340).

Les pathologies neurologiques comme les maladies neurodégénératives, les lésions nerveuses ou cérébrales représentent un autre domaine ou le CM issu des CSM-PD a démontré son intérêt. Il semble en effet contenir un taux de facteurs neuro-protecteurs, anti-apoptotiques et pro angiogéniques, plus important que celui du CM issu des CSM-MO ou de CSM-TA (341) : *B-cell lymphoma 2* (bcl-2), néprysiline, GM-CSF, VEGF, fractalkine, BDNF, NGF, IGF (70). Le CM issu des CSM-PD semble ainsi pouvoir jouer un rôle central dans le traitement de pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer (342), la maladie de Parkinson (343), les lésions cérébrales ischémiques (344) ou les lésions nerveuses périphériques (345,346).

Le CM issu des CSM-PD peut également devenir une option thérapeutique dans la prise en charge de la défaillance d'organes, particulièrement le foie et le poumon. Résultant d'une fibrose et d'une destruction du nombre de cellules fonctionnelles au sein de l'organe, la défaillance engendre une morbidité et une mortalité importante pour les patients et seule la transplantation représente à l'heure actuelle un traitement pérenne. Des travaux ont démontré *in vitro* les effets du CM des CSM-PD sur la fibrose hépatique avec une promotion de la prolifération des hépatocytes (347), une diminution des marqueurs de fibrose comme l'*α-Smooth Muscle Actin* (α-SMA) et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi la régénération tissulaire (347,348). Ces résultats n'ont pas été obtenus avec le CM issu des CSM-MO et pourrait être lié à la présence dans le CM des CSM-PD d'une protéine impliquée dans la régénération hépatique, la *Growth Arrest Specific protein 6* (GAG 6). Ces résultats ont été confirmés par les résultats obtenus *in vivo* sur des modèles de fibrose hépatique chez la souris (348). Des résultats similaires ont été obtenus sur des modèles de défaillance pulmonaire chez la souris, avec l'obtention d'une réduction de la fibrose et une régénération du tissu pulmonaire après injection intra-nasale de CM issu de CSM-PD (349). Ces résultats n'ont pas été observés après injection de CM issu de CSM-MO ou de fibroblastes (122,124).

Enfin, notre revue de littérature a mis en lumière l'intérêt de l'utilisation du CM des CSM-PD pour lutter contre les conséquences de l'hyperglycémie chronique liée au diabète. Le CM des CSM-PD semble ainsi contenir des facteurs neuroprotecteurs, angiogéniques et immunomodulateurs qui pourraient aider à diminuer la neuropathie et l'angiopathie diabétiques (70). Une réduction de l'hyperglycémie et de la mort cellulaire des cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline a été obtenue *in vitro* et *in vivo* chez la souris après injection intrapéritonéale de CM issu de CSM-PD (350).

L'analyse de la littérature montre donc que le CM issu des CSM-PD semble contenir de nombreux facteurs sécrétés par les cellules et représente un outil thérapeutique majeur et

prometteur en médecine régénérative (Figure 14). Il a également démontré sa supériorité par rapport aux autres sources de CM, notamment celui issu des CSM-MO (70).

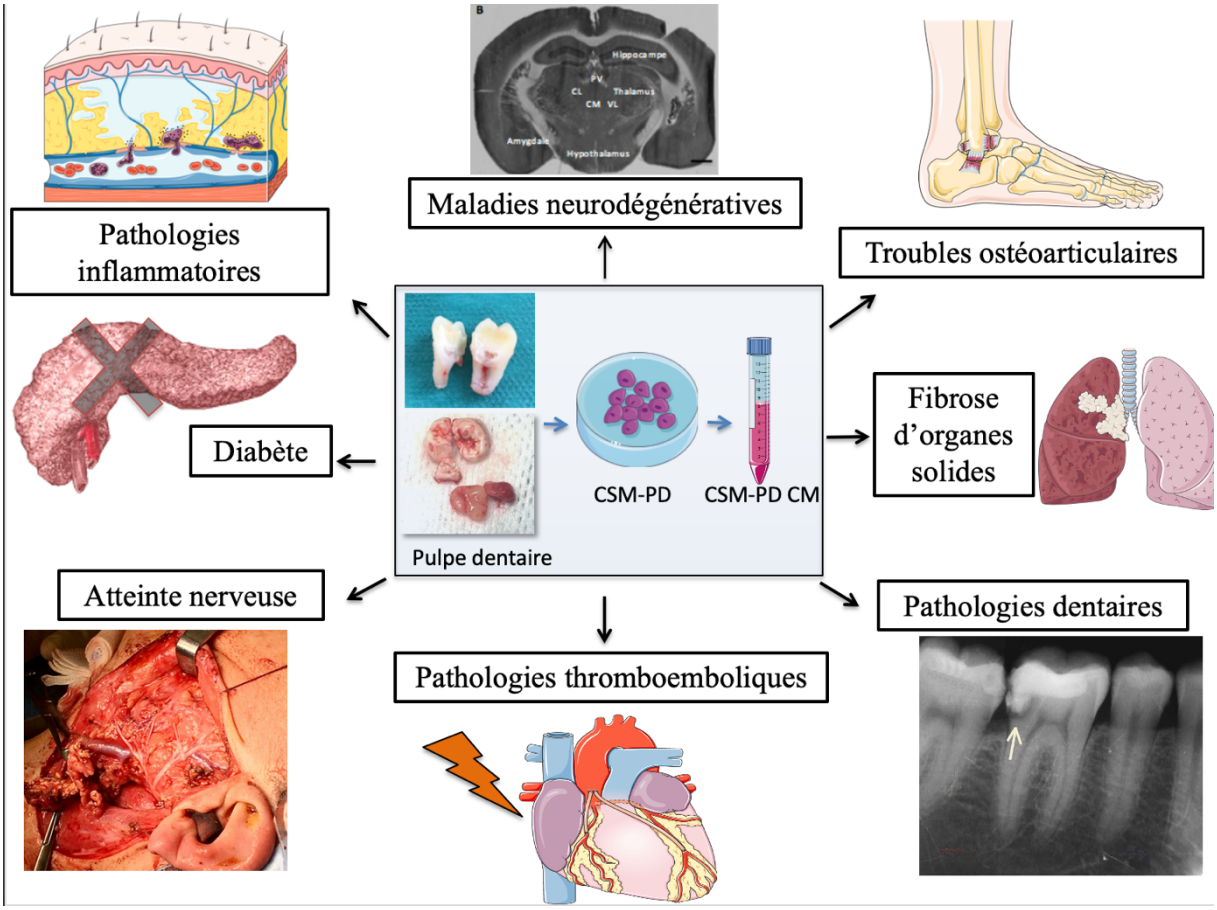


Figure 14 : applications de l'utilisation du CM issu des CSM-PD en médecine régénérative.

L'intérêt fondamental du CM est de s'affranchir des contraintes liées à l'utilisation cellulaire *in vivo* (survie cellulaire, immunogénicité), permettant notamment son utilisation dans des thérapies allogéniques et de pouvoir ainsi développer des thérapies régénératives dites « *cell-free* ». En effet, nous savons que de l'utilisation de cellules en médecine régénérative *in vivo* découlent des contraintes inhérentes à la survie, prolifération et différenciation de ces cellules, imposant non seulement de recréer un microenvironnement favorable par l'utilisation de matrices et de molécules bioactives adjuvantes et posant des limites liées à la réaction immunologique et inflammatoire qu'elles peuvent entrainer. Le CM permettrait ainsi de bénéficier des effets positifs de la thérapie cellulaire sans subir ses contraintes.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Culture cellulaire : isolement et expansion des CSM-PD

Dans notre travail, nous avons utilisé les CSM-PD humaines. Le tissu pulpaire a été obtenu à partir de troisièmes molaires incluses immatures et saines extraites au CHRU de Nancy au décours du parcours de soin chez des patients âgés de 13 à 17 ans exempts de toute pathologie générale. Les troisièmes molaires ont été récupérées après recueil de la non-opposition des patients et de leurs parents et inclusion des patients dans le protocole CELSORDINO (ID-RCB : 2017-A00860-53).

Les troisièmes molaires immatures étaient à un stade d'édification compris entre le stade 5 et 7 de la classification de Nolla (Tableau 12). Le stade 5 correspond à une édification coronaire de la dent quasiment terminée, et le stade 7 à l'édification du tiers coronaire de la racine (Figure 15). Ces stades d'édification autorisent l'extirpation du tissu pulpaire par les apex sans avoir à recourir à une découpe mécanique de la dent risquant d'entrainer une contamination bactérienne ou une altération du tissu pulpaire par échauffement.

Stade d'édification radiculaire	**Aspect de la dent**
0	Absence de la crypte dentaire
1	Présence de la crypte dentaire
2	Calcification coronaire initiale
3	Un tiers de couronne édifiée
4	Deux tiers de la couronne édifiés
5	Couronne quasiment complétement édifiée
6	Couronne complétement édifiée
7	Un tiers de racine édifié
8	Deux tiers de racine édifiés
9	Racines édifiées, apex ouvert
10	Racines édifiées avec apex fermé

Tableau 12 : stades d'édification radiculaire selon la classification de Nolla (351).

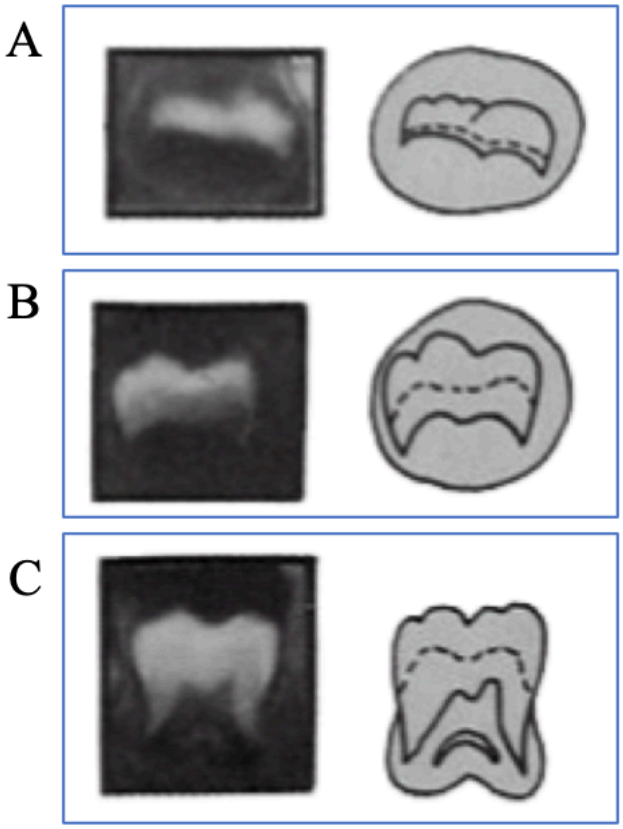


Figure 15 : aspects radiologique et clinique des stades 5 (A), 6 (B) et 7 (C) de Nolla (352).

Après avulsion, les troisièmes molaires ont été placées dans une solution de transport stérile (PBS 10X (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma), 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco), 250 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco), conservées à 4°C et transportées au laboratoire.

Afin d'isoler les CSM-PD du tissu pulpaire, nous avons utilisé la technique des explants (51,353) dans les heures qui ont suivi l'avulsion chirurgicale des troisièmes molaires (Figure 16).

La zone tissulaire comprise à la partie apicale des dents de sagesse a été éliminée à l'aide d'une lame chirurgicale stérile afin d'éviter les contaminations avec des cellules mésenchymateuses de la papille apicale.

Le tissu pulpaire a ensuite été extirpé délicatement de la cavité camérale à l'aide d'une précelle stérile et placé dans une boite de Pétri. Deux lavages successifs ont été réalisés avec du PBS 10X auquel ont été ajoutés 100 U/mL de pénicilline (Gibco), 100 µg/mL de streptomycine et 250 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco). Puis, chaque pulpe a été fragmentée en 20 à 25 explants de 0,5 à 2 mm^3.

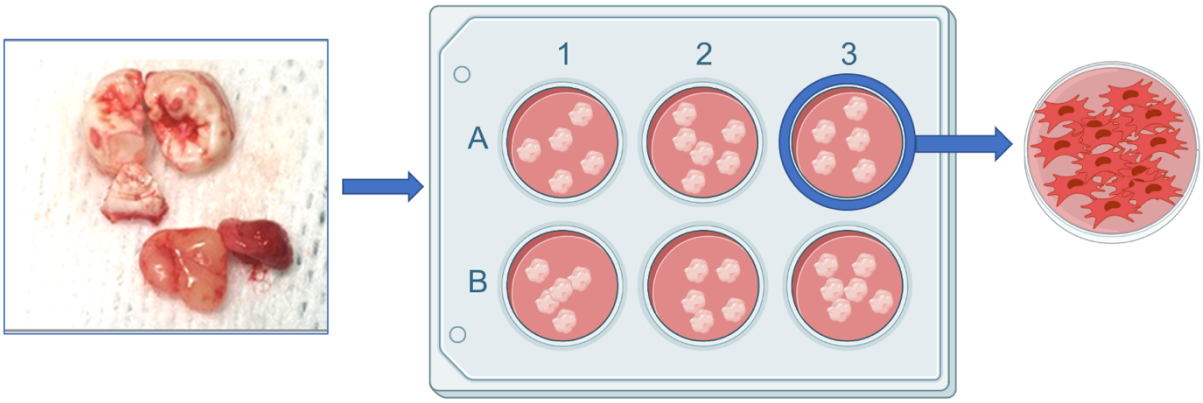


Figure 16 : technique des explants.

Pour toutes nos expérimentations, les CSM-PD ont été cultivées en plaques ou en boites préalablement coatées avec une solution de collagène de type I.
Une solution de collagène I (Collagen Type 1 rat tail, 3,83mg/mL, Corning, Discovery Labware, Inc) a été diluée dans du PBS pour obtenir une concentration finale de 9,6 µg/mL.
Des dépôts de 0,5 µg/cm^2 ont été réalisés dans les puits de culture et les plaques placées à incuber 45 minutes à 37°C. La solution en excès a ensuite été délicatement aspirée puis les supports de culture rincés délicatement au PBS pour éliminer les acides en excès. Les plaques ont été utilisées immédiatement ou délicatement séchées et conservée à 4°C pendant un délai maximum d'une semaine avant utilisation.

Environ quatre explants ont été placés par puits en plaques 6 puits préalablement coatées au collagène (0,5 µg/cm^2) avec l'ajout de 2 mL de milieu de culture par puit (DMEM-LG (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) (1g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5mL de pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco), 250 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco). Les cellules ont été placées dans un incubateur à 37°C (5% CO_2, 95% air) et à saturation en humidité.
Le premier changement de milieu a été réalisé au bout de 4 jours puis deux fois par semaine, jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire à 80% de confluence.

À 80% de confluence, les cellules ont été trypsinées : après aspiration du milieu de culture et lavage au PBS 10X, 500 µL de trypsine (TypLE®, Gibco) ont été ajoutés par puit de culture et les plaques ont été placées à incuber pendant 5 minutes en conditions normoxiques et à 37°C. L'action de la trypsine a ensuite été neutralisée par l'ajout de 1,5 mL de milieu de culture par

puit (DMEM *low glucose*, Gibco). Le contenu de chaque puit a été collecté et la suspension cellulaire ainsi obtenue a été centrifugée (5 min, 300 g) après comptage des cellules à l'aide d'une cellule de Malassez.

Une partie des cellules a été ensemencée à 5000 cellules/cm^2 et amplifiée jusqu'en passage 3.

A chaque passage (P1, P2, P3), les cellules résiduelles obtenues en culture ont été congelées pour analyses ultérieures. Elles ont été re-suspendues dans une solution de SVF (Dutscher) et dimethylsulfoxide (DMSO) (Fisher BioReagents®) à 9 pour 1 et à une concentration de 2.10^6 cellules par microtube (Wheaton, USA) puis placées à -150°C.
Pour leur utilisation ultérieure, les CSM-PD cryopréservées ont été décongelées par ajout de milieu de culture à température ambiante et réensemencées en plaques comme décrit précédemment.

3.2. Caractérisation des CSM-PD par cytométrie en flux

L'expression des marqueurs de surface des CSM-PD a été analysé par cytométrie en flux en passage 3, passage à partir duquel la population cellulaire est majoritairement composée de CSM.
Lorsque les cellules au 3^e passage ont atteint 80% de confluence, elles ont été rincées au PBS 10X puis trypsinées (TypLE®, Gibco), centrifugées (5 minutes, 300 g) et les culots ont été re-suspendus dans du PBS. Cinquante µL de suspension cellulaire contenant 3.10^5 cellules à marquer ont été déposés par tube de cytométrie.
Afin d'éviter les faux positifs, une solution de blocage des récepteurs Fc diluée au 1/50 a été ajoutée à la solution cellulaire (Human TruStain FcX™, BioLegend) et les tubes ont été incubés 10 minutes à température ambiante.
Un contrôle de viabilité est effectué en utilisant des marqueurs de viabilité fixables ou « Zombie » qui se fixent aux groupements amines des protéines et non à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les cellules vivantes excluent ces colorants alors que les cellules mortes génèrent un marquage en laissant pénétrer les marqueurs Zombie (Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, BioLegend).
Les anticorps utilisés sont listés dans le tableau 13.
Les anticorps ont été dilués dans 50 µL de solution de PBS à 2% de SVF (Dutscher). Cinquante µL d'anticorps dilués ont été ajoutés aux 50 µL de suspension cellulaire déjà répartis dans les

tubes, et incubés 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. L'incubation du tube contenant les marqueurs de viabilité (Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, BioLegend) a été réalisée à température ambiante à l'abri de la lumière.
A la fin de l'incubation, 2mL de PBS à 2% de SVF ont été ajoutés dans chaque tube puis la suspension cellulaire a été centrifugée (5 minutes, 300 g) et les culots re-suspendus dans 300 µL de solution de PBS à 2% de SVF après deux lavages.
Les culots cellulaires ont finalement été analysés à l'aide d'un cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter). Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel Kaluza™. Un minimum de 10000 événements a été collecté lors de chaque analyse. Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont exprimés en pourcentages de cellules positives.

ANTICORPS	ESPÈCE/SPÉCIFICITÉ	FOURNISSEUR	CONCENTRATION
CD44	Souris, IgG1	BioLegend	1/200
CD73	Souris, IgG1	BioLegend	1/200
CD90	Souris, IgG1	BioLegend	1/200
CD105	Souris, IgG1	BioLegend	1/200
HLA-DR	Souris, IgG2a	BioLegend	1/200
CD34	Souris, IgG1	BioLegend	1/200
CD45	Souris, IgG1	BioLegend	1/200

Tableau 13 : anticorps utilisés en cytométrie en flux.

3.3. Stimulations environnementales des CSM-PD

3.3.1. Étude des effets *in vitro* de vésicules de taille nanométriques (nanoliposomes) sur les CSM-PD

Nous avons étudié les effets de l'ajout de nanoliposomes issus de lécithine de colza à différentes concentrations sur les CSM-PD.
Ces nanoliposomes ont été obtenus par une collaboration avec le docteur Cyril Kahn et le professeur Elmira Arab Therany (LIBio, Université de Lorraine).

Pour élaborer ces nanoliposomes, 2 grammes de lécithine de colza ont été ajoutés à 38mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 5% (p/v) de lécithine. Cette solution a été placée sous

agitation pendant 4 heures sous atmosphère inerte (nitrogène). La préparation a ensuite subi une sonication à 40kHz à 40% de la puissance maximale pendant 2 minutes afin d'obtenir une solution homogène. La solution de nanoliposomes de lécithine de colza ainsi obtenue a été conservée à 37°C à l'abri de la lumière en bouteille stérile (251).
La dilution de cette solution a ensuite été réalisée dans notre laboratoire dans du milieu de culture (DMEM-LG) afin d'obtenir les différentes concentrations de nanoliposomes que nous avons utilisé (5, 10, 20, 50, 100, 500 et 1000 µg/mL).

Huit conditions de culture des CSM-PD ont été réalisées avec différentes concentration de nanoliposomes :
(1) : DMEM (Gibco) supplémenté à 10% de SVF
(2) : DMEM 10% + 1000 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(3) : DMEM 10% + 500 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(4) : DMEM 10% + 100 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(5) : DMEM 10% + 50 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(6) : DMEM 10% + 20 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(7) : DMEM 10% + 10 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza
(8) : DMEM 10% + 5 µg/mL de nanoliposomes de lécithine de colza

Les CSMP-PD en passage trois ont été ensemencées à une densité de 1.10^3 cellules par cm^2 dans des plaques de culture 6 puits recouvertes de collagène et mises en culture au contact des nanoliposomes durant 7 jours.
Une évaluation de la cytoxicité des nanoliposomes et de la viabilité cellulaire a été réalisée.

3.3.1.1. Évaluation de la cytotoxicité des nanoliposomes sur les CSM-PD

Un test de dosage colorimétrique de la lactate déshydrogénase (LDH) a été réalisé à J1 pour évaluer le taux de mortalité cellulaire (Cytotoxicity Detection Kit ^{Plus} LDH, Roche).
Le principe du dosage LDH est de déterminer le taux de mortalité d'une population cellulaire. Une augmentation de la quantité de cellules mortes ou dont la membrane est endommagée entraîne une augmentation de l'activité enzymatique LDH dans le surnageant. Cette enzyme

réduit le sel de tétrazolium (jaune) en formazan (rouge). La quantité de formazan formée est directement proportionnelle au nombre de cellules lysées.
Des contrôles positifs (« *high control* ») et négatifs sur les cellules non traitées (« *low control* ») ont été réalisés ainsi qu'un contrôle du bruit de fond du milieu (« *background* »), en triplicat.

Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits suivant les 8 conditions de culture décrites précédemment et placées pendant 24 heures en incubateur en condition normoxiques à 37°C.
Dans les puits contenant les échantillons destinés au « *high control* », 5 µL de solution de lyse cellulaire (Lysis solution, Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} LDH, Roche) ont été ajoutés et la plaque a été incubée 15 minutes sous agitation douce.
Ensuite, pour déterminer l'activité de la lactate déshydrogénase, 100 µL de solution de réactif de détection (Dye solution + Catalyst, Cytotoxicity Detection Kit ^{Plus} LDH, Roche) ont été ajoutés à chaque puit. La plaque a été incubée à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière sous agitation douce puis lue sur lecteur de microplaque à 490 nm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

Le pourcentage de cytotoxicité a ensuite été calculé selon la formule suivante. :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Valeur expérimentale} - \text{low control}}{\text{High control} - \text{low control}}$$

3.3.1.2. Évaluation de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été utilisée par mesure de la quantité d'ADN par un test fluorométrique de quantification d'ADN au Hoechst 33342. Le Hoechst est un intercalant de l'ADN qui permet de déterminer la quantité de cellules vivantes dans un échantillon. En effet, le Hoechst 33342 a la capacité de pouvoir traverser les membranes cellulaires des cellules vivantes et de se fixer au niveau du petit sillon du double brin d'ADN au niveau des séquences riches en adénine et thymine. L'intensité de la fluorescence émise est lue en spectrophotométrie et peut ensuite être corrélée par une gamme étalon à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon.
Après 1, 3, 5 et 7 jours de culture dans les conditions décrites précédemment, les cellules ont été trypsinées (TypLE®, Gibco), puis centrifugées à 300 g pendant 10 minutes. Les culots ont

été repris dans 100 µL de tampon de Hoeschst (0,1 M NaCl (VWR Chemicals), 10 mM Tris (Sigma) et 1 mM acide éthylène-diamine-tétra-acétique (Sigma) dissous dans de l'eau distillée, pH 7,4).

Trois cycles de congélation (−80°C) et décongélation (37°C) ont été réalisés pour lyser les cellules puis la solution fluorescente au Hoechst 33342 (0,1 µg/ml, Sigma-Aldrich, USA) a été ajoutée à chaque échantillon. Deux cents µl de chaque échantillon ont été déposés en triplicat dans une nouvelle plaque 96 puits et la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde de 461 nm grâce à un lecteur de microplaque (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

Une courbe de dosage d'ADN standard a été réalisée selon une gamme étalon préparée avec de l'ADN de thymus de veau (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus, Sigma, D3664) pour déterminer la concentration de l'ADN dans les échantillons.

3.3.1.3. Évaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (MTT). Ce test permet de quantifier par colorimétrie le nombre de cellules viables en évaluant l'activité mitochondriale cellulaire : les mitochondries réduisent le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) en cristaux de formazan.

Après trois passages, les CSM-PD ont été ensemencées à la même densité que décrite précédemment en plaques 96 puits, toujours selon les 8 mêmes conditions de culture. Le test MTT a été réalisé après 1, 3, 5 et 7 jours de culture.

La solution de MTT a été préparée en dissolvant le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (Sigma) dans du PBS, puis filtrée et stérilisée. Après les intervalles de culture précédemment cités, (1, 3, 5 et 7 jours), les CSM-PD ont été incubées avec 5 mg/ml de solution MTT durant 4 heures à 37°C. La solution de MTT a été éliminée et les cristaux de bleu de formazan formés, témoins de la viabilité cellulaire, ont été solubilisés par incubation avec 200 µL de DMSO pendant 5 minutes à 37°C. Cent µL de la solution obtenue dans chaque puit ont été transférés dans une nouvelle plaque. L'absorbance a été mesurée au lecteur de microplaque à 540 nm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

L'absorbance obtenue par le test MTT a été normalisée par l'absorbance obtenue lors du test de Hoechst et calculée pour chaque échantillon (absorbance MTT/absorbance Hoechst).

3.3.2. Étude des effets du glucose sur le comportement des CSM-PD

3.3.2.1. Étude de l'influence du glucose sur la prolifération cellulaire des CSM-PD

Les CSM-PD de trois donneurs différents (n=3) en passage 3 ont été ensemencées en plaques 6 puits à la densité de 5000 cellules/cm^2. Elles ont été mises en culture pendant 21 jours en normoxie à 5% de CO_2 à 37°C.

Deux conditions de culture ont été choisies :
(1) Milieu de culture à faible concentration en glucose (1 g/L) : DMEM-LG (Gibco)
(2) Milieu de culture à haute concentration en glucose (4,5 g/L) : DMEM-HG (Gibco)

Les deux milieux de culture ont été supplémentés à 10% de SVF (Dutscher), 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL d'amphotéricine B (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine.

La prolifération cellulaire a été évaluée après 1, 3, 7, 14 et 21 jours de culture par mesure de la quantité d'ADN par un test fluorométrique de quantification d'ADN au Hoechst 33342, selon le même protocole que décrit en 3.3.1.2.

3.3.2.2. Étude de l'influence du glucose sur la viabilité cellulaire des CSM-PD

Les CSM-PD de trois donneurs différents (n=3) en troisième passage ont été mises en culture en plaques 96 puits à la densité de 5000 cellules/cm^2, en conditions normoxiques et à 37°C.
Les deux mêmes conditions de culture ont été choisies (milieu de culture à faible (1 g/L) et haute (4,5 g/L) concentration en glucose) que pour l'évaluation de la prolifération cellulaire. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine.
Après 1, 3, 7, 14 et 21 jours de culture, un test MTT a été réalisé pour évaluer la viabilité cellulaire, selon le même protocole que décrit précédemment.
L'absorbance obtenue par le test MTT a été normalisée par l'absorbance obtenue lors du test de Hoechst absorbance et calculée pour chaque échantillon.

3.3.2.3. Étude de l'influence du glucose sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

Afin d'évaluer l'influence de la teneur en glucose du milieu sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD, les cellules en passage 3 de trois donneurs différents (n=3) ont été incubées pendant 28 jours en plaques 6 puits et 24 puits à la densité de 5000 cellules/cm^2, en conditions normoxiques à 5% de CO_2 et à 37°C.

Quatre conditions de culture ont été utilisées :
(1) DMEM-LG (1 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco)
(2) DMEM-HG (4,5 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco)
(3) DMEM-LG (1 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco) avec ajout d'un cocktail de différenciation ostéogénique : acide ascorbique 50 µM (Sigma Aldrich), dexaméthasone 100 nM (Sigma Aldrich), β-glycérophosphate 10 mM (Sigma Aldrich)
(4) DMEM-HG (4,5 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco) avec ajout d'un cocktail de différenciation ostéogénique : acide ascorbique 50 µM (Sigma Aldrich), dexaméthasone 100 nM (Sigma Aldrich), β-glycérophosphate 10 mM (Sigma Aldrich)

Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine.

Après 28 jours de culture, nous avons évalué la différenciation ostéogénique par une coloration en plaque au Rouge Alizarine, une mesure semi-quantitative colorimétrique de la coloration au Rouge Alizarine et une détermination de l'expression génique de marqueurs de différenciation ostéogénique par *real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR).

- Coloration en plaque au rouge alizarine

Après 28 jours de culture dans les 4 conditions décrites précédemment, les CSM-PD ensemencées en plaques 24 puits ont été rincées trois fois au PBS 10X à pH 7,4 puis fixées pendant 15 minutes dans une solution à 4% de paraformaldéhyde à température ambiante.

Après trois lavages à l'eau distillée, une solution de Rouge Alizarine (Sigma-Aldrich) (2%, p/v dans eau distillée), filtrée et au pH ajusté à 4,3 a été déposée dans les puits et les plaques ont été incubées 45 minutes à température ambiante. Après trois nouveaux lavages des puits à l'eau distillée, les nodules de calcification ont été visualisés en microscopie optique conventionnelle.

- Évaluation semi-quantitative colorimétrique de la minéralisation

La minéralisation a été évaluée par l'extraction des nodules de minéralisation calcifiés selon le protocole décrit par Gregory *et al* (354). Deux cents µL de solution d'acide acétique (Sigma-Aldrich) à 10% ont été ajoutés à chaque puit de culture et les plaques ont été incubées sous agitation douce à température ambiante pendant 30 minutes. La couche cellulaire a été collectée avec un racloir, transférée avec la solution d'acide acétique dans des micro-tubes et chauffée pendant 10 minutes à 85°C. Les échantillons ont ensuite été refroidis pendant 5 minutes dans la glace puis centrifugés à 20000 g pendant 15 minutes. Deux cents µL de surnageant de chaque échantillon ont été transférés dans un nouveau tube et le pH a été ajusté (pH : 4,3) avec 75 µL d'une solution à 10% d'hydroxyde d'ammonium (Sigma-Aldrich). Cent cinquante µL de chaque échantillon ont été transférés en triplicat en plaques 96 puits et l'absorbance mesurée au lecteur de microplaque à 405 nm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). La concentration de la coloration au Rouge Alizarine a été calculée selon une courbe standard.

- Analyses de l'expression génique de marqueurs de différenciation ostéogénique par RT-qPCR

Après 28 jours de culture dans les conditions décrites précédemment, l'expression génique de *RUNX2*, *OCN* et *COL1A1* (*collagen type I alpha 1 chain*) par les CSM-PD ensemencées en plaques 6 puits a été mesurée.
L'extraction de l'acide ribonucléique (ARN) de chaque échantillon a été réalisée en utilisant le kit Direct-zol ™ RNA MiniPrep (Zymo Research). Après rinçage au PBS 10X, 700 µL de QIAzol®Lysis Reagent (QIAGEN) ont été ajoutés à chaque puit et chaque échantillon a été transféré dans un microtube. Sept cents µL d'éthanol absolu (Carlo Erba Reagents) ont été ajoutés dans chaque microtube. Les échantillons ont été transférés sur colonnes, centrifugés et ont été ajoutés 400 µL de RNA Wash Buffer (kit Direct-zol ™ RNA MiniPrep, Zymo Research). Après une nouvelle centrifugation, les colonnes ont été incubées 15 minutes à

température ambiante avec 80 µL de solution de DNAse 1 (kit Direct-zol ™ RNA MiniPrep, Zymo Research). Des étapes de lavages au Direct-zol RNA PreWash et RNA Wash Buffer (kit Direct-zol ™ RNA MiniPrep, Zymo Research) ont été réalisées, séparées de centrifugations des colonnes. Après transfert des colonnes dans des nouveaux tubes, 50 µL d'eau RNase-free ont été ajoutés et les tubes centrifugés à vitesse maximale (16000 g) pendant 1 minute à 4°C. Les ARN ont ensuite été dénaturés à 65°C pendant 5 minutes puis remis sur glace. Le dosage de la quantité d'ARN a été réalisé au lecteur NanoDrop One (Thermo Scientific, Ozyme).

Cinquante ng de l'ARN total ont ensuite été transcrits en acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) en utilisant le kit de synthèse d'ADNc iScript™ Reverse Transcription Supermix pour RT-qPCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, Biorad). Pour chaque échantillon, 4 µL d'iScript Reaction Mix, 1 µL d'iScript Reverse Transcriptase et un volume variable d'eau RNAse-DNAse-free (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Biorad) ont été ajoutés. Les échantillons ont subi une incubation selon le cycle de variation de température suivant (Mastercycler gradient®, Eppendof) : 5 minutes à 25°C, 20 minutes à 46°C et 1 minute à 95°C.

La RT-qPCR a ensuite été réalisée en utilisant le kit iTaq™ Universal SYBER® Green Supermix (Biorad) et le système StepOne Plus Apparatus (Real Time PCR System, Applied Biosystem, USA). Pour chaque gène, un mix de PCR a été préparé (amorce sens, amorce anti-sens, eau RNase-DNase free et Syber (kit iTaq™ Universal SYBER® Green Supermix, Biorad). Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 14.

Gènes	Amorces	Séquences (5'-3')
RUNX2	Sens Anti-sens	CCCGTGGCCTTCAAGGT CGTTACCCGCCATGACAGTA
OCN	Sens Anti-sens	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT TCAGCCAACTCGTCACAGTC
COL1A1	Sens Anti-sens	AGGTGCTGATGGCTCTCCT GGACCACTTTCACCCTTGT
RP29	Sens Anti-sens	AGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG AGACACGACAAGAGCGAGAA

Tableau 14 : amorces utilisées lors de l'analyse par RT-qPCR.

Quatre µL de chaque échantillon ont été déposés en plaques de PCR et 16 µL du mix de PCR pour chaque gène ont été ajoutés par puit (une plaque par gène).

Après agitation douce et centrifugation 1 minute à 150 g, la plaque a été lue à l'aide du système StepOne Plus Apparatus (Real Time PCR System, Applied Biosystem, USA).

L'expression génique a été calculée par la méthode comparative des delta CT ($2^{-\Delta ct}$) après avoir été normalisée à la valeur du gène de ménage de la protéine ribosomale (*RP29*).

3.3.3. Étude de l'effet de la densité d'ensemencement sur les CSM-PD

3.3.3.1. Effets sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD

Les CSM-PD de trois donneurs différents (n=3) ont été ensemencées en plaques 96 puits et en plaques 6 puits à deux densités d'ensemencement : 1) 5000 cellules/cm^2, 2) 2500 cellules/cm^2. Deux mL de milieu DMEM-LG ont été ajoutés à chaque puit.
Les plaques ont été placées en conditions normoxiques et à 37°C pendant 21 jours.
À 1, 3, 7, 14 et 21 jours de culture, des tests MTT et de Hoechst ont été réalisés selon le même protocole que décrit précédemment. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine.
L'absorbance obtenue par le test MTT a été normalisée par l'absorbance obtenue lors du test de Hoechst absorbance et calculée pour chaque échantillon.

3.3.3.2. Effets sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

Les CSM-PD de trois donneurs différents (n=3) ont été ensemencées en plaques 24 puits et à deux densités d'ensemencement : (1) 5000 cellules/cm^2 (2) 2500 cellules/cm^2. Après 28 jours de culture avec du milieu basal (DMEM-LG) et du milieu d'induction ostéogénique, la différenciation ostéogénique des CSM-PD a été évaluée par coloration au Rouge Alizarine et quantification de cette coloration comme décrit précédemment.

3.4. Développement d'un biomatériau composite associant éponges de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en HA, ensemencé par des CSM-PD

Préalablement à l'utilisation des CSM-PD pour ensemencer nos biomatériaux, nous avons effectué une mise au point de cette expérimentation en utilisant des CSM-MO humaines. Ces CSM-MO sont utilisées au sein de notre équipe de recherche et sont issues de têtes fémorales obtenues après consentement du patient lors de poses de prothèses totales de hanches réalisées dans le service de chirurgie orthopédique, traumatologique et arthroscopique du CHRU de Nancy. Nous avons réalisé l'ensemencement des CSM-MO dans les biomatériaux dans les

mêmes conditions que pour les CSM-PD, décrites ci-dessous, avec une durée de mise en culture de 21 jours (données non présentées).

3.4.1. Biomatériaux utilisés

Les éponges de collagène (Figure 17) utilisées sont des cylindres de 10 mm de diamètre sur 4 mm d'épaisseur, composées de collagène I (95%) et de collagène III (5%) et fabriquées par la société Symatèse Biomatériaux (Chanopost, France).

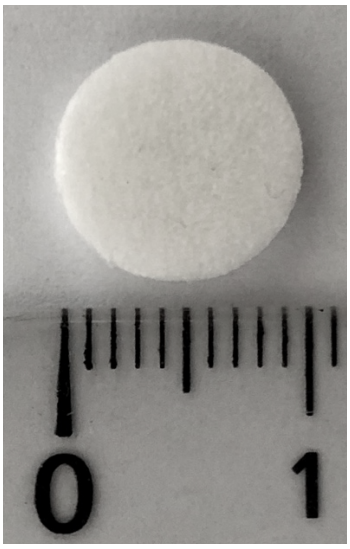


Figure 17 : biomatrice de collagène utilisée pour l'ensemencement des CSM-PD. Échelle : 0-1 cm.

Quatre types de biomatériaux associés ou non à un hydrogel ont été utilisés :
(1) Éponges de collagène seules
(2) Éponges de collagène associées à un hydrogel d'alginate 1%
(3) Éponges de collagène associées à un hydrogel d'alginate enrichi en HA
(4) Éponges de collagène associées à un hydrogel d'alginate enrichi en billes de borosilicate

3.4.2. Préparation des hydrogels

- Hydrogel d'alginate 1%

Une solution d'alginate à 1% contenant 100 mg d'alginate (*Alginic acid sodium salt from brown algue*, Sigma) et 10 mL de chlorure de sodium (NaCl) a été préparée. Cent mg d'alginate ont

été stérilisés avant utilisation, et la solution reconstituée a été mise en agitation 12 heures avant utilisation.

- Hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite

Après stérilisation des poudres, une solution a été préparée en dissolvant 50 mg d'HA (Hydroxylapatite phosphocalcic, Teknimed S.A) et 50 mg d'alginate dans 10 mL de NaCl puis mise en agitation 24 heures avant utilisation. La taille des particules d'HA est comprise entre 5 et 30 µm.

- Hydrogel d'alginate enrichi en billes de borosilicate

Une solution composée de deux poudres préalablement stérilisées, à quantité égale de borosilicate (Dry Soda Lime Microspheres, Duke Scientific Corporation) et d'alginate a été préparée en dissolvant 50 mg d'alginate et 50 mg de borosilicate dans 10 mL de NaCl. Les deux poudres ont été stérilisées avant dissolution dans le NaCl et la solution a été mise en agitation 24 heures avant utilisation. La taille des particules de borosilicate est identique à celles des particules d'HA utilisées (5 à 30 µm). Nous avons ainsi choisi de les utiliser afin de nous assurer que les résultats obtenus avec l'ajout d'HA dans nos biomatériaux résultaient bien de ses propriétés intrinsèques et non de leurs propriétés physico-chimiques uniquement liées à leur structure particulaire.

3.4.3. Ensemencement des CSM-PD dans les biomatériaux et milieux de culture utilisés

Après isolement et expansion des CSM-PD en boites de Pétri (55 cm^2), deux millions de CSM-PD en passage 2 ont été ensemencées au sein de chaque biomatériau (6.10^3 cellules/mm^3). Ces CSM-PD provenaient de trois patients différents et ont été poolées pour l'ensemencement.

- Ensemencement des CSM-PD dans les éponges seules

Les cellules ont été re-suspendues dans du milieu de culture et 100 µL de milieu contenant 2 millions de cellules ont été déposés à la surface de chaque éponge disposée dans des plaques

48 puits (une éponge par puit). Les plaques ont été incubées 4 heures en condition normoxiques à 37°C puis les éponges ont été transférées en plaques 24 puits (une éponge par puit). Un mL de milieu a été ajouté à chaque puit et les plaques ont été remises dans l'incubateur.

- Ensemencement des CSM-PD dans les éponges associées à un hydrogel d'alginate 1%

Les éponges de collagène ont été placées en plaques 48 puits (une éponge par puit). Les cellules ont été re-suspendues dans la solution d'alginate à 1% et 100 µL de suspension cellulaire contenant 2 millions de CSM-PD ont été déposés à la surface de chaque éponge. Les éponges ont été immergées 15 minutes dans une solution de chlorure de calcium $CaCl_2$ (102mM, BDH, Prolabo) à température ambiante en plaque 6 puits, rincées au NaCl puis remises en plaques 24 puits (une éponge par puit) avec 1 mL de milieu de culture par puit.

- Ensemencement des CSM-PD dans les éponges associées à un hydrogel d'alginate 1% enrichi en hydroxyapatite ou en borosilicate

De la même façon que pour l'ensemencement dans les éponges associées à l'hydrogel d'alginate, les cellules ont été re-suspendues soit dans la solution d'alginate enrichie en HA, soit dans la solution d'alginate enrichie en borosilicate, et 100 µL contenant 2 millions de CSM-PD ont été déposés à la surface de chaque éponge en plaques 48 puits. Les éponges ont été également polymérisées 15 minutes grâce à la même solution de $CaCl_2$, rincées au NaCl et remises en plaques 24 puits en incubation avec 1 mL de milieu de culture par puit.

Pour chaque type de biomatériau, trois conditions de culture ont été choisies :

(1) Milieu de culture basal : DMEM-HG (4,5 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL de pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco)

(2) Milieu de différenciation ostéogénique : DMEM-HG (4,5 g/L) supplémenté à 10% de SVF (Dutscher) + 5,5 mL pyruvate (100 mM, Gibco) + 100 U/mL pénicilline (Gibco), 100 µg/mL streptomycine (Gibco) avec ajout d'un cocktail de différenciation ostéogénique : acide ascorbique 50 µM (Sigma Aldrich), dexaméthasone 100 nM (Sigma Aldrich), β-glycérophosphate 10 mM (Sigma Aldrich)

(3) Milieu de différenciation ostéogénique commercial : DMEM + SVF + L-Glutamine + suppléments (MACS™ OsteoDiff Media, Miltenyi Biotech)

Les 36 biomatériaux ainsi préparés ont été cultivés pendant 28 jours en environnement normoxique (21% O_2, 5% CO_2) à 37°C. Les milieux de culture étaient changés deux fois par semaine.

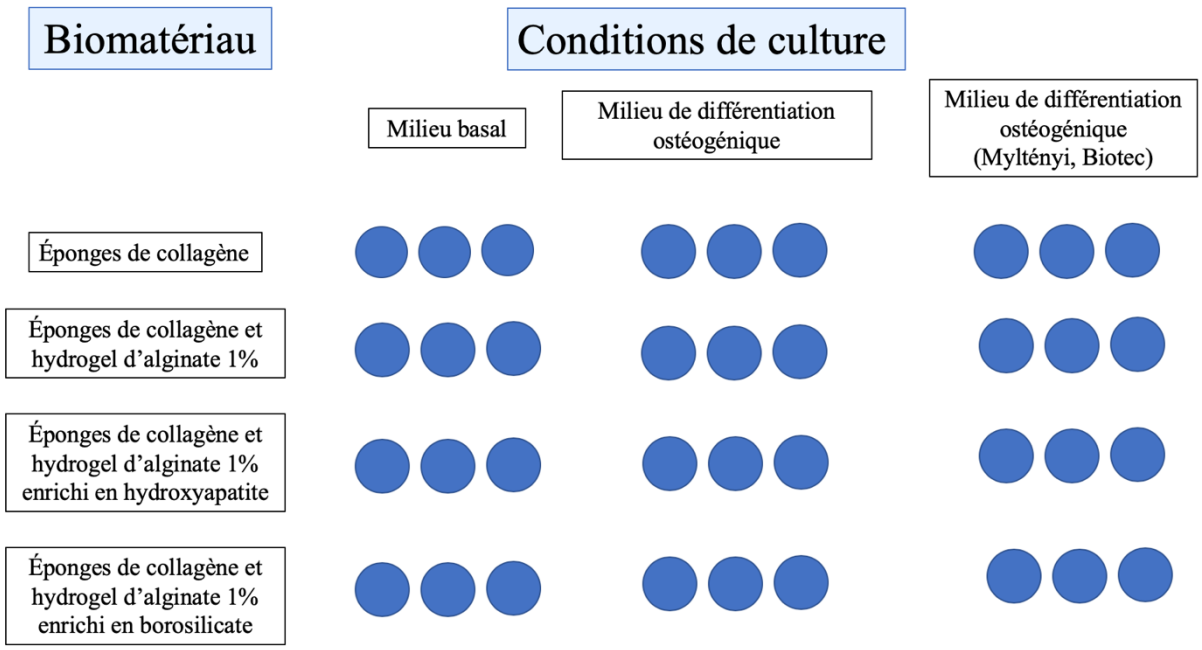


Figure 18 : répartition des 36 biomatériaux selon leur composition et leurs conditions de culture.

Après 28 jours de culture, les biomatériaux ont été fixés dans une solution à 4% de PAF (p/v dans PBS) pendant 4 heures à 4°C puis déshydratés et inclus en paraffine.

3.4.4. Analyses histologiques

Des coupes histologiques d'une épaisseur de 5 µm des 36 biomatériaux inclus en paraffine après 28 jours de culture ont été réalisées au microtome (Leica RM 2135, France).

Après déparaffinage, des colorations histologiques au Rouge Alizarine, à l'Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) et au Von Kossa des coupes histologiques ont été réalisées. Après coloration, les lames ont été montées à la résine (PERTEX®, HistoLab) pour analyse en microscopie optique (DMD 108, Leica, France) et numérisées à différents grossissements (x4, x10, x20 ou x40).

- Coloration au Rouge Alizarine

Le Rouge Alizarine est un colorant qui se fixe au calcium par chélation et permet ainsi de marquer les dépôts calciques tissulaires. La coloration a été réalisée par immersion des lames durant 5 minutes dans une solution de Rouge Alizarine (Alizarin Red S, Sigma Aldrich) (2% p/v dans eau distillée, pH 4,2) suivies d'un lavage à l'eau distillée et de passage dans des bains d'acétone puis de substitut de xylène (Tissue-Clear®, Tissue-Tek®).

- Coloration à l'Hématoxyline-Éosine-Safran

Cette coloration standard permet d'apprécier l'architecture, la morphologie tissulaire et de visualiser les éléments cellulaires. Ainsi, l'hématoxyline (0,5%, 5 minutes) donne une coloration nucléaire bleue foncé, l'éosine (1%, 5 minutes) colore en rose les éléments acidophiles (cytoplasme) et le safran (1%, 5 minutes) confère une coloration jaune au collagène. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée et déshydratées dans des bains d'alcool croissants.

- Coloration de Von Kossa

Le Von Kossa marque les précipités phosphocalciques au sein des tissus via une réaction de précipitation : des ions argent apportés par une solution de nitrate d'argent réagissent avec les ions calciques, liés au phosphate, permettant ainsi de marquer les sites de calcification au sein du tissu. Les lames sont réhydratées par des bains d'alcool de concentration décroissante, rincées à l'eau distillée puis incubées une heure dans une solution de nitrate d'argent 2% sous exposition lumineuse à 60 Watt. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, déshydratées dans des bains d'alcool croissants puis contre-colorées 30 secondes à l'éosine.

3.4.5. Analyses immunohistochimiques

Des coupes histologiques des biomatériaux ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les colorations histologiques précédemment mentionnées.

Une analyse par immunohistochimie des différentes coupes a été réalisée avec des anticorps primaires ciblant soit l'OCN (lapin, Abcam), l'OPN (souris, Abcam), PECAM-1 (lapin, Abcam) ou VE-Cadhérine (clone D87F2, lapin, Cell Signaling Technology).

Pour chaque anticorps, après déparaffinage, les lames ont été lavées à l'eau distillée, chauffées 10 minutes dans une solution de tampon citrate (10 mM, pH 6), lavées dans des bains de solution de PBS (1X) -Tween® 20 (Sigma Aldrich) à 0,05% et séchées. Une barrière hydrophobe a été délimitée autour des coupes histologiques (Pap Immunostaining Pen, Kisker Biotech). Les peroxydases endogènes ont été bloquées par trempage des lames dans une solution d'eau oxygénée (H_20_2) à 3% (Sigma) pendant 20 minutes. Après lavage des lames, les épitopes non spécifiques ont été bloqués par ajout de sérum 2,5 % (Normal Horse Serum, kit ImmPRESS™ HRP Reageant, Vector) durant 20 minutes. Les coupes histologiques ont ensuite été incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de BSA (Sérum-Albumine Bovine, Euromedex) à 5%. Après lavage au PBS 1X, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire (anticorps universel, kit ImmPRESS™ HRP Reageant, Vector) durant 30 minutes. La solution de révélation streptavidine-peroxydase couplée au chromogène 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (kit Permanent AEC substrate/chromogen system, Zytomed Systems) a ensuite été déposée sur les coupes. Les lames ont été lavées à l'eau distillée puis contre-colorées à l'hématoxyline 15 secondes. Après nouveau lavage à l'eau distillée, les lames ont été déshydratées dans des bains d'alcool successifs croissants et montées.

3.5. Analyses statistiques

Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicat à partir des cellules provenant de trois patients différents (n=3).

Les données sont présentées en moyennes ± écarts-types à l'exception des données de la quantification de la coloration au Rouge Alizarine qui sont présentées sous forme de médianes.

Les différences entre les différents groupes ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Inc, USA). Lorsque deux groupes ont été comparés, le test de Mann-Withney a été utilisé, et les tests de Kruskal-Wallis et ANOVA lorsque 3 groupes ou plus ont été comparés.

Le seuil de significativité a été retenu pour une valeur de p inférieure à 0,05 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractérisation phénotypique des CSM-PD par cytométrie en flux

Avant d'utiliser les cellules pulpaires, une expansion cellulaire en monocouche est une étape essentielle pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Comme les CSM-PD proviennent d'un tissu riche en différents types cellulaires, il est nécessaire de vérifier leur phénotype avant de réaliser nos différentes expérimentations.

Le but de cette étude est de vérifier que les cellules utilisées présentent bien le profil phénotypique spécifique des CSM. L'expression des marqueurs de surface (CD34, 44, 45, 73, 90, 105 et HLA-DR) a donc été analysée après culture en monocouche dans des boites de culture dont les puits sont recouverts de collagène I.

Le phénotype des CSM-PD en passage 3 de trois patients différents a été caractérisé par cytométrie en flux et les résultats analysés sur le logiciel Kaluza™.

L'expression des marqueurs de surface des CSM-PD analysées est présentée dans la figure 19. Les résultats mettent en évidence la présence d'une population cellulaire avec une expression des marqueurs de surface caractéristiques des CSH (CD34 et CD45) ainsi que du marqueur d'immunogénicité HLA-DR de 0,02%. Comme attendu, on note que les CSM-PD présentent un pourcentage de cellules positives aux marqueurs spécifiques des CSM définis par l'IST CD73 (99,72%), CD 90 (81,69%) et CD105 (66,89%) ainsi que de CD44 (99,55%), glycoprotéine de surface exprimée par les CSM-PD (42,47) (Tableau 15, Figure 19).

MARQUEUR	**POURCENTAGE DE CELLULES POSITIVES** (moyennes ± écart type)
CD44	99,55±0,51
CD73	99,72±0,11
CD90	81,69±7,81
CD105	66,89±2,84
HLA-DR/CD34/CD45	0,02±0,01

Tableau 15 : résultats des analyses par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaires des CSM-PD. (n=3).

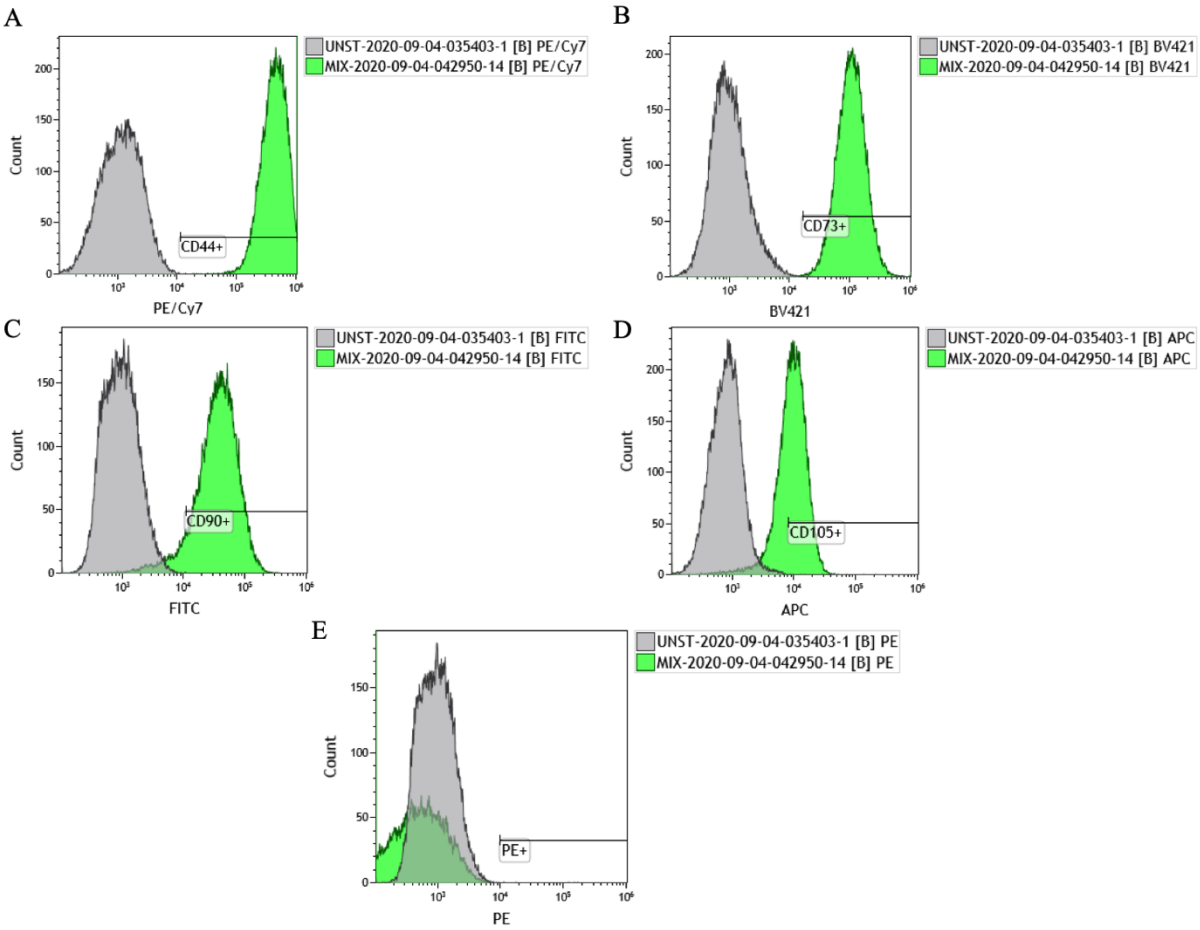


Figure 19 : analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaires des CSM-PD. A : marqueur CD44 ; B : marqueur CD73 ; C : marqueur CD90 ; D : marqueur CD105 ; E : contrôle isotype PE.

Par ailleurs, les CSM-PD en passage 3 présentaient une morphologie fibroblastique caractéristique (Figure 20).

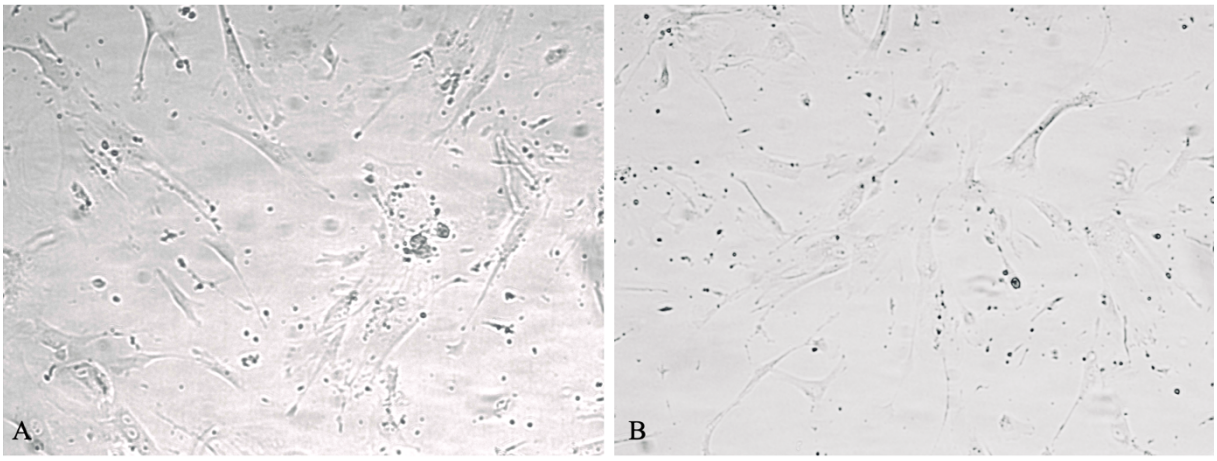


Figure 20 : aspect des CSM-PD en passage 3 en microcopie optique : cellules fusiformes à morphologie fibroblastique. A : optique x10 ; B : optique x20.

L'expression de ces différents marqueurs (CD73/90/105) a permis de confirmer que la population cellulaire étudiée est bien constituée de CSM, selon les critères de l'ISCT (42). Par ailleurs, nous avons objectivé que 99,55% de nos CSM-PD expriment CD44, marqueur crucial des CSM et dont l'expression par les CSM-PD issues de troisièmes molaires a déjà été démontrée (47). Par ailleurs, même si les mécanismes exacts en sont encore à élucider, CD44 est également un facteur d'adhésion cellulaire impliqué dans l'induction de la minéralisation par les CSM-PD et surexprimé par les ostéoblastes, odontoblastes et améloblastes dérivés de ces CSM-PD (355,356). Son expression par la quasi-totalité de nos CSM-PD en passage 3 peut donc être un facteur de bon pronostic pour l'utilisation de ces CSM-PD en ingénierie tissulaire osseuse et l'obtention d'une différenciation ostéogénique.
Nous avons également pu constater des différences d'expression phénotypique dans les différents marqueurs et les différentes souches de nos CSM-PD, notamment pour l'expression de CD105 (moyenne de 66,89% de cellules positives). Ces variations d'expression pourraient être expliquées par le fait que les CSM-PD représentent en fait une population cellulaire hétérogène constituée de plusieurs sous populations avec différents phénotypes, ce que des travaux de caractérisation phénotypique des CSM-PD ont pu mettre en évidence (47).

Nous avons mis en évidence que les cellules que nous avons utilisées sont bien des CSM, c'est-à-dire des cellules exprimant à la fois CD73/90/105 et également CD44, mais n'exprimant pas les marqueurs hématopoïétiques CD34 et 45 ainsi que HLA-DR.

4.2. Stimulations environnementales des CSM-PD

Nous avons choisi d'étudier l'impact de plusieurs facteurs environnementaux sur le comportement de nos CSM-PD. Ainsi, nous avons étudié les effets de la mise en contact de nanoliposomes de lécithine de colza, de l'influence de la densité d'ensemencement cellulaire ainsi que de la teneur en glucose du milieu de culture sur la prolifération, la viabilité et la différenciation ostéogénique de nos cellules.

4.2.1. Étude des effets *in vitro* de vésicules de taille nanométriques (nanoliposomes) sur les CSM-PD

Pour permettre de différencier les CSM en une lignée cellulaire donnée, il est nécessaire d'avoir recours à des facteurs de croissance spécifiques, d'un coût important et d'une demi-vie très

limitée. L'encapsulation de ces facteurs de croissance au sein de vecteurs tels que les nanoliposomes peut constituer une option intéressante (357). Leur utilisation nécessite d'évaluer dans un premier temps la biocompatibilité de ces nanoliposomes « nus » vis-à-vis de notre type cellulaire avant d'envisager leur utilisation en tant que vecteurs de facteurs de croissance.

Nous avons donc étudié l'impact de ces nanoliposomes « nus » sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD

4.2.1.1. Évaluation de la cytotoxicité des nanoliposomes sur les CSM-PD

Pour les différentes concentrations de nanoliposomes utilisées (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL), le test de cytotoxicité réalisé après 24 heures de culture n'a pas démontré de différence significative par rapport à la condition de culture contrôle sans nanoliposomes (p>0,05). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 21.

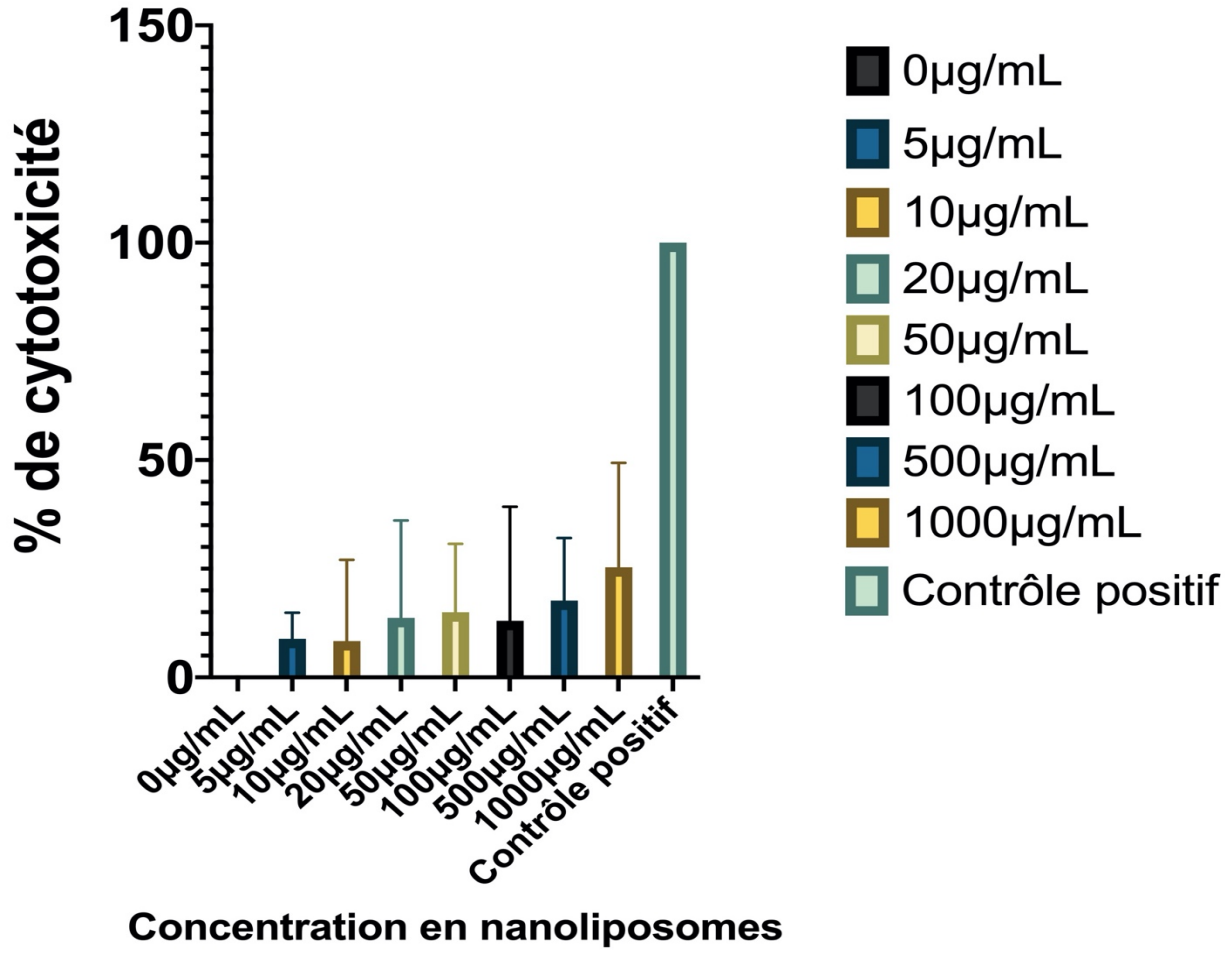


Figure 21 : effets de la concentration en nanoliposomes en termes de cytotoxicité sur les CSM-PD à 24 heures de culture (moyennes ± écarts types) (n=3). Contrôle positif : solution de lyse cellulaire.

La détection de la lactate déshydrogénase extracellulaire réalisée après 24 heures d'exposition aux nanoliposomes de colza a ainsi mis en évidence une absence de toxicité de ces nanovésicules sur les CSM-PD.

Il n'existe que peu de travaux publiés dans la littérature évaluant la cytotoxicité des nanoliposomes de lécithine de colza.

Des travaux antérieurs réalisés dans notre équipe avaient déjà montré que les nanoliposomes de colza utilisés aux mêmes concentrations (de 5 à 1000 µg/mL) ne présentaient pas de toxicité vis-à-vis de deux autres types de cellules humaines : CPE issues de sang de cordon ou de CSM-

GW, après 24 heures de contact. Nous avons donc recherché cette absence de toxicité des nanoliposomes sur un autre type de CSM : les CSM-PD (358).

L'absence de cytotoxicité des nanoliposomes à la concentration de 50, 100 et 200 µg/mL sur les CSM-GW a été démontrée par Kaci *et al* en 2016 (357) : le test LDH réalisé après 24 heures d'exposition des CSM à des nanoliposomes de lécithine de colza n'avait démontré aucune différence significative avec le contrôle (CSM non traitées). Cette même équipe a obtenu des résultats similaires sur des fibroblastes cutanés humains, avec un test LDH à 24 heures d'exposition confirmant ainsi l'absence de cytotoxicité de la lécithine de colza (359).

Enfin, d'autres travaux réalisés au sein de notre laboratoire (253) ont évalué la toxicité des nanoliposomes de colza sur des chondrocytes murins exposés à une concentration croissante de nanovésicules (20 µg/mL à 1000 µg/mL). Le test LDH réalisé après 3, 5 et 7 jours d'exposition n'avait pas montré d'effet toxique significatif (p>0,05) sur les chondrocytes aux concentrations allant de 20 à 500 µg/mL, quelle que soit la durée d'exposition. Seule la concentration la plus élevée (1000 µg/mL) semblait être toxique pour les cellules aux différents temps évalués.

Cette différence avec l'innocuité des nanoliposomes que nous avons observé sur nos cellules à la concentration de 1000 µg/mL pourrait s'expliquer soit par la durée d'exposition plus courte des cellules aux nanoliposomes (24 heures *vs* 3 à 7 jours), soit par les propriétés intrinsèques des CSM-PD, démontrant potentiellement une plus grande plasticité et résistance de ces cellules vis-à-vis des stimulations environnementales par rapport à d'autres types cellulaires.

4.2.1.2. Évaluation de la prolifération et viabilité cellulaire

La mesure de la quantité d'ADN par un test fluorométrique de quantification d'ADN au Hoechst 33342 réalisée après 1, 3, 5 et 7 jours de culture n'a pas montré de différence significative de la prolifération cellulaire des CSM-PD suivant les différentes conditions de culture et la concentration de nanoliposomes mis au contact des cellules (p>0,05) (données non présentées).

Le test colorimétrique MTT normalisé par quantité d'ADN pour chaque échantillon n'a pas montré de différence significative en termes de viabilité cellulaire des CSM-PD pour les différentes concentrations de nanoliposomes appliquées (p>0,05), quel que soit le jour de culture (J1, J3, J5, J7). Ces résultats sont résumés dans la figure 22.

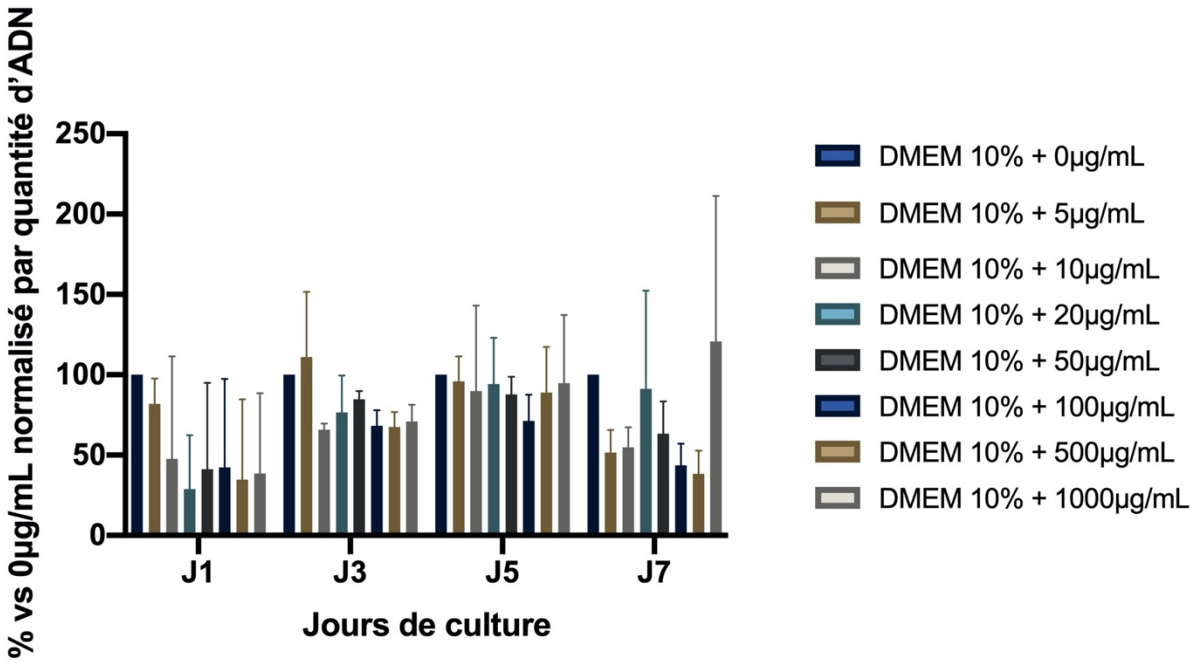


Figure 22 : effets de la concentration en nanoliposomes sur la viabilité cellulaire des CSM-PD aux différents jours de culture (moyennes ± écarts types). (n=3).

Ces résultats de nos travaux ont montré que l'exposition des CSM-PD aux différentes concentrations de nanoliposomes n'avait pas d'impact significatif (p>0,05) sur la prolifération (données non présentées) et la viabilité de ces cellules, quelles que soient la durée d'exposition (J1, J3, J5 ou J7) et la concentration utilisée (entre 5 µg/mL et 1000 µg/mL).

Très peu d'études ont été publiées sur l'impact des nanoliposomes de lécithine de colza sur la prolifération et l'activité métabolique cellulaire. Elles ont montré une biocompatibilité des nanoliposomes lorsqu'ils étaient mis au contact de CSM-GW (357) et de fibroblastes humains (359) durant 1, 3 et 7 jours. Dans ces études, la prolifération cellulaire semblait augmenter progressivement jusqu'à J7. Par ailleurs, l'exposition des CSM-GW aux nanoliposomes (357) avait entrainé une augmentation de l'activité métabolique et de la viabilité cellulaire visibles à J3 mais une diminution de cette viabilité à J7. Dans cette étude, les auteurs ont émis les hypothèses soit d'une réduction de l'activité liée à une confluence cellulaire trop importante entrainant un détachement des cellules et donc une diminution de l'activité métabolique, soit d'un changement phénotypique des CSM.

Les travaux antérieurs réalisés dans notre équipe dans les mêmes conditions de culture sur les CPE que sur nos CSM-PD n'ont pas montré non plus de différence significative sur la

prolifération et viabilité cellulaire entre les jours de test selon la concentration en nanoliposomes (358). La même expérimentation réalisée sur des CSM-GW a montré une prolifération augmentant de façon régulière au cours des sept jours de culture, sans différence entre les différentes conditions (avec ou sans nanoliposomes). Il a été également mis en évidence une altération de la viabilité à J7 pour des nanoliposomes utilisés à des concentrations de 100, 500 et 1000 µg/mL (p<0.05), alors que nous n'avons pas observé de modification de la viabilité des CSM-PD au cours des 7 jours de culture quelle que soit la concentration en nanoliposomes utilisée.

A notre connaissance, aucune étude publiée dans la littérature n'a évalué la biocompatibilité des nanoliposomes de lécithine de colza avec les CSM-PD.

Les résultats que nous avons obtenu dans cette partie de nos travaux semblent démontrer à la fois l'absence de cytotoxicité des nanoliposomes sur les CSM-PD et une absence d'effet négatif de ces nanoliposomes sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD, y compris aux plus fortes concentrations. Les CSM-PD semblent ainsi présenter une résistance intéressante à certaines stimulations environnementales comme l'exposition aux nanoliposomes de lécithine de colza, quelle que soit la concentration employée. Cette aptitude des CSM-PD pourrait être employée pour bénéficier des propriétés d'encapsulation des nanoliposomes de colza et potentialiser leurs capacités intrinsèques en ingénierie tissulaire osseuse. Certains facteurs de croissance et cytokines comme ceux de la famille des BMP ou de la superfamille du TFG-β pourraient ainsi être vectorisés par les nanoliposomes de lécithine de colza sans induire de cytotoxicité ni de problèmes de biocompatibilité avec les CSM-PD.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de prolifération des CSM-PD au cours des 7 jours de culture. Cela pourrait être lié au fait que nous avions choisi une densité d'ensemencement similaire à celle des CSM-GW (utilisées dans des travaux antérieurs du laboratoire), à savoir 1.10^3 cellules/cm^2, afin de pouvoir comparer ces deux types cellulaires. Cette densité d'ensemencement initiale nous a donc semblé insuffisante pour les CSM-PD, raison pour laquelle les expérimentations suivantes ont été réalisées avec une densité de 5.10^3 cellules/cm^2.

Il ressort de cette étude que les nanoliposomes ne semblent pas présenter de toxicité. Néanmoins, ces résultats devront être confirmés par une expérimentation complémentaire réalisée avec une densité d'ensemencement de 5.10^3 cellules/cm^2 utilisée pour nos autres expérimentations.

4.2.2. Étude des effets du glucose sur le comportement des CSM-PD

Dans cette partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux effets de deux concentrations en glucose sur nos CSM-PD. Nous avons choisi deux concentrations en glucose qui correspondent aux deux milieux classiquement utilisés en routine pour la culture cellulaire des CSM (DMEM-LG et DMEM-HG) : l'un à faible (5,5 mM) et l'autre à forte (20 mM) teneur en glucose. Par ailleurs, *in vivo*, ces deux teneurs en glucose sont considérées l'une comme une concentration physiologique du sérum (5,5 mM) et l'autre (20 mM) comme une condition assimilable à un environnement hyperglycémique, qui peut être retrouvé chez par exemple chez le patient diabétique.

4.2.2.1. Étude de l'influence du glucose sur la prolifération cellulaire des CSM-PD

Les résultats obtenus par le test de Hoechst (Figure 23) n'ont pas montré de différence significative (p>0,05) en termes de prolifération cellulaire entre les CSM-PD mises en culture avec le milieu à faible concentration en glucose (DMEM-LG) et à forte concentration en glucose (DMEM-HG). Les CSM-PD semblent avoir synthétisé une quantité d'ADN croissante jusqu'au 7ème jour de culture et décroissante au-delà jusqu'au 21ème jour de culture sans différence significative (p>0,05). Au 7ème jour de culture, la quantité d'ADN semblait plus importante pour les CSM-PD cultivées dans le milieu à faible concentration en glucose comparativement à celui à forte concentration (3,49 UI *vs* 2,31 UI) bien que la différence ne fût pas significative (p=0,70).

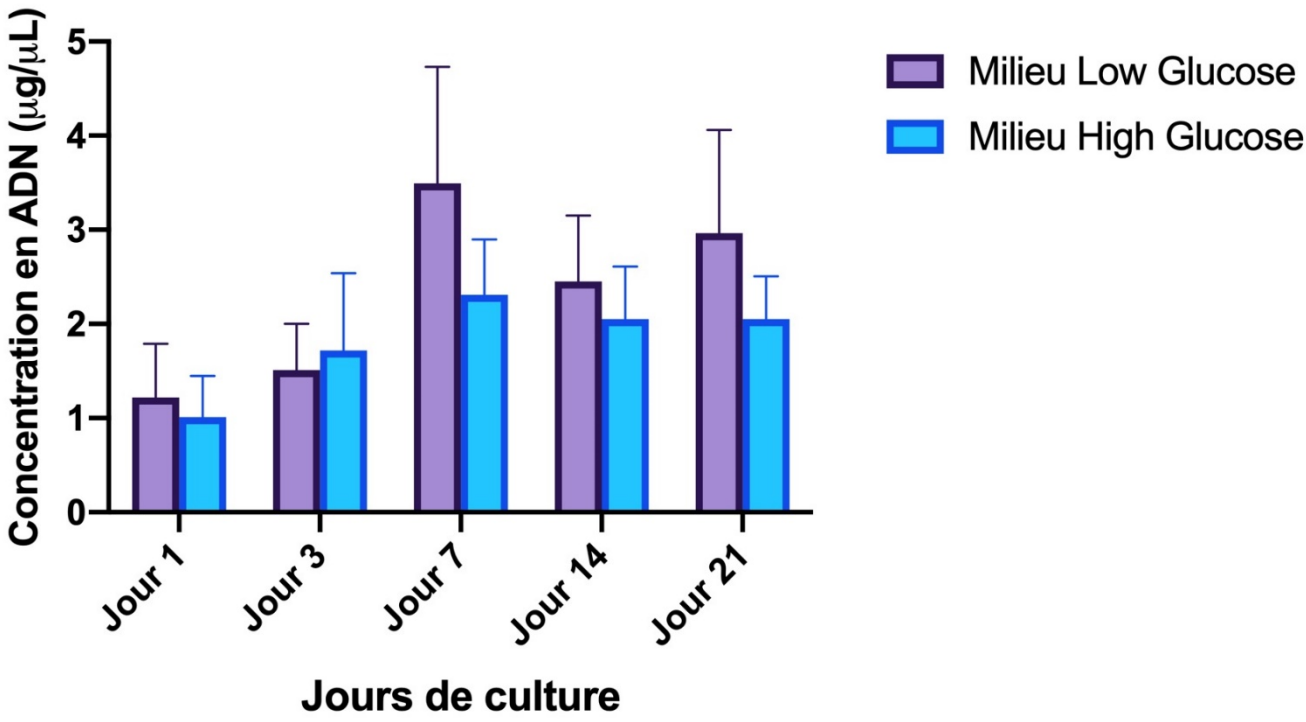


Figure 23 : quantification de l'ADN (µg/µL) produit par les CSM-PD selon les différentes concentrations en glucose (milieu *low glucose* (5,5 mM) *vs high glucose* (20 mM)) en fonction du temps de culture (moyennes ± écarts types) (n=3).

4.2.2.2. Étude de l'influence du glucose sur la viabilité cellulaire des CSM-PD

Le test MTT réalisé a mis en évidence une augmentation progressive de l'activité métabolique des CSM-PD quel que soit le milieu de culture utilisé jusqu'au 21ème jour de culture. Aucune différence significative (p>0,05) n'a été observée entre l'activité métabolique des CSM-PD mises au contact de faibles (5 mM) ou de fortes (20 mM) concentrations en glucose, et ce pour tous les jours de test (J1, J3, J7, J14, J21). Les résultats obtenus sont présentés en figure 24.

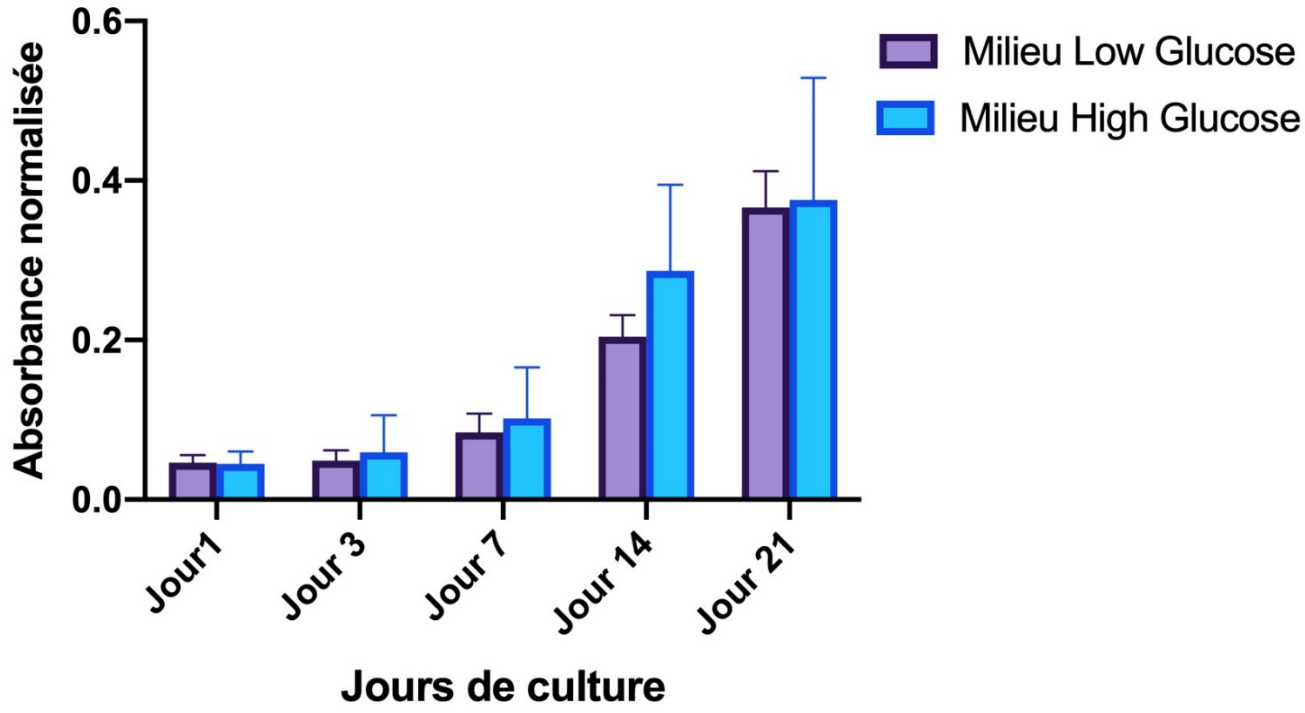


Figure 24 : mesure de l'absorbance obtenue lors du test MTT normalisée par l'absorbance de l'ADN selon la concentration en glucose utilisée en fonction du temps de culture (moyennes ± écarts types). Les CSM-PD ont été cultivées pendant 21 jours en présence d'un milieu *low glucose* ou *high glucose* (n=3).

Dans notre travail, nous avons choisi deux concentrations de glucose qui correspondent pour l'une à une concentration physiologique (5,5 mM) et l'autre à une forte concentration (20 mM), qu'il s'agisse des conditions de culture *in vitro* ou des concentrations de glucose dans le sérum sanguin *in vivo*. La condition de culture *high glucose* peut être comparée à un environnement assimilable à une hyperglycémie *in vivo*, qu'on retrouve notamment chez les patients diabétiques (291) Seule une étude s'est intéressée aux effets du glucose sur les CSM-PD (296) et les autres travaux décrits dans la littérature sur les effets du glucose sur la prolifération et viabilité d'autres types de CSM présentent des résultats divergents ou contradictoires. Ainsi, une forte concentration en glucose pourrait selon les études, soit promouvoir (289,291,295,360,361) soit inhiber (282,285,286,288,292,296,297) la prolifération des SCAPs, PDLSCs, SHED ou CSM-MO.

Les résultats de notre travail n'ont pas montré de différence significative de viabilité ou de prolifération des CSM-PD entre les deux conditions de culture et de concentration en glucose (p>0,05). Cela suggère qu'une forte concentration en glucose dans le milieu de culture n'a eu

ni effet délétère ni effet positif sur les CSM-PD. L'étude de Kanafi *et al* (296) a abouti aux mêmes conclusions pour une exposition à court terme (8 jours) à une forte concentration en glucose, là où notre travail a également montré ces mêmes résultats après une exposition prolongée de 21 jours. Des résultats similaires sur une courte exposition ont été obtenus avec les CSM-MO (362).

Les résultats contradictoires de la littérature sur les autres sources de CSM pourraient être expliqués par les différences dans le design de l'expérimentation : délai avant mise en culture des cellules et réalisation des tests de prolifération (de 4 jours à 4 semaines selon les études (282,285–289,291,292,295,296,360,363), variation dans la densité d'ensemencement cellulaire, variations individuelles liées aux donneurs (286) ou différences intrinsèques liées au type de CSM utilisées.

4.2.2.3. Étude de l'influence du glucose sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

- Coloration au Rouge Alizarine

Après 28 jours de culture, la coloration au Rouge Alizarine a mis en évidence la présence de précipités calciques dans les puits de culture des CSM-PD en présence de milieu de différenciation ostéogénique. La coloration semblait visuellement plus intense dans les puits où les cellules ont été mises en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique à forte concentration en glucose (A.3.) par rapport à ceux avec une faible concentration en glucose (A.2.) (Figure 25).

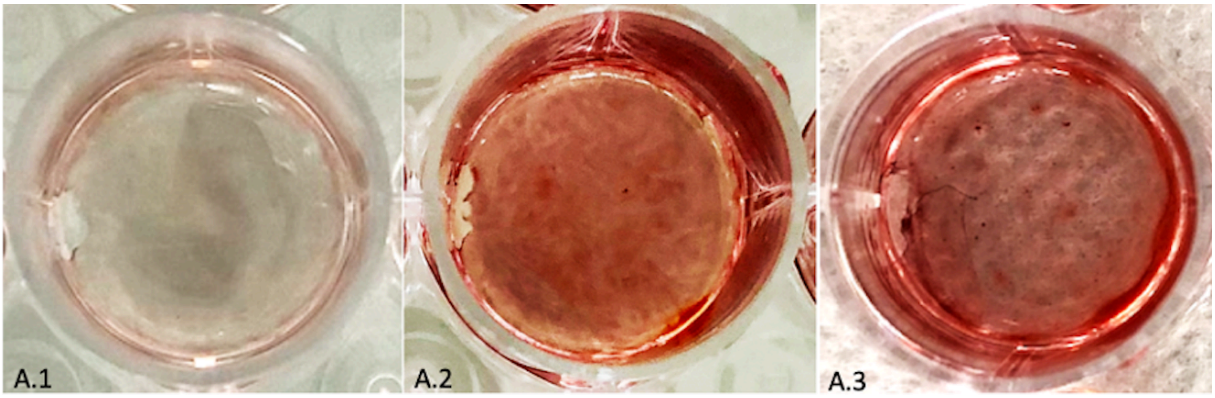


Figure 25 : effets de la concentration en glucose sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés. Coloration au Rouge Alizarine à J28 des CSM-PD cultivées en milieu basal (A.1.), milieu d'induction ostéogénique *low glucose* (LG, 5.5 mM) (A.2.) et milieu d'induction ostéogénique *high glucose* (HG, 20 mM) (A.3.) (n=3).

La quantification de la coloration au Rouge Alizarine n'a, par contre, pas mis en évidence de différence significative entre les deux conditions de culture (p=0,40, *low glucose vs high glucose*). Une forte teneur en glucose du milieu de culture ne semble pas augmenter la formation des dépôts calciques (Figure 26).

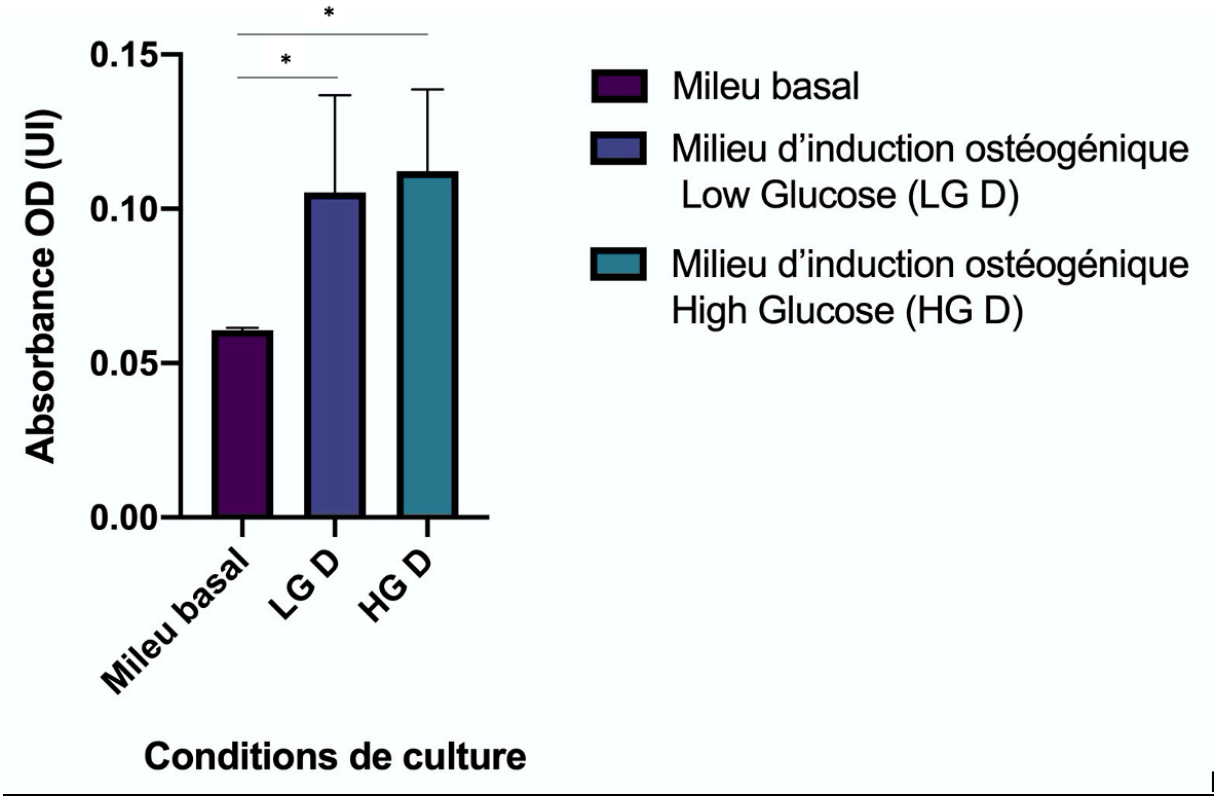


Figure 26 : effets de la concentration en glucose sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés. Quantification de la coloration au Rouge Alizarine obtenue pour les CSM-PD mises en cultures pour 28 jours en milieux *low* (LG D) ou *high glucose* (HG D) supplémentés en facteurs de différenciation ostéogénique *vs* milieu basal. Résultats exprimés en médianes, * = $p<0,05$ (n=3).

- Expression de gènes de différenciation ostéogénique

L'influence de la concentration en glucose du milieu sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD a été étudiée par la modification de l'expression de l'expression génique de *RUNX2* (marqueur ostéogénique précoce), *OCN* (marqueur ostéogénique tardif) and *COL1A1* à J28 entre les groupes à faible (*low*) et forte (*high*) concentration en glucose.

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes qu'il s'agisse de l'expression génique de *RUNX2* ($p = 0,10$), *OCN* ($p = 0,33$) ou *COL1A1* ($p = 0,99$). Ces résultats sont présentés dans la figure 27.

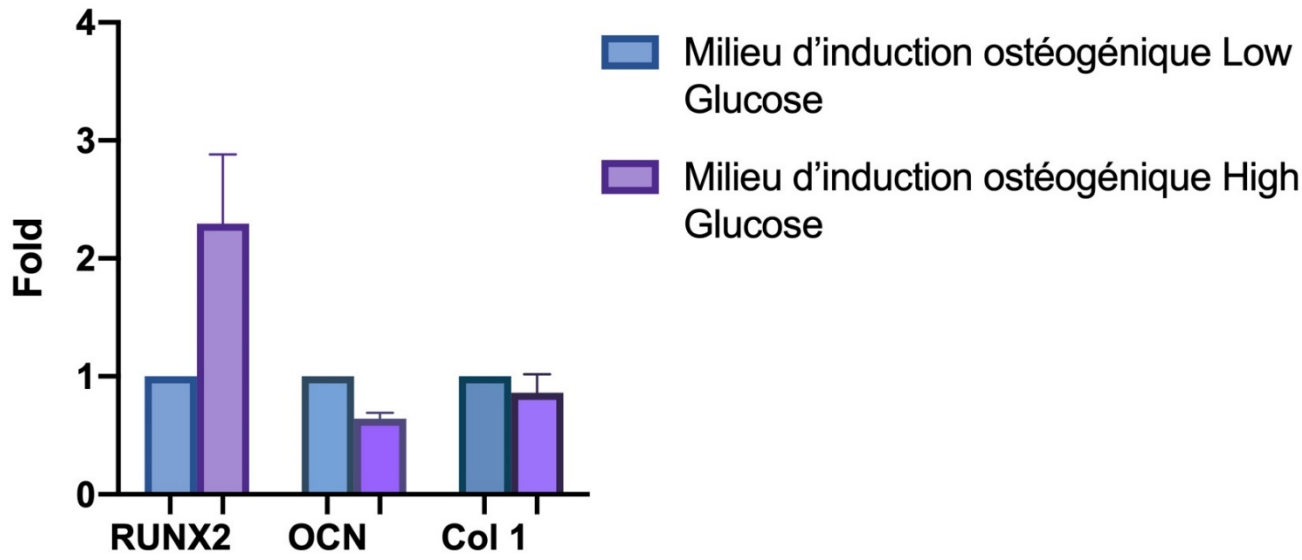


Figure 27 : effets de la concentration en glucose sur l'expression de gènes de différenciation ostéogéniques par les CSM-PD. Expression à J28 de *RUNX2, OCN* et *COL1A1* entre les groupes *low* (5,5 mM) et *high* (20 mM) glucose. Résultats exprimés en moyennes ± écarts types (n=3).

Cette partie de nos travaux s'est intéressée aux effets de la stimulation environnementale des CSM-PD sur leurs capacités de différenciation ostéogénique. Si nous savons que les CSM-PD peuvent s'engager dans la voie de différenciation ostéogénique en présence de facteurs ostéoinducteurs (112), cette différenciation est finement régulée et influencée par des molécules du microenvironnement cellulaire. Parmi eux, le glucose semble jouer un rôle primordial et son implication dans l'ostéogénèse a été largement étudié sur les CSM-MO, avec des résultats contradictoires ne permettant pas d'éclaircir les mécanismes exacts de son fonctionnement. A l'instar des résultats divergents observés sur la prolifération et la viabilité des CSM, les travaux sur l'influence du glucose sur la différenciation des CSM sont également contradictoires : une forte concentration en glucose pourrait ainsi promouvoir la différenciation ostéogénique des CSM-MO (286,364), des PDLSCs (292) et des SCAPs (295), ou au contraire l'altérer ou l'inhiber (287,288,291). Ces résultats divergents pourraient s'expliquer par les différences dans la durée d'exposition des CSM aux différentes conditions de culture, allant de 7 (296), 14 (287) à 21 jours (288,291) selon les études ou par le choix de tests uniquement qualitatifs pour évaluer la différenciation ostéogénique (286).

Nous n'avons pas trouvé de travaux dans la littérature comparant les effets d'une faible et d'une forte concentration en glucose sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD.

Nos résultats montrent une absence de différence significative (p>0,05) en termes de minéralisation entre nos deux groupes (LG et HG) après 28 jours de culture. Nous avons obtenu des nodules de minéralisation osseuse tant pour la condition de culture à faible concentration en glucose que pour celle à forte concentration. Si la coloration au Rouge Alizarine de nos puits de culture semblait plus importante visuellement pour les CSM-PD mises au contact d'une forte concentration en glucose, la quantification colorimétrique n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (p>0,05).

Nous avons ensuite confirmé ces résultats par une analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ostéogénique. Nous avons choisi d'étudier l'expression de *RUNX2*, facteur de transcription impliqué dans les stades précoces de la différenciation ostéogénique (122), *OCN*, marqueur tardif de la minéralisation osseuse (365), ainsi que *COL1A1,* gène dont l'expression est corrélée à la différenciation ostéogénique et à la synthèse de la MEC osseuse (366). Ainsi, nous n'avons pas observé de différence significative (p>0,05) après 28 jours de culture, entre l'expression génique de *RUNX2*, OCN ou *COL1A1* par nos CSM-PD qu'elles aient été mises en culture avec un milieu d'induction ostéogénique à forte ou faible concentration en glucose. La différenciation ostéogénique des CSM-PD ne semble pas avoir été impactée ni positivement ni négativement par la concentration en glucose du milieu de culture.

Cette partie de notre travail a permis de montrer que le comportement des CSM-PD ne parait pas modifié de manière significative par la concentration en glucose du milieu et plus particulièrement par une forte concentration en glucose. Ni le métabolisme, ni les capacités de prolifération ou de différenciation ostéogénique de nos CSM-PD ne semblent avoir été ni potentialisés ni inhibés par la forte concentration en glucose. D'une part, ces résultats nous encouragent à privilégier pour la culture des CSM-PD un milieu physiologique à faible concentration en glucose (DMEM-LG), et d'autre part, cette intéressante résistance semble particulièrement intéressante pour l'utilisation des CSM-PD en conditions hyperglycémiques pathologiques *in vivo* et dans le traitement de pathologies associées à une hyperglycémie chronique comme le diabète. Plus spécifiquement, l'utilisation des CSM-PD pourrait être une alternative prometteuse en ingénierie tissulaire osseuse chez le patient diabétique, chez qui nous savons que la cicatrisation et le métabolisme osseux sont impactés par l'hyperglycémie (367).

4.2.3. Étude de l'effet de la densité d'ensemencement sur les CSM-PD

Nous avons choisi dans cette partie de notre travail d'évaluer les effets de deux densités d'ensemencement cellulaire sur la prolifération, viabilité et différenciation ostéogénique de nos CSM-PD. En effet, les résultats obtenus dans nos travaux sur l'étude des nanoliposomes, pour laquelle la densité d'ensemencement que nous avions choisie semblait trop faible, nous ont poussé à nous interroger sur les effets de cette densité d'ensemencement sur la prolifération, viabilité et différenciation ostéogénique de nos CSM-PD. Si la densité de 1.10^3 cellules/cm^2 a semblé de fait trop faible, nous avons choisi d'étudier une densité intermédiaire ($2{,}5.10^3$ cellules/cm^2) entre cette densité de 1.10^3 cellules/cm^2 et la densité plus classiquement utilisée de 5.10^3 cellules/cm^2.

4.2.3.1. Effets sur la prolifération et la viabilité des CSM-PD

La densité d'ensemencement ne semble pas avoir impacté de façon significative la prolifération des CSM-PD. Aucune différence significative (p>0,05) n'a été observée entre les deux groupes sur la quantité d'ADN produite par les cellules lors du test de Hoechst, quel que soit le jour de test (Figure 28). Néanmoins, la prolifération des CSM-PD à J1, J3, J7 et J21 semble plus faible lorsqu'elles ont été ensemencées à une faible densité (2500 cellules/cm^2) par rapport à la densité classique (5000 cellules/cm^2).

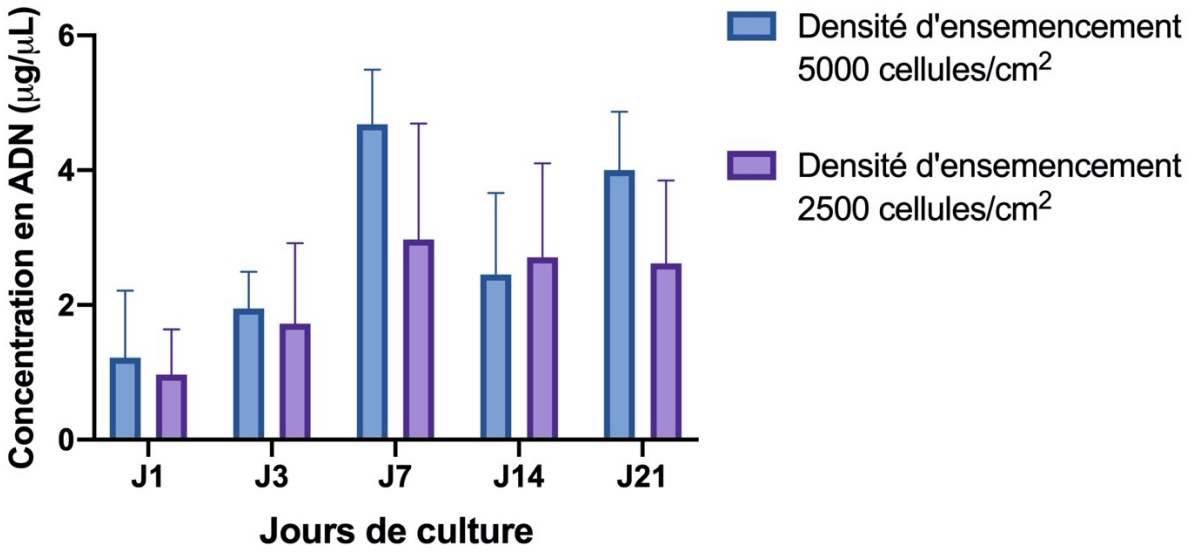


Figure 28 : quantification de l'ADN (µg/µL) produit par les CSM-PD selon la densité d'ensemencement (2500 et 5000 cellules/cm^2) aux différents jours de culture (J1 à J21) (moyenne ± écarts types) (n=3).

L'absorbance normalisée du test MTT par le test de Hoechst n'avait pas mis en évidence de différence significative (p>0,05) en termes de viabilité cellulaire entre les deux densités d'ensemencement. Néanmoins, de la même manière que pour la prolifération cellulaire, la viabilité des CSM-PD ensemencées à faible densité était moins importante à tous les jours de test (J1, J3, J7, J14, J21) que pour celles ensemencées à densité classique (Figure 29).

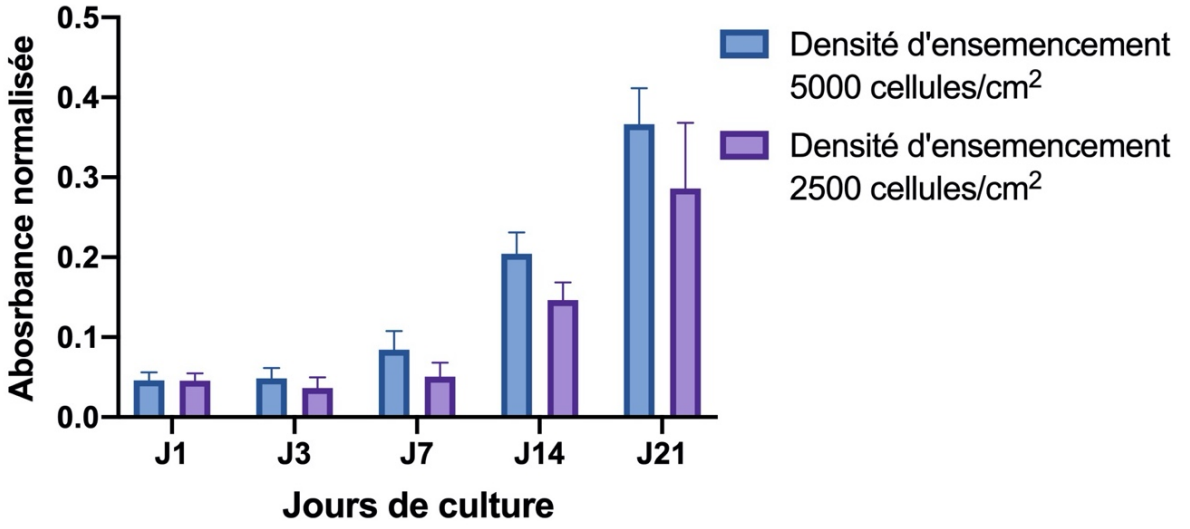


Figure 29 : viabilité des CSM-PD selon la densité d'ensemencement (2500 et 5000 cellules/cm^2) aux différents jours de culture (J1 à J21) (moyennes ± écart types, n=3).

Dans la littérature, les études réalisées sur les CSM (255) et notamment les CSM-MO (256) ont montré que l'augmentation du taux de prolifération cellulaire évoluait parallèlement avec l'augmentation de la densité d'ensemencement. Cette tendance a été constatée que ce soit après seulement quelques heures de culture (255) ou après 21 jours (256). Nous avons observé cette même tendance que ce soit à court terme après 24 heures de culture comme l'a observé l'équipe de Venugopal (255), ou à plus long terme après 21 jours de culture, comme observé dans les travaux de Zahedi *et al* (256).

Dans ces études, la prolifération cellulaire des CSM augmente avec la densité d'ensemencement mais sans différence significative entre les différents groupes, ce que nous avons aussi constaté dans nos travaux.

De plus, des travaux réalisés sur l'effet de la densité d'ensemencement des CSM humaines ont démontré qu'une faible densité équivalente à celle que nous avons utilisé (2500 cellules/cm^2) entraine une variation morphologique et un changement de comportement cellulaire par rapport à la densité classique (5000 cellules/cm^2), ce qui pourrait expliquer les différences obtenues en termes de prolifération cellulaire entre nos deux groupes (255).

Par ailleurs, il est connu qu'une inflexion du taux de prolifération peut signifier l'engagement dans une voie de différenciation par les CSM (266), hypothèse qui pourrait être envisagée ici et qui a été explorée par une quantification de la coloration au Rouge Alizarine de nos plaques de culture.

4.2.3.2. Effets sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD

La quantification de la coloration au rouge alizarine réalisée après 28 jours de culture a permis de mettre en évidence la présence de nodules de minéralisation pour les CSM ensemencées à densité classique (5000 cellules/cm^2), mais n'a pas permis d'observer une minéralisation significativement objectivable par rapport au milieu basal (p>0,05), pour les CSM-PD ensemencées à faible densité (2500 cellules/cm^2) (Figure 30).

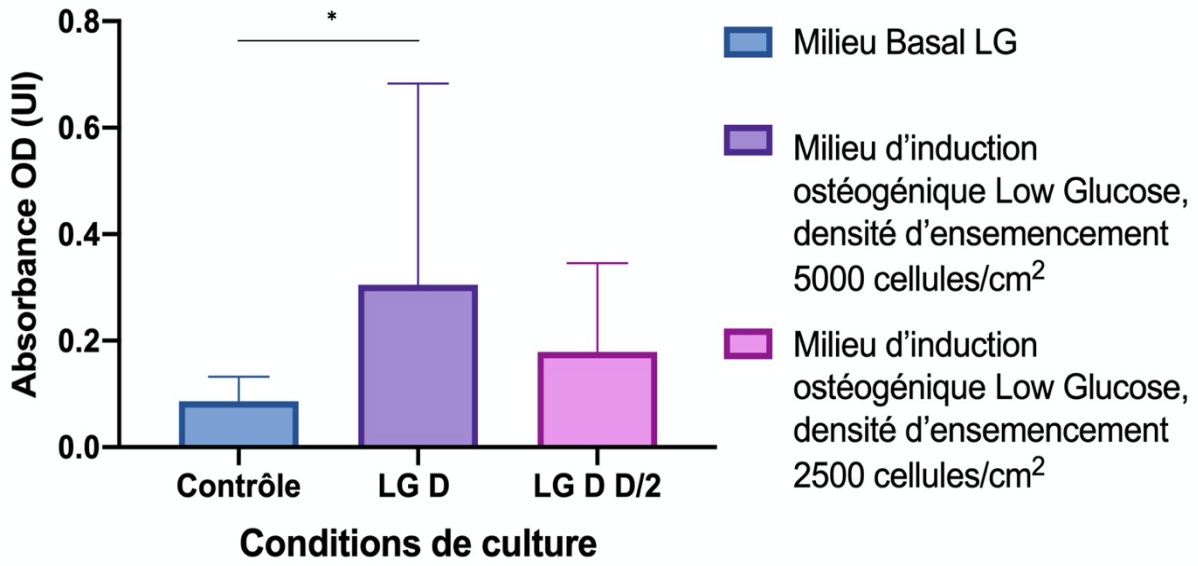


Figure 30 : effets de la densité d'ensemencement sur la formation de nodules ostéogéniques minéralisés. Quantification de la coloration au Rouge Alizarine obtenue pour les CSM-PD mises en cultures pour 28 jours à deux densités d'ensemencement en milieu *low glucose* supplémenté en facteurs de différenciation ostéogénique *vs* milieu basal. Résultats exprimés en médianes, * = p<0,05 (n=3).

Par ailleurs, l'observation de nos plaques de culture en microscopie à fluorescence à J28 a permis de constater visuellement ce que nous avions quantifié par la coloration au Rouge Alizarine : une absence de minéralisation pour les CSM-PD mises en culture en présence de milieu basal (Figure 31A), une très faible coloration pour les CSM-PD ensemencées à faible densité dans du milieu d'induction ostéogénique (Figure 31C), et la présence de nodules de minéralisation ostéogénique pour les CSM-PD ensemencées à densité classique dans du milieu d'induction ostéogénique (Figure 31B).

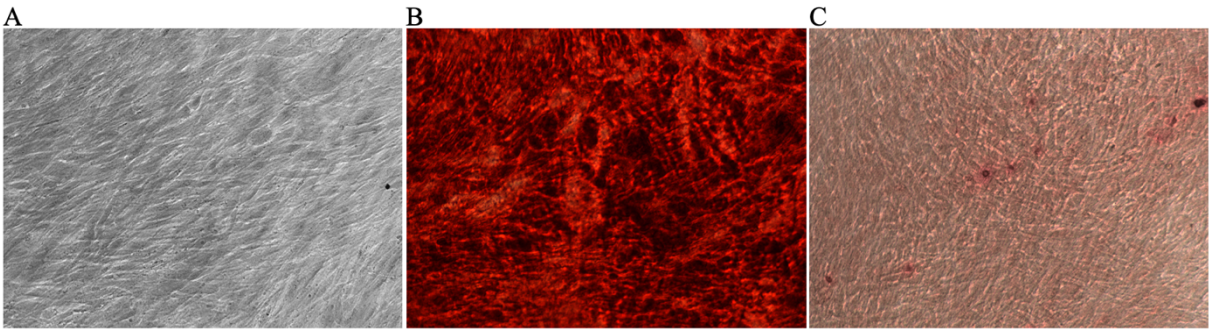


Figure 31 : aspect des CSM-PD après 28 jours de culture en milieu basal à densité classique (A), en milieu d'induction ostéogénique à densité classique (B) ou à faible densité (C). Microscopie à fluorescence, optique x10.

Il n'existe pas à notre connaissance de données dans la littérature comparant dans les mêmes conditions de culture en deux dimensions les capacités de différenciation ostéogénique des CSM-PD selon la densité d'ensemencement initiale.
Néanmoins, il a été démontré que la densité d'ensemencement initiale des CSM-MO en trois dimensions impacte leur potentiel de différenciation ostéogénique et leurs capacités de néoformation de tissu osseux (264–267).
Une densité d'ensemencement initiale trop faible altère ainsi l'obtention d'une différenciation ostéogénique *in vitro* (260). Une modification chronologique de l'expression génique de facteurs de croissance et de différenciation osseuse par les CSM-MO a également été démontrée (259), une faible densité semblant stimuler la différenciation ostéogénique précoce et une plus forte densité stimulant une différenciation tardive. Enfin, d'autres résultats dans la littérature ont montré qu'une densité d'ensemencement plus importante favorise l'engagement des CSM-MO dans la lignée de différenciation ostéogénique, avec une augmentation de la minéralisation et de la synthèse de l'ALP (262,266,267).
Une trop faible densité d'ensemencement semble ainsi impacter négativement l'engagement des CSM-PD dans la voie de différenciation ostéogénique et diminuer la formation de nodules de minéralisation, probablement la conséquence d'une altération de la communication intercellulaire (262).
Nous n'avons pas observé de minéralisation ostéogénique significative après 28 jours de culture lorsque nos CSM-PD étaient ensemencées une faible densité (2500 cellules/cm^2). Cela pourrait traduire des résultats similaires à ceux obtenus dans la littérature avec d'autres sources de CSM, comme nous venons de le voir. La différenciation ostéogénique des CSM-PD a ainsi pu être inhibée par la trop faible densité d'ensemencement.

En résumé, cette partie de notre travail a permis de démontrer qu'une trop faible densité d'ensemencement semble inhiber les capacités de différenciation ostéogénique des CSM-PD. Pour la suite de nos travaux en deux dimensions, il a semblé judicieux de privilégier une densité d'ensemencement de 5000 cellules/cm^2.

4.3. Développement d'un biomatériau composite associant éponges de collagène et hydrogel, ensemencé par des CSM-PD.

Dans cette partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés au comportement de nos cellules lorsqu'elles étaient en présence d'une structure et d'un environnement plus complexe (architecture en trois dimensions), plus proches des conditions *in vivo*.
Nous avons tout d'abord vérifié par des études préliminaires que d'autres sources de CSM (les CSM-MO) restaient présentes au sein du biomatériau après 21 jours de culture. Pour cela, nous avons ensemencé les CSM-MO dans des matrices de collagène, collagène/alginate et collagène/alginate/HA à la même densité que celle choisi pour nos CSM/PD (6.10^3 cellules/mm^3). Les colorations HES et par le Rouge Alizarine réalisées après 21 jours de culture en milieu basal ou de différenciation ostéogénique ont démontré une colonisation des biomatériaux par les CSM-MO, ainsi que la présence de dépôts calciques pour les biomatériaux mis en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique (données non présentées).

Nous avons ensuite ensemencé nos CSM-PD dans différentes matrices composées de collagène seul, collagène et hydrogels d'alginate enrichis ou non en HA ou borosilicate.
Nous avons réalisé les analyses histologiques suivantes après 28 jours de culture dans du milieu basal ou de différenciation ostéogénique.

4.3.1. Analyses histologiques

4.3.1.1. Coloration Hématoxyline-Éosine-Safran

La coloration HES a permis de visualiser l'architecture globale de nos différentes matrices ainsi que l'organisation cellulaire et matricielle en leur sein (Figures 32 et 33).

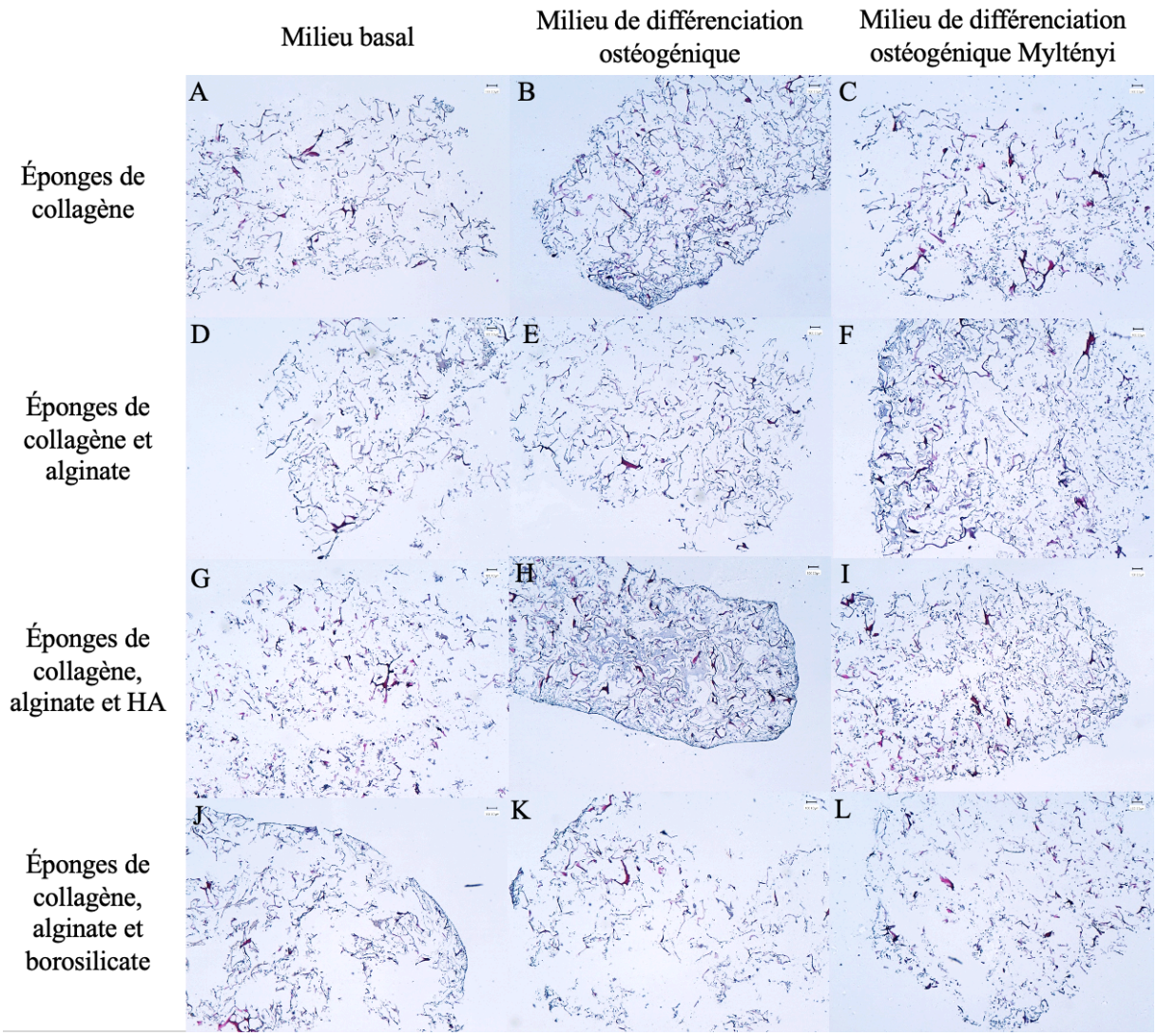


Figure 32 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD. Coloration HES, optique x4. Présence d'une colonisation cellulaire et d'une sécrétion matricielle importante en condition de différenciation ostéogénique (B à L), majeure avec envahissement de tout le biomatériau pour les éponges de collagène/alginate/HA (H). (n=3)

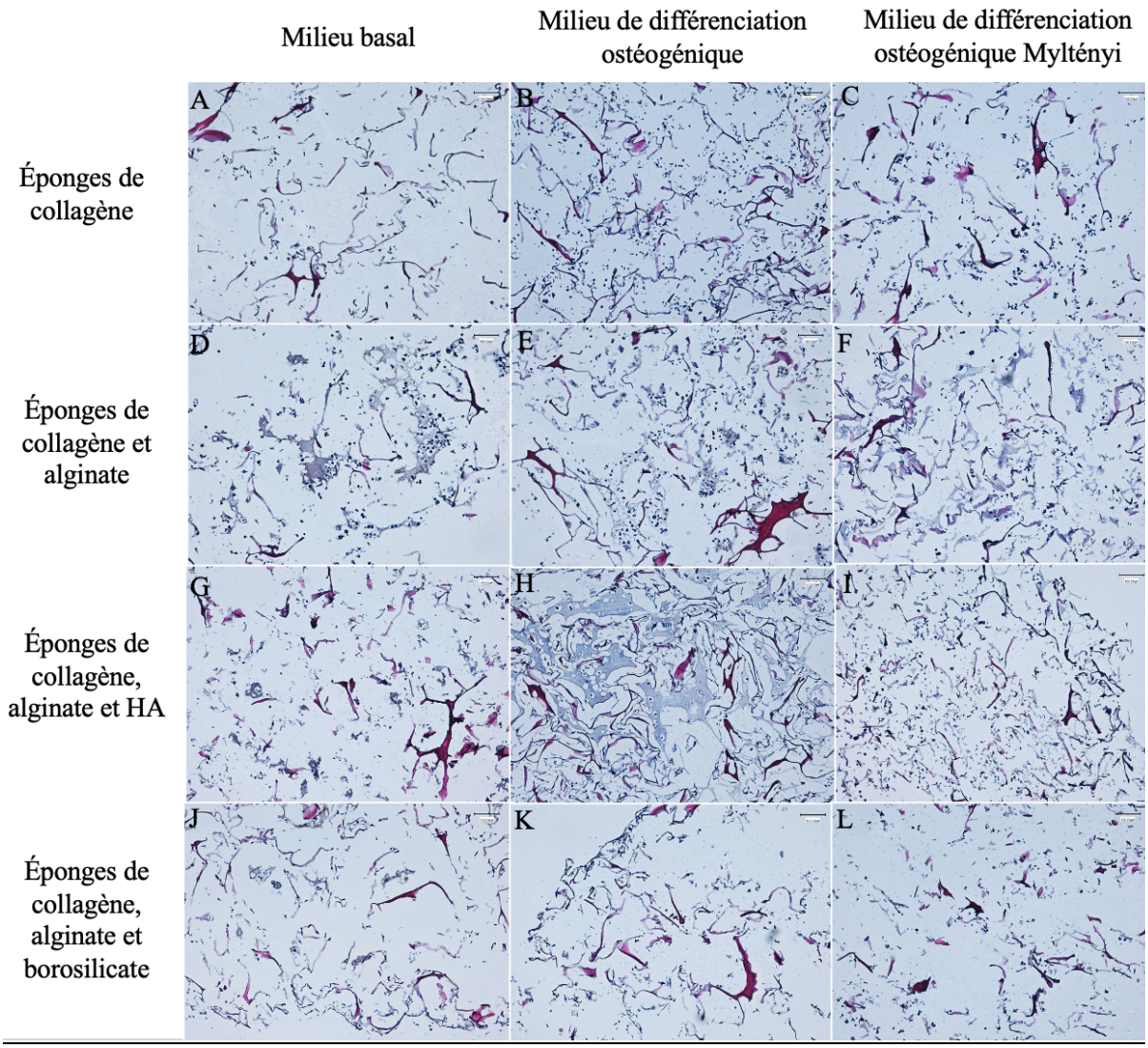


Figure 33 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD. Coloration HES, optique x10. Présence d'une colonisation cellulaire et d'une sécrétion matricielle importante en condition de différenciation ostéogénique (B à L), majeure avec envahissement de tout le biomatériau pour les éponges de collagène/alginate/HA (H). (n=3)

La coloration HES nous a permis d'objectiver la présence d'éléments cellulaires dans les différentes conditions de culture et dans les différents biomatériaux. La colonisation des matériaux par les cellules et la sécrétion d'une MEC semblent plus importantes pour toutes les matrices lorsque les cellules sont en présence de milieu de culture avec cocktail de différenciation ostéogénique ou milieu de différenciation ostéogénique commercial (StemMACS™ OsteoDiff Media, Myltenyi Biotech), comparativement au milieu basal.

Une sécrétion matricielle par les CSM-PD est présente dans les biomatériaux enrichis d'un hydrogel d'alginate même en présence de milieu basal, ce que nous n'avons pas observé pour les conditions de collagène seul.

Cette sécrétion matricielle et la colonisation cellulaire était majeure lorsque de l'HA a été ajouté à l'hydrogel d'alginate, avec un envahissement de tout le biomatériau. Nous avons également observé dans cette condition la présence d'un liseré périphérique très marqué. Nous n'avons pas observé cet envahissement central du biomatériau dans la condition ou le borosilicate enrichi l'hydrogel, mais toutefois un discret liseré périphérique.

Cette organisation périphérique était néanmoins moins marquée et de façon globale plus anarchique dans les biomatériaux enrichis en borosilicate (Figure 32).

Le biomatériau composé d'éponge de collagène, hydrogel d'alginate enrichi en HA semblerait donc permettre une distribution spatiale très homogène des cellules mises en culture avec du milieu d'induction ostéogénique, que ce soit en périphérie ou au centre du matériau avec une inclusion d'éléments cellulaires dans des lacunes entourées de MEC (Figure 34).

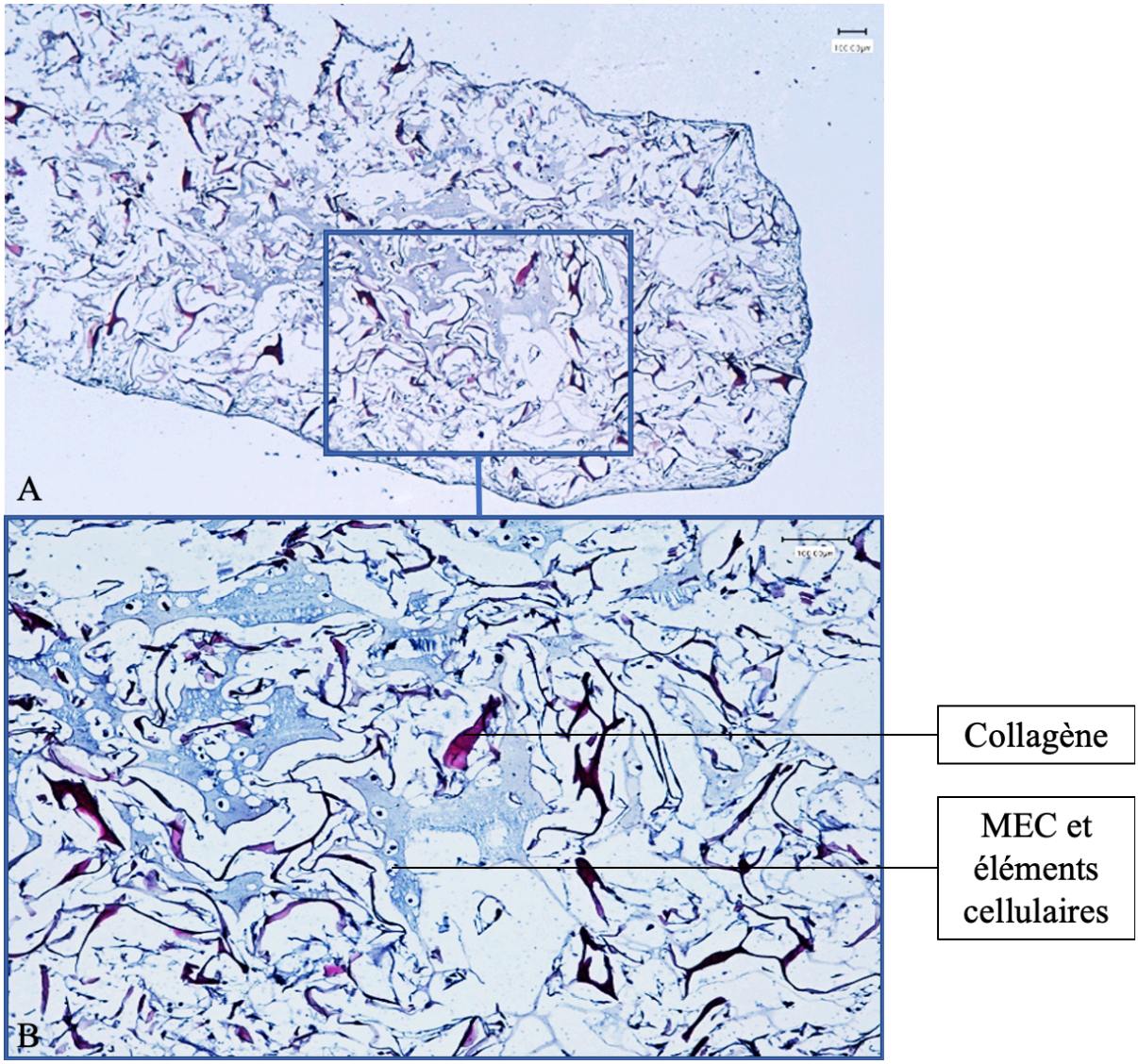


Figure 34 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD. Coloration HES. A : optique x4. B : optique x10 (n=3).

Dans la littérature, de précédents travaux ont obtenus des résultats similaires avec les CSM-PD (131), les CSM-MO (182,183,368,369), les CSM-CO (183) ou les CSM-TA (368). Dans ces études, les CSM ensemencées dans des matrices de collagène (131,182,183,369) ou de collagène et HA (368,369) en présence de milieu basal et de milieu de différenciation ostéogénique ont permis une viabilité cellulaire et une colonisation des matrices. Par ailleurs, à l'instar de ce que nous avons observé dans nos matrices de collagène et de collagène/HA en conditions de différenciation ostéogénique, la colonisation par les CSM à J28 semble également plus marquée en périphérie des matrices dans plusieurs études (131,183,368). Ce phénomène

semble lié à la différenciation ostéogénique des CSM et temps-dépendant, puisque, s'il est présent à 21 (183), 28 (368) ou 40 jours de culture (131), il ne semble pas l'être à seulement 7 jours (368). De plus, les cellules situées à la périphérie des éponges semblent être moins différenciées que celles situées au centre des matrices, avec une morphologie plus aplatie en superficie et plus cuboïde typique des ostéoblastes au centre (131).

Par ailleurs, des travaux réalisés *in vivo* avec des CSM-PD ensemencées dans des matrices composées uniquement de collagène et implantées soit directement (140) soit après culture d'une semaine dans du milieu de différenciation ostéogénique (138), dans des défauts osseux chez l'homme (140) ou de calvaria murins (138), ont montré après coloration HES une colonisation homogène des matrices par les cellules et l'obtention d'une néoformation osseuse à 8 semaines. Nous avons obtenu des résultats similaires *in vitro* avec une colonisation des matrices composées uniquement de collagène, par nos CSM-PD, avec ou sans milieu de différenciation ostéogénique. Néanmoins, ces travaux (138,140) n'ont pas comparé plusieurs types de matrice pour l'ensemencement des CSM-PD leur expérimentation est *in vivo,* ne nous permettant donc pas de comparer efficacement avec nos travaux. Cependant, l'étude de Yang *et al* réalisée *in vivo,* a comparé des matrices de collagène seules et de collagène/HA ensemencées avec des CSM-CO et implantées en défaut de calvaria chez le rat. A trois mois, la coloration HES des coupes des matrices a démontré une présence plus importante d'os néoformé en sites implantés avec les matrices de collagène/HA que pour les sites implantés avec les matrices de collagène seules, présentant des zones fibreuses plus importante (201) et donc une moindre qualité de l'os néoformé.

Enfin, la colonisation et la viabilité cellulaire semblent plus importantes et homogènes dans des matrices à base de collagène et HA (phase organique et phase minérale) comparativement à des matrices à base de HA et TCP (deux phases inorganiques) (369), supportant l'intérêt de créer une matrice composite mimant au mieux le tissu natif en associant phases organique et minérale.

Si les différentes matrices que nous avons utilisées semblent supporter la colonisation par les CSM-PD et autoriser leur croissance, notre biomatériau associant collagène, alginate et HA semble favoriser de façon plus marquée une colonisation homogène des cellules et la sécrétion d'une MEC abondante en son sein, démontrant son intérêt en ingénierie tissulaire osseuse.

4.3.1.2. Coloration Rouge Alizarine

La coloration par le Rouge Alizarine permet de visualiser les zones de dépôts calciques reflets de la minéralisation matricielle. Cette coloration des coupes histologiques de nos biomatériaux avait permis de mettre en évidence les zones de minéralisation dans les matrices après 28 jours de culture (Figures 35 et 36).

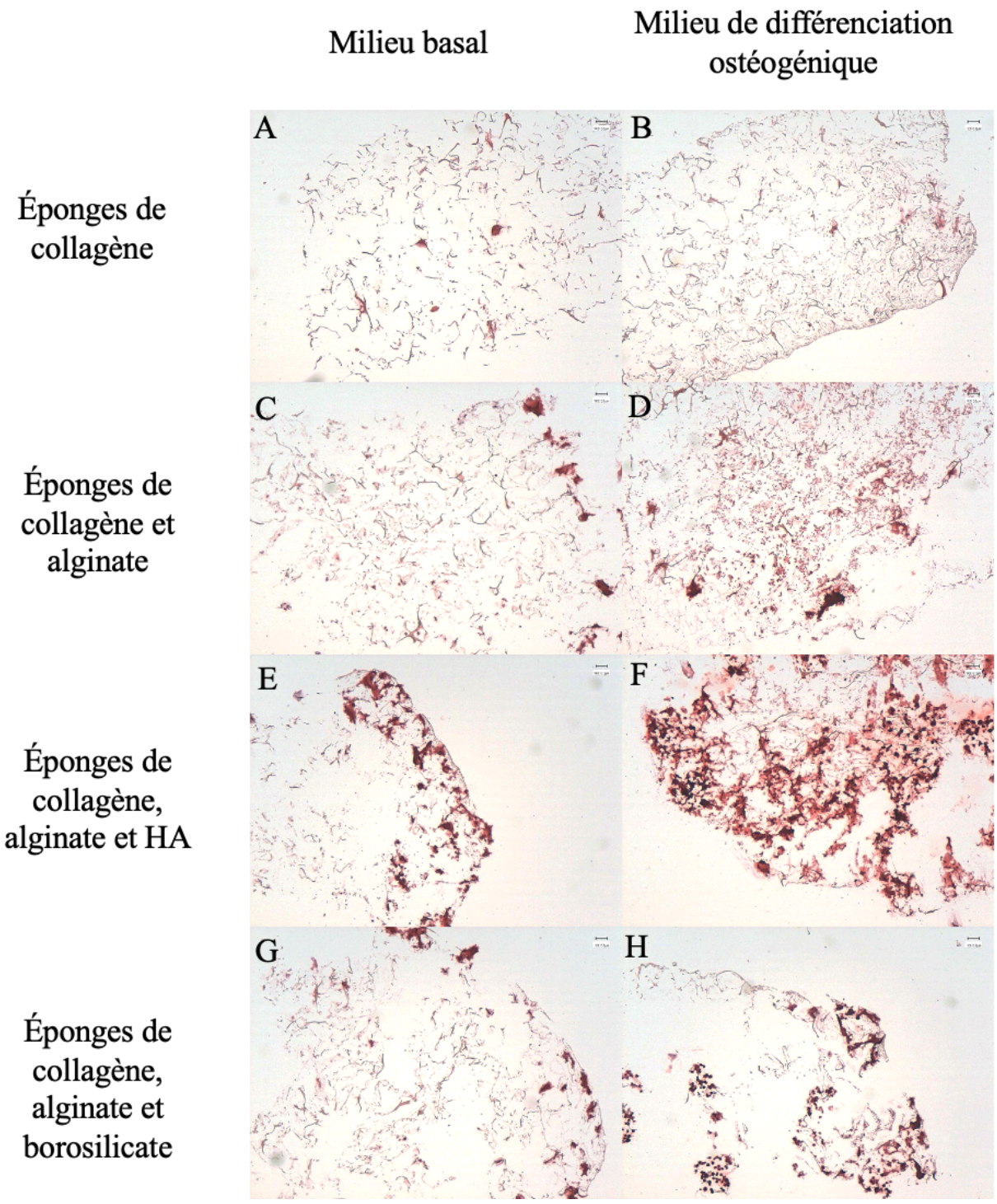


Figure 35 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Coloration au Rouge Alizarine, optique x4. Absence de zones de minéralisation (A, C), très faible minéralisation périphérique (B), zones de minéralisation diffuses (D, H) ou localisées en périphérie (E, G), minéralisation osseuse importante de tout le biomatériau (F). (n=3).

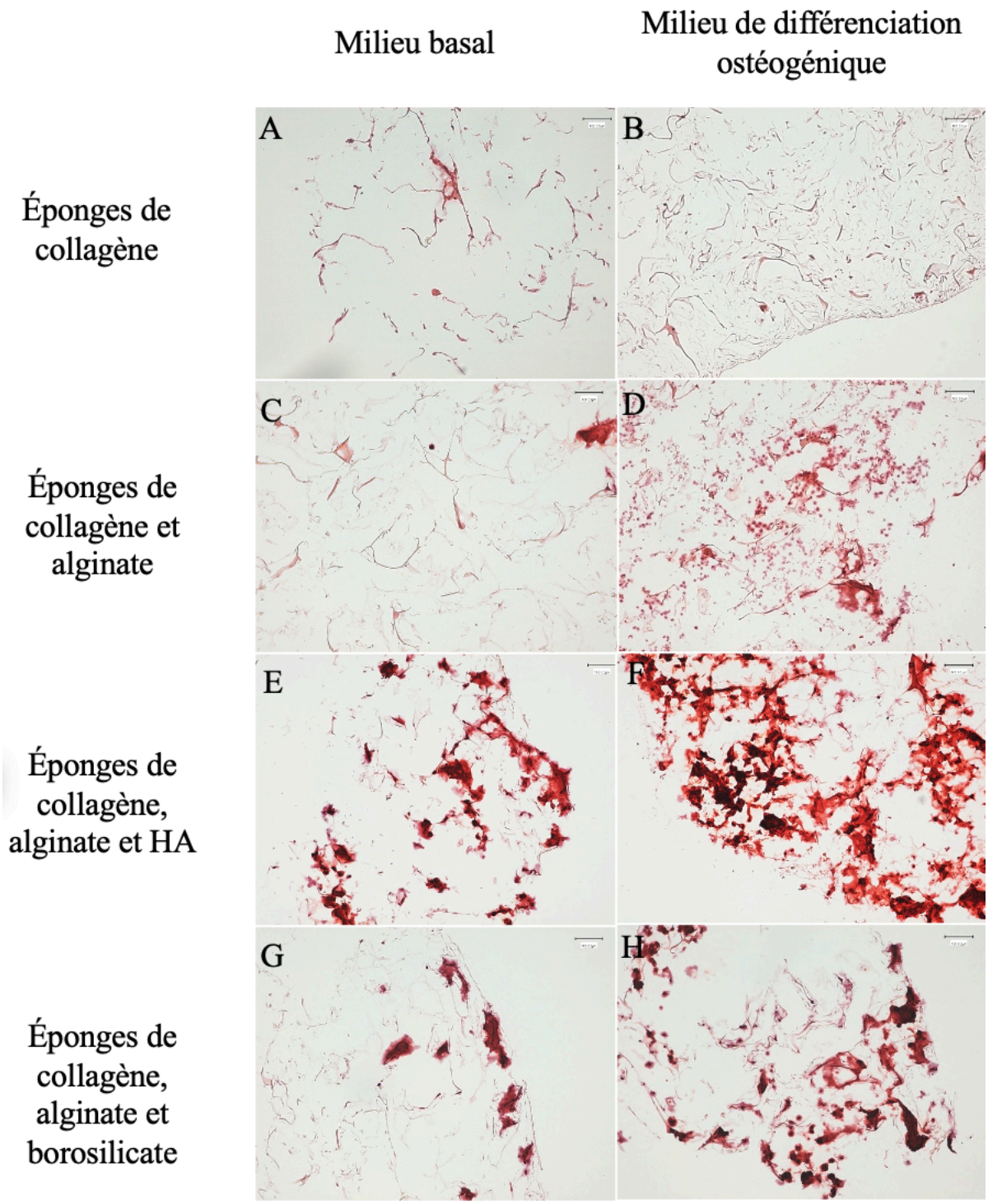


Figure 36 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Coloration au Rouge Alizarine, optique x10. Absence de zones de minéralisation (A, C), très faible minéralisation périphérique (B), zones de minéralisation diffuses (D, H) ou localisées en périphérie (E, G), minéralisation osseuse importante de tout le biomatériau (F). (n=3).

Les matrices constituées d'éponges de collagène seules, ensemencées avec des CSM-PD ne semblaient pas présenter de zones de minéralisation quand les cellules étaient mises en culture avec du milieu basal, et une très faible minéralisation avec un marquage très léger, plutôt localisée en périphérie des éponges, quand les CSM-PD étaient mises en culture avec du milieu d'induction ostéogénique.

De la même façon, les matrices constituées d'éponges de collagène et d'un hydrogel d'alginate ne semblaient pas présenter de zones de minéralisation après 28 jours de culture dans du milieu basal, mais des zones de minéralisation diffuses dans ces matrices après culture dans du milieu de différenciation ostéogénique.

Un marquage important et donc une minéralisation osseuse étaient observés pour les CSM-PD ensemencées dans les matrices d'éponges de collagène/alginate/HA, avec une minéralisation plutôt en périphérie en présence de milieu basal (Figure 37) et une minéralisation importante et bien répartie spatialement dans tout le biomatériau en présence de milieu d'induction ostéogénique (Figure 38).

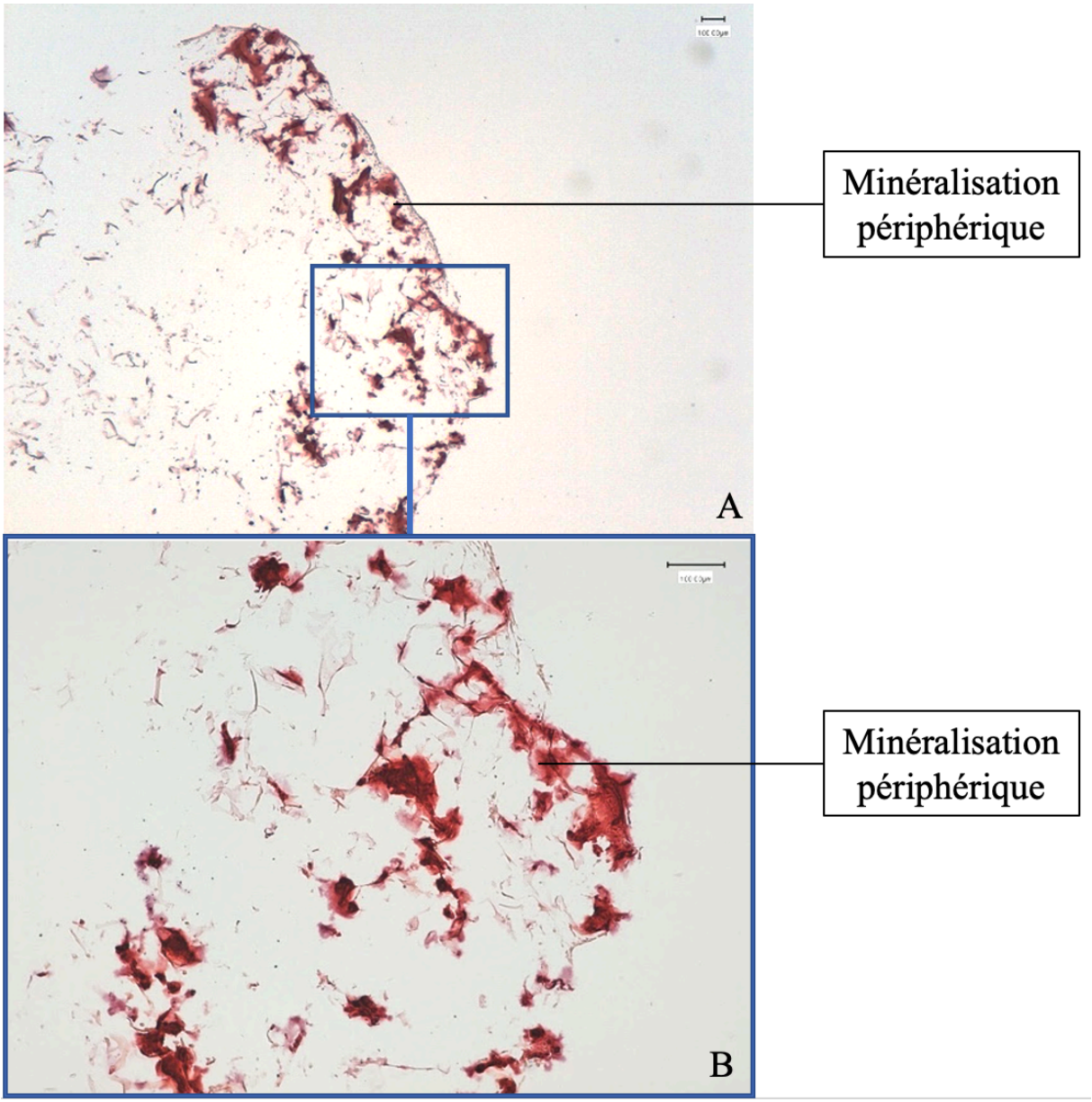


Figure 37 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD, milieu basal. Coloration Rouge Alizarine. A : optique x4. B : optique x10 (n=3).

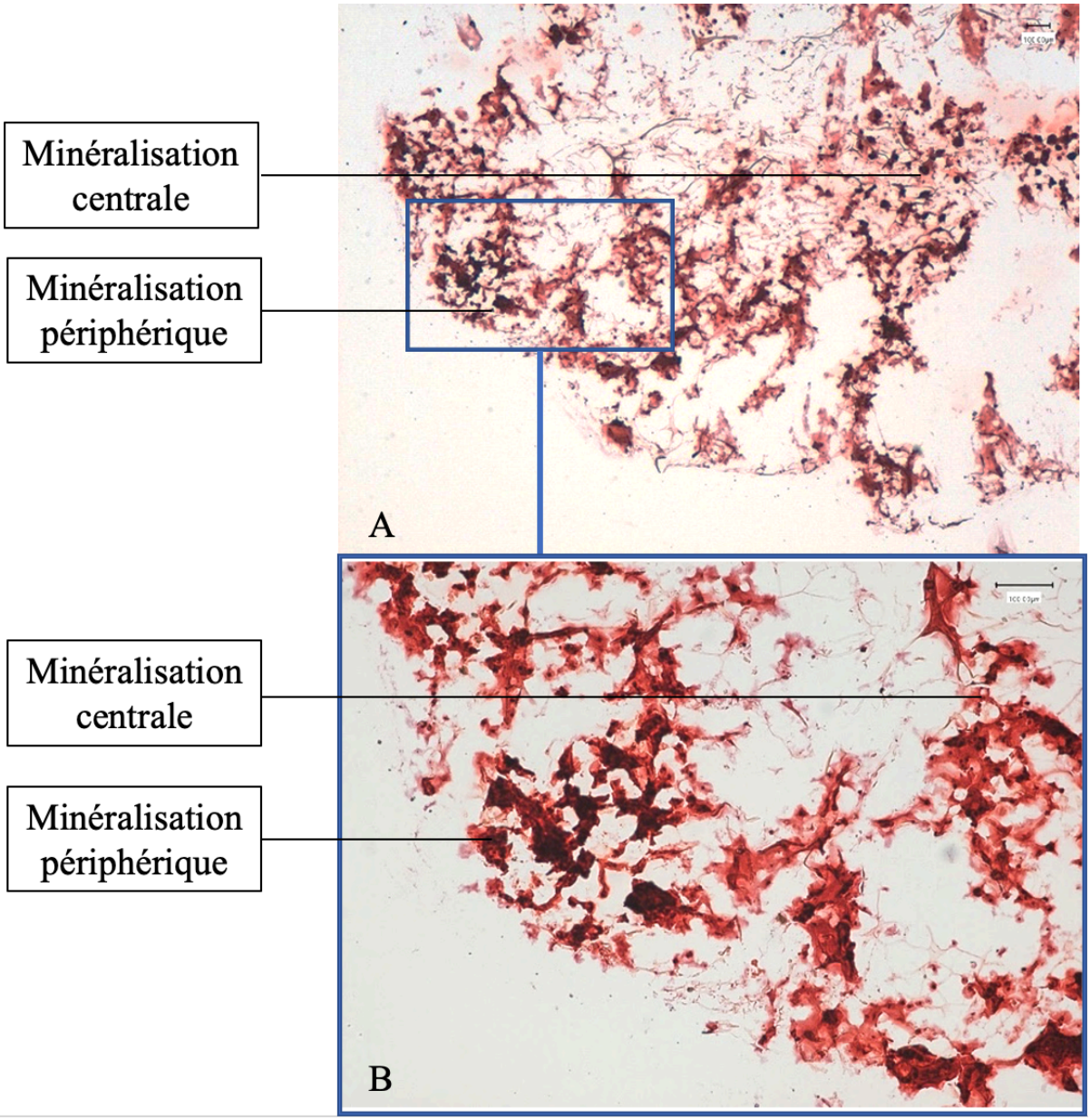


Figure 38 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD, milieu de différenciation ostéogénique. Coloration Rouge Alizarine. A : optique x 4. B : optique x10 (n=3).

Enfin, des zones de minéralisation avaient été observées pour les biomatériaux collagène/alginate/borosilicate, plus nombreuses que celles retrouvées dans les matrices d'éponges de collagène et collagène/alginate mais moins que dans les matrices collagène/alginate/HA. Comme pour les matrices collagène/alginate/HA, ces zones de minéralisation étaient présentes en périphérique en présence de milieu basal et plus homogènement réparties dans le biomatériau en présence de milieu de différenciation ostéogénique.

Dans une étude où des CSM-PD ont été ensemencées dans des éponges de collagène seul et mises en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique (131), la coloration au Rouge Alizarine a mis en évidence des zones de minéralisation homogène dans tout le biomatériau, ce que nous n'avons pas observé dans nos travaux. Nous avons pu observer grâce à la coloration HES que, dans nos éponges de collagène, les cellules avaient bien colonisé le matériau, cette différence de résultats ne semble donc pas être expliquée par un manque d'adhésion et de survie de nos CSM-PD dans les éponges de collagène. Par contre, dans cette étude, la coloration au Rouge Alizarine a été réalisée après 40 jours de culture, *vs* 28 jours dans notre travail. La différence de marquage dans les éponges de collagène seul pourrait donc être expliquée par un temps plus long de différenciation ostéogénique des CSM-PD dans les biomatériaux l'étude de Riccio *et al*, favorable à la formation d'une MEC osseuse minéralisée révélée par la coloration au Rouge Alizarine (131). Une autre différence dans le protocole choisi par l'équipe de Riccio pourrait expliquer la faible présence de dépôts minéralisés dans nos éponges de collagène ; les éponges sont d'un volume plus important (500 *vs* 314 mm^3) avec une densité d'ensemencement plus faible (1000 *vs* 6000 cellules/mm^3) que dans nos travaux. Des résultats similaires ont aussi été obtenus *in vivo* dans des défauts de calvaria chez le rat : les CSM-PD ensemencées dans des éponges de collagène (1500 cellules/mm^3) ont permis d'obtenir après 4 semaines une minéralisation homogène dans les biomatériaux, mise en évidence par la coloration au Rouge Alizarine (138). Il pourrait donc être intéressant de répéter notre expérimentation avec une densité d'ensemencement et/ou une durée de culture comparable à celles choisies par Riccio *et al*, afin de vérifier l'impact de ces deux facteurs sur l'obtention d'une MEC minéralisée homogènement répartie dans les éponges de collagène. Il serait également intéressant de tester *in vivo* nos biomatériaux collagéniques ensemencés par les CSM-PD.

L'ajout d'alginate à nos éponges de collagène a permis d'observer la présence de zones de minéralisation plus importantes et plus homogènes dans nos biomatériaux par rapport aux éponges de collagène seul après 28 jours de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique, ainsi qu'une légère coloration par le Rouge Alizarine en périphérie des biomatériaux cultivés dans du milieu basal. Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'études ayant des conditions d'expérimentation similaires à nos travaux et ne pouvons qu'émettre des hypothèses quant à ces résultats. Les propriétés d'encapsulation cellulaire de l'alginate semblent avoir procuré aux CSM-PD un microenvironnement plus favorable à leur différenciation ostéogénique et pourraient avoir réduit la fuite de cellules lors de

l'ensemencement, en faveur d'une augmentation du nombre de CSM-PD au sein des biomatériaux. Cette hypothèse semble être appuyée par l'architecture globale observée en coloration HES, où la MEC semble plus structurée et les logettes cellulaires plus nombreuses dans les biomatériaux enrichis en alginate par rapport aux éponges de collagène seul (Figures 32 et 33).

Nous avions également choisi d'enrichir nos hydrogels en HA. Les biomatériaux collagène/alginate/HA ensemencés avec les CSM-PD sont ceux qui ont présenté, après 28 jours de culture, les zones de minéralisation les plus importantes (Figures 35, 36, 37, 38). Dans la littérature, d'autres travaux se sont intéressés à l'effet de l'ajout d'HA à des biomatériaux de collagène. Ainsi, des CSM-MO (193,199,200) et des CSM-CO (201) ont été ensemencées dans des biomatériaux de collagène *vs* collagène/HA, *in vitro* (193,199,200) ou *in vivo* (200,370). Si dans ces travaux, des colorations histologiques similaires aux nôtres n'ont pas été réalisées, les résultats ont mis en lumière que l'ajout d'HA dans les biomatériaux de collagène a permis d'améliorer non seulement les propriétés mécaniques mais surtout l'adhésion, la survie, la prolifération cellulaire (193,200) et a augmenté l'expression de gènes de différenciation ostéogénique (199). *In vivo*, ces travaux ont montré que l'ajout d'HA permettait d'obtenir une MEC osseuse et une formation osseuse plus importante par rapport aux biomatériaux de collagène seul (200,370). Ces résultats obtenus avec des CSM autres que les CSM-PD sont comparables à ce que nous avons observé en termes de formation de MEC osseuse minéralisée sur nos coupes histologiques, pour nos biomatériaux avec HA *vs* ceux sans HA.
L'équipe de Trivedi *et al* (192) a utilisé *in vitro* un design expérimental proche du notre en ensemençant des CSM-PD dans des biomatériaux de collagène/HA. S'ils n'ont pas réalisé de coloration histologique évaluant la minéralisation, ils ont mis en évidence par microscopie optique à balayage la présence de structures nodulaires compatibles avec des calcifications dans les biomatériaux après 21 jours de culture en présence de milieu de différenciation ostéogénique. Ils n'ont malheureusement pas comparé leurs résultats avec un milieu basal ou d'autres types de biomatériaux. Néanmoins, les analyses biochimiques (expression génique de l'ALP et de l'OCN) qu'ils ont réalisées ont permis de confirmer que la différenciation ostéogénique des CSM-PD était augmentée par la présence d'HA et collagène. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux que nous avons obtenu pour nos biomatériaux collagène/HA/alginate, suggérant qu'ils autorisent une différenciation ostéogénique efficace et homogène en leur sein et potentialisent les capacités de différenciation ostéogénique des CSM-PD.

L'équipe de Liu *et al* a testé *in vivo* dans des défauts mandibulaires de lapin, les capacités de régénération tissulaire osseuse de biomatériaux de collagène/HA/PLA ensemencés ou non avec des CSM-PD. Après 12 semaines, les biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD avaient déployé une capacité de néoformation osseuse similaire à celle de l'os autogène utilisé en contrôle positif. Par ailleurs, l'ajout de facteur de croissance (rh-BMP2) aux biomatériaux a permis d'obtenir une néoformation osseuse plus précoce qu'avec la greffe d'os autogène.

Une autre étude *in vivo* utilisant des CSM-PD a montré que l'ajout d'une phase minérale autre que l'HA au collagène, comme la silice, a permis d'augmenter la néoformation osseuse *in vivo* par rapport aux biomatériaux de collagène seul (174). Néanmoins, la potentialisation de l'ostéogénèse a été observée uniquement en présence de milieu de différenciation et la coloration au Rouge Alizarine n'a pas montré de dépôts de minéralisation en présence de milieu basal, contrairement à ce que nous avons observé. En effet, en présence d'HA, nous avons pu observer la présence de minéralisation, allant dans le sens d'une supériorité de l'HA par rapport à d'autres phases minérales pour induire une formation osseuse dans les biomatériaux, même en l'absence de milieu ostéoinducteur. Par ailleurs, d'autres travaux réalisés sur les CSM-PD ont montré que l'ajout d'HA à des matrices à base de PGLA permettait d'obtenir une différenciation ostéogénique plus importante et régulait positivement l'expression de gènes de différenciation ostéogénique (ALP, OPN, RUNX2) (371). Les auteurs ont formulé l'hypothèse que l'HA, en induisant l'expression de gènes ostéogéniques, posséderait des propriétés ostéoinductrices, hypothèse cohérente avec ce que nous avons observé dans notre travail, avec des nodules de minéralisation présents même en présence de milieu basal. Si les CSM-PD possèdent des capacités de différenciation ostéogénique spontanées (110,137), il semblerait que la matrice dans laquelle elles sont ensemencées potentialise ces capacités et notamment une matrice composée d'une association de collagène, alginate et HA.

Enfin, des travaux *in vivo* ont comparé les effets de l'implantation de biomatériaux de collagène/HA/PLA ou de ß-TCP ensemencés avec des CSM-PD (108). Après 12 semaines d'implantation chez la souris, la quantité d'os mature néoformé était plus importante dans le groupe ß-TCP que dans le groupe collagène/HA/PLA. Ces résultats ouvrent la réflexion sur la suite de notre travail qui pourrait tester nos biomatériaux *in vivo* afin de reproduire ces conditions d'expérimentations et de déterminer si la différence obtenue est liée aux conditions expérimentales (*in vivo vs in vitro*) ou au type de CSM-PD utilisées (CSM de lapin *vs* CSM humaines dans notre travail).

4.3.1.3. Coloration de Von Kossa

La coloration de Von Kossa avait permis de mettre en évidence la présence de précipités calciques dans toutes les matrices, à l'exception des matrices composées uniquement de collagène. Ce marquage peut être visualisé par les flèches noires dans les figures 39 et 40.
On retrouve ainsi la présence de précipités calciques majoritairement localisés en périphérie de nos biomatériaux.
Le marquage est présent pour toutes les conditions de cultures (milieu basal et milieux de différenciation ostéogénique) pour les matrices composées de collagène/alginate/HA et collagène/alginate/borosilicate et uniquement en présence de milieu d'induction ostéogénique pour les matrices composées de collagène et alginate.

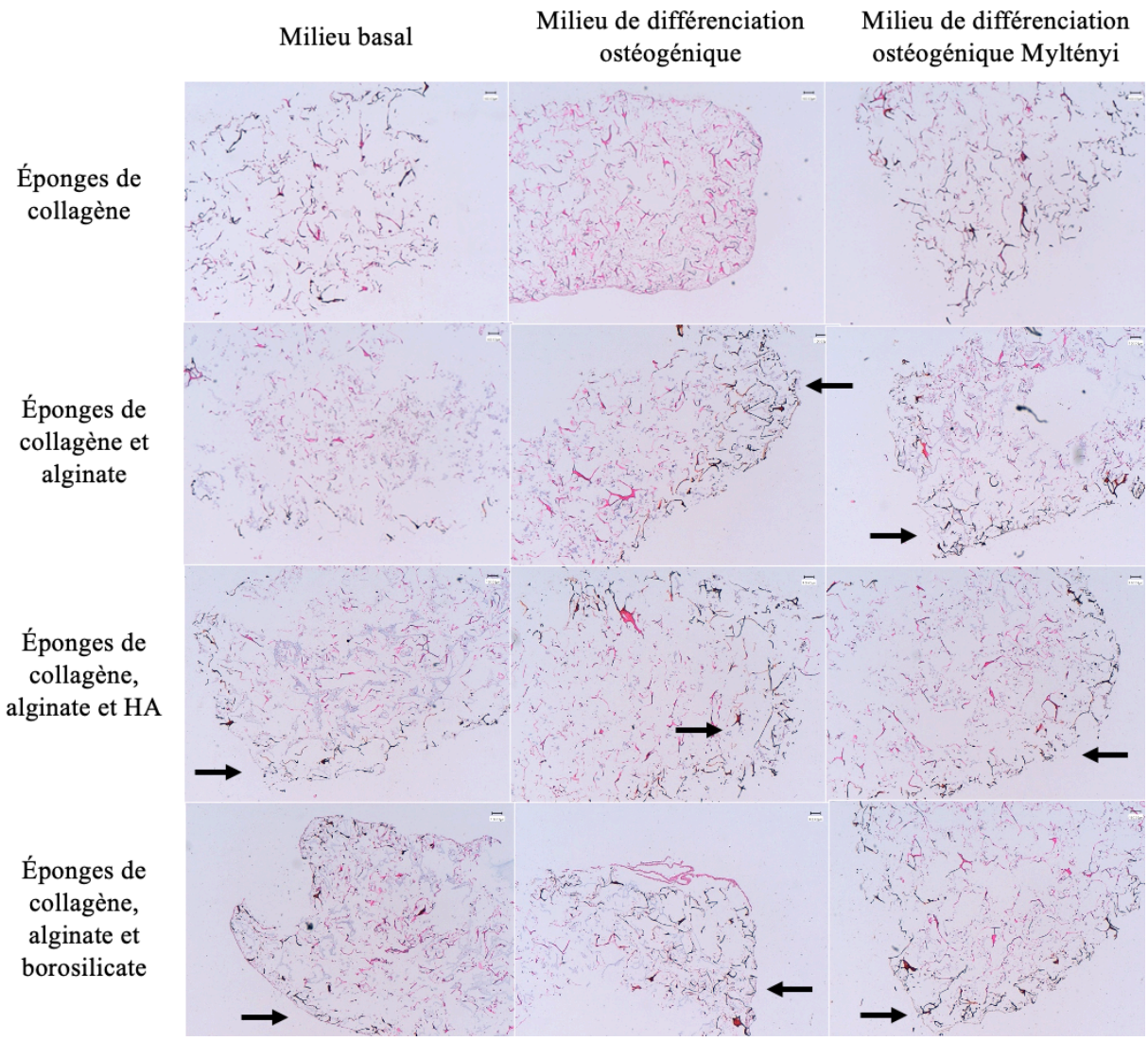


Figure 39 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Coloration de Von Kossa, optique x4. Le marquage peut être visualisé par les flèches noires. (n=3).

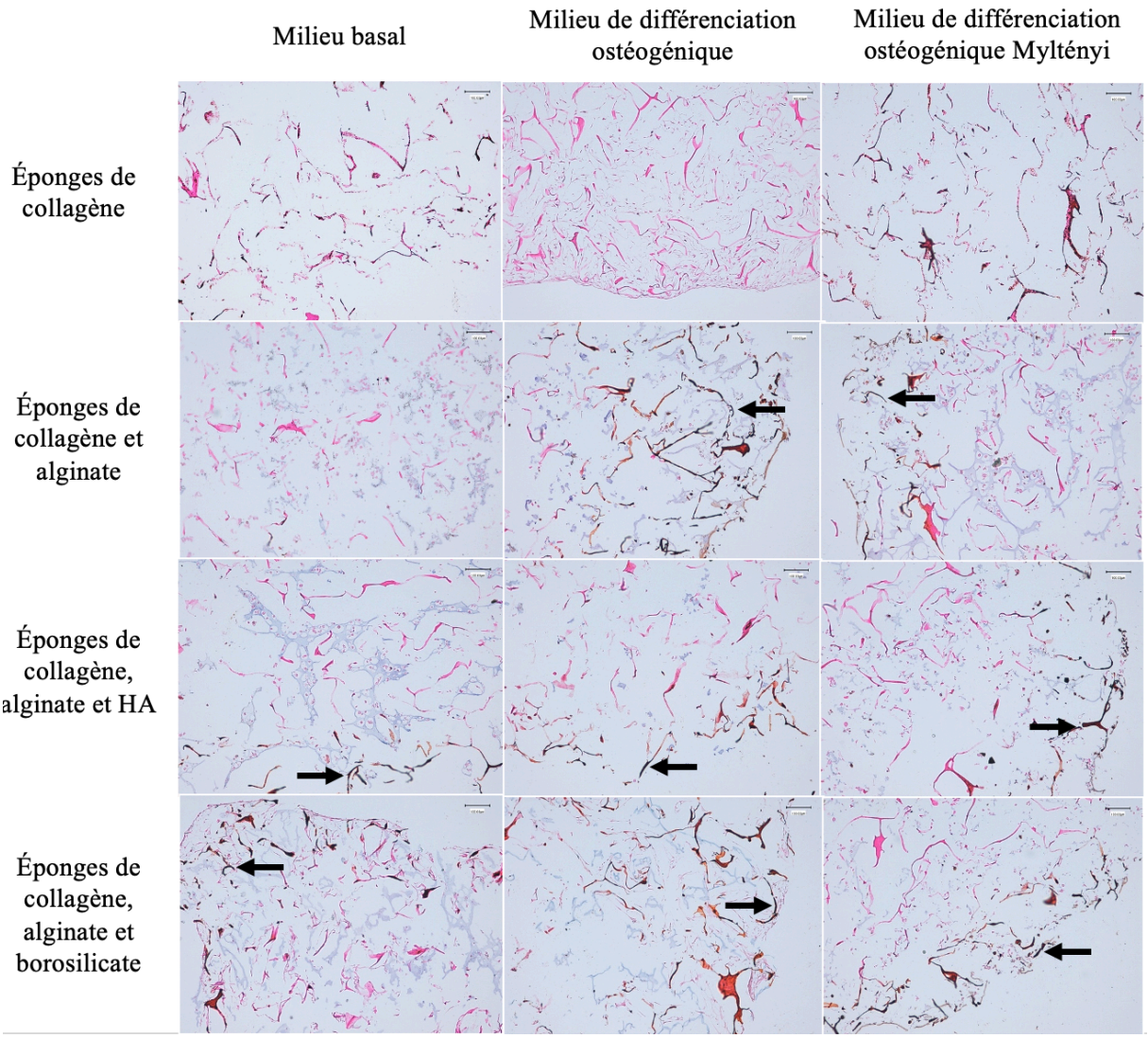


Figure 40 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Coloration de Von Kossa, optique x10. Le marquage peut être visualisé par les flèches noires (n=3).

Dans nos travaux, nous n'avons pas observé de marquage par la coloration de Von Kossa pour nos biomatériaux composés uniquement de collagène, même pour ceux mis en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique. Dans la littérature, nous n'avons pas retrouvé de travaux avec des conditions d'expérimentations parfaitement similaires aux nôtres. Néanmoins, il a été démontré que l'ensemencement de CSM-MO et de CSM-CO dans des gels de collagène permettait d'obtenir un marquage par la coloration de Von Kossa en périphérie des biomatériaux (183). Ce marquage était obtenu uniquement pour les gels mis en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique et absent dans la condition de culture dans du milieu basal. Cette différence pourrait être expliquée par le temps de culture des biomatériaux (21 *vs*

28 jours dans notre travail), par la consistance du biomatériau (gel *vs* éponge) ou par la densité d'ensemencement choisie (10 fois plus faible dans cette étude). Un point de convergence peut toutefois être observé ; ces auteurs n'ont pas observé de marquage dans les biomatériaux de collagène mis en culture avec du milieu basal, qu'ils soient ensemencés avec des CSM-MO ou des CSM-CO. D'autres travaux réalisés avec des CSM-MO ont donné des résultats divergents : un marquage important après 30 jours de culture pour Sanjurjo-Rodriguez *et al* (372), et une absence de marquage après 28 jours pour Hayrapetyan *et al* (368). Ces auteurs ont utilisé des biomatériaux de consistance différente (gel *vs* éponge) et des densités d'ensemencement peu comparables (3000 *vs* 200000 cellules/mm^3), source probable de la divergence des résultats observés. Nous avons utilisé des biomatériaux avec une consistance identique à celle des travaux d'Hayrapetyan *et al*, et une densité d'ensemencement plus proche de celle choisie par Sanjurjo-Rodriguez *et al* (6000 cellules/mm^3). La comparaison avec ces travaux est donc délicate, mais les hypothèses d'un impact (1) de la formulation du biomatériau de collagène, (2) de la densité d'ensemencement initiale ou (3) de la source de CSM sont à retenir et seront à explorer dans des travaux futurs. Les études réalisées *in vivo* avec l'ensemencement de CSM-PD dans des biomatériaux de collagène et implantation dans un modèle murin de défaut de calvaria ont démontré la présence d'une néoformation osseuse et d'un marquage par la coloration de Von Kossa après 4 semaines d'implantation (107). Là encore, comparer ces travaux dont les conditions d'expérimentation sont très éloignées des nôtres est difficile, d'autant que les auteurs ont également obtenu une formation osseuse dans le groupe contrôle (biomatériau sans CSM-PD).

L'ajout d'alginate et d'une phase minérale (HA) à nos biomatériaux a permis d'observer après 28 jours, un marquage par la coloration de Von Kossa à la périphérie de nos biomatériaux mis en culture dans du milieu de différenciation ostéogénique. Nous n'avons pas observé de marquage pour les biomatériaux mis en culture dans du milieu basal. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux dans la littérature utilisant des CSM-PD dans des conditions d'expérimentation proches des nôtres. Néanmoins, d'autres sources de CSM ont été utilisées dans des conditions comparables. Ainsi, Bhuiyan *et al* ont étudié les effets de l'ensemencement de CSM-MO à une densité identique à la nôtre dans des biomatériaux de collagène/HA/PLGA. Après 28 et 35 jours de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique, la coloration de Von Kossa a révélé une minéralisation homogène dans les biomatériaux. Cette équipe a utilisé comme contrôle les mêmes biomatériaux mais sans cellules, n'obtenant pas de marquage aux mêmes jours de test, rendant difficile l'évaluation de l'impact de l'ajout d'HA au biomatériau

de collagène sur la potentialisation de la différenciation ostéogénique. Cette variable a par contre été étudiée par Hayrapetyan *et al* (368), qui ont utilisé des biomatériaux de collagène seuls ou enrichis d'une proportion variable d'HA ; (1) 0/1, (2) 1/1, (3) 2/1. L'ensemencement de ces différents biomatériaux a été réalisé avec des CSM-TA et des CSM-MO à une densité comparable à celle que nous avons choisi dans nos travaux. Il est intéressant de constater que comme nous l'avons mentionné plus haut, après 28 jours de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique, les biomatériaux composés de collagène sans HA n'ont pas été marqués par la coloration de Von Kossa, résultats similaires à ce que nous avons observé. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence un marquage uniquement pour les biomatériaux enrichis en HA et ensemencés avec des CSM-TA, et non avec ceux ensemencés avec les CSM-MO. Les auteurs ont formulé l'hypothèse d'une différenciation ostéogénique plus précoce avec les CSM-TA et de l'impact de la source de CSM utilisée sur la différenciation ostéogénique des biomatériaux ainsi que de l'intérêt de leur adjoindre de l'HA.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de rejoindre ces hypothèses, en faveur d'une différenciation ostéogénique potentialisée à la fois par l'ajout d'HA et par l'ajout d'alginate dans nos biomatériaux. Nous aurions pu dans nos travaux choisir une condition de culture supplémentaire : collagène/HA sans alginate, afin d'évaluer l'effet booster de l'alginate sur l'HA. Dans cette logique, il aurait également été intéressant d'utiliser ces biomatériaux sans cellules, afin de vérifier les effets de chaque variable.
Néanmoins, nos résultats semblent démontrer que les CSM-PD sont une source utilisable de CSM pour l'ingénierie tissulaire osseuse et permettent d'obtenir une MEC osseuse minéralisée dans des conditions de culture adaptées. Par ailleurs, parmi les compositions de biomatériaux que nous avons choisies, ce sont les éponges de collagènes enrichies d'un hydrogel d'alginate et HA qui semblent représenter le choix le plus pertinent.

4.3.2. Analyses immunohistochimiques

4.3.2.1. Ostéocalcine

Un marquage immunohistochimique de l'OCN avait été réalisé sur les coupes histologiques de nos biomatériaux après 28 jours de culture (Figures 41 et 42).

Une absence de marquage de l'OCN avait été relevée pour les biomatériaux constitués d'éponges de collagène seules, ensemencées avec les CSM-PD et mises en culture avec du milieu basal.

Dans la même condition de culture, les biomatériaux constitués de collagène/alginate/borosilicate avaient été faiblement marqués, alors qu'un marquage plus prononcé mais peu homogène avait été observé dans les matrices collagène/alginate et collagène/alginate/HA.

Ainsi, toutes les matrices ensemencées avec les CSM-PD et mises en culture avec un milieu de différenciation ostéogénique semblaient être positives pour le marquage de l'OCN. Dans cette condition de culture, les matrices de collagène, collagène/alginate et collagène/alginate/borosilicate semblaient exprimer un marquage cellulaire homogène dans les biomatériaux, plutôt localisé en périphérie pour le biomatériau enrichi en borosilicate.

On retrouvait sur les coupes des matrices constituées de collagène/alginate/HA un marquage important, notamment en périphérie du biomatériau, avec un marquage à la fois cellulaire et matriciel de l'OCN (Figure 43).

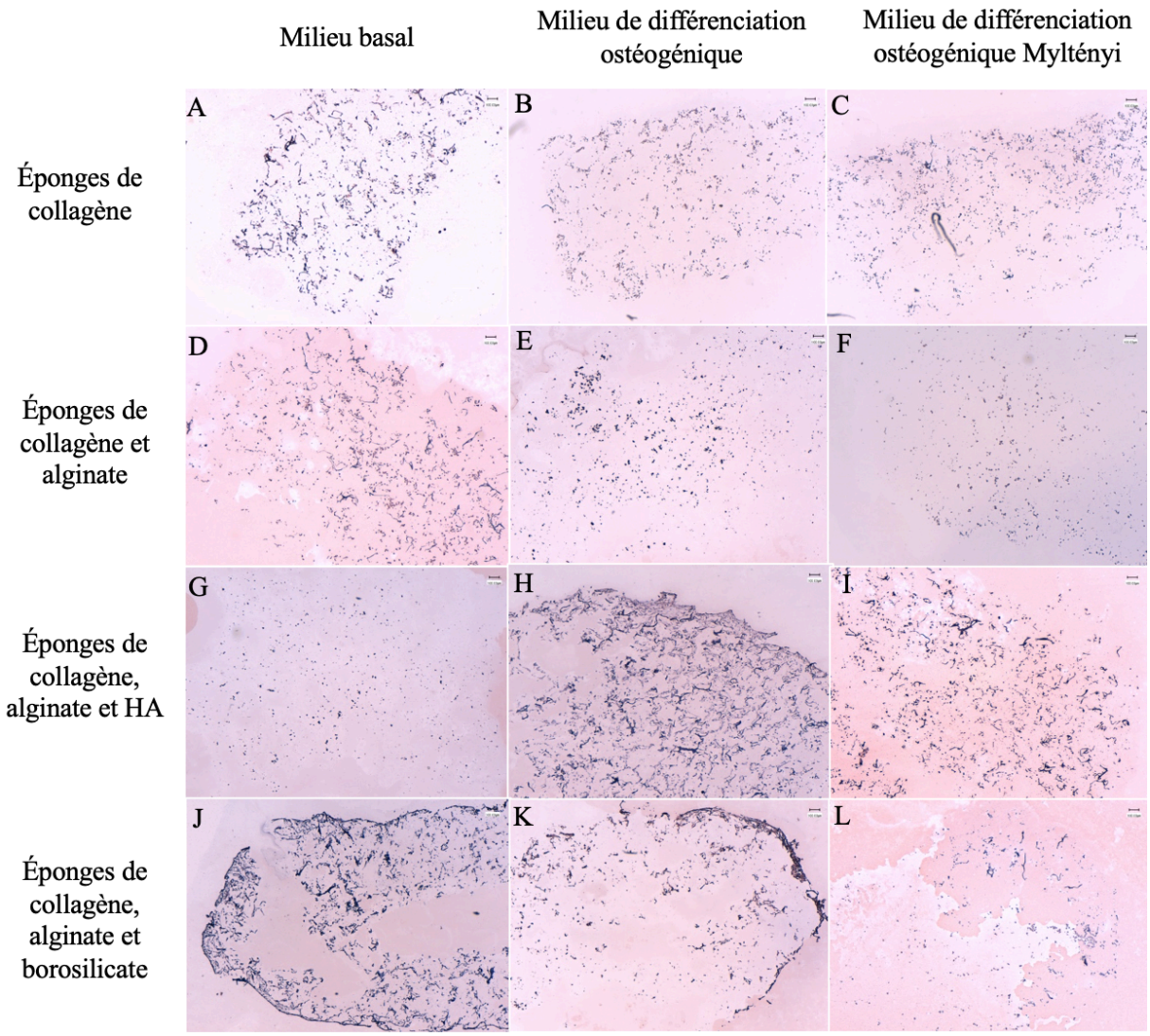


Figure 41 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (OCN). Absence de marquage visualisé sur les coupes d'éponges de collagène seul (A, B, C). Présence d'un marquage sur les coupes d'éponges de collagène et alginate enrichi ou non en HA et borosilicate (D à L). Optique x4 (n=3).

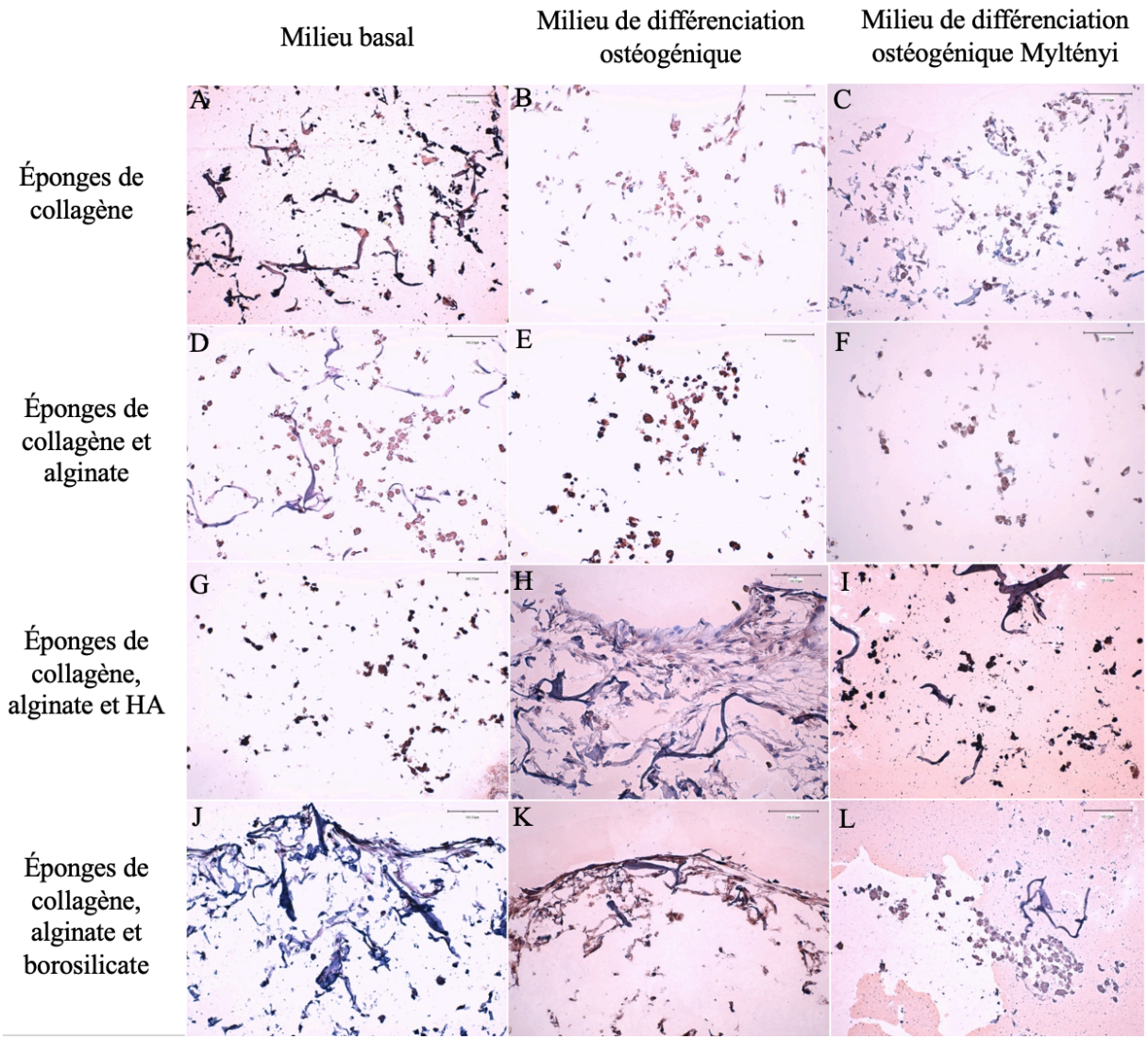


Figure 42 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (OCN). Absence de marquage visualisé sur les coupes d'éponges de collagène seul (A, B, C). Présence d'un marquage sur les coupes d'éponges de collagène et alginate enrichi ou non en HA et borosilicate (D à L). Optique x20 (n=3).

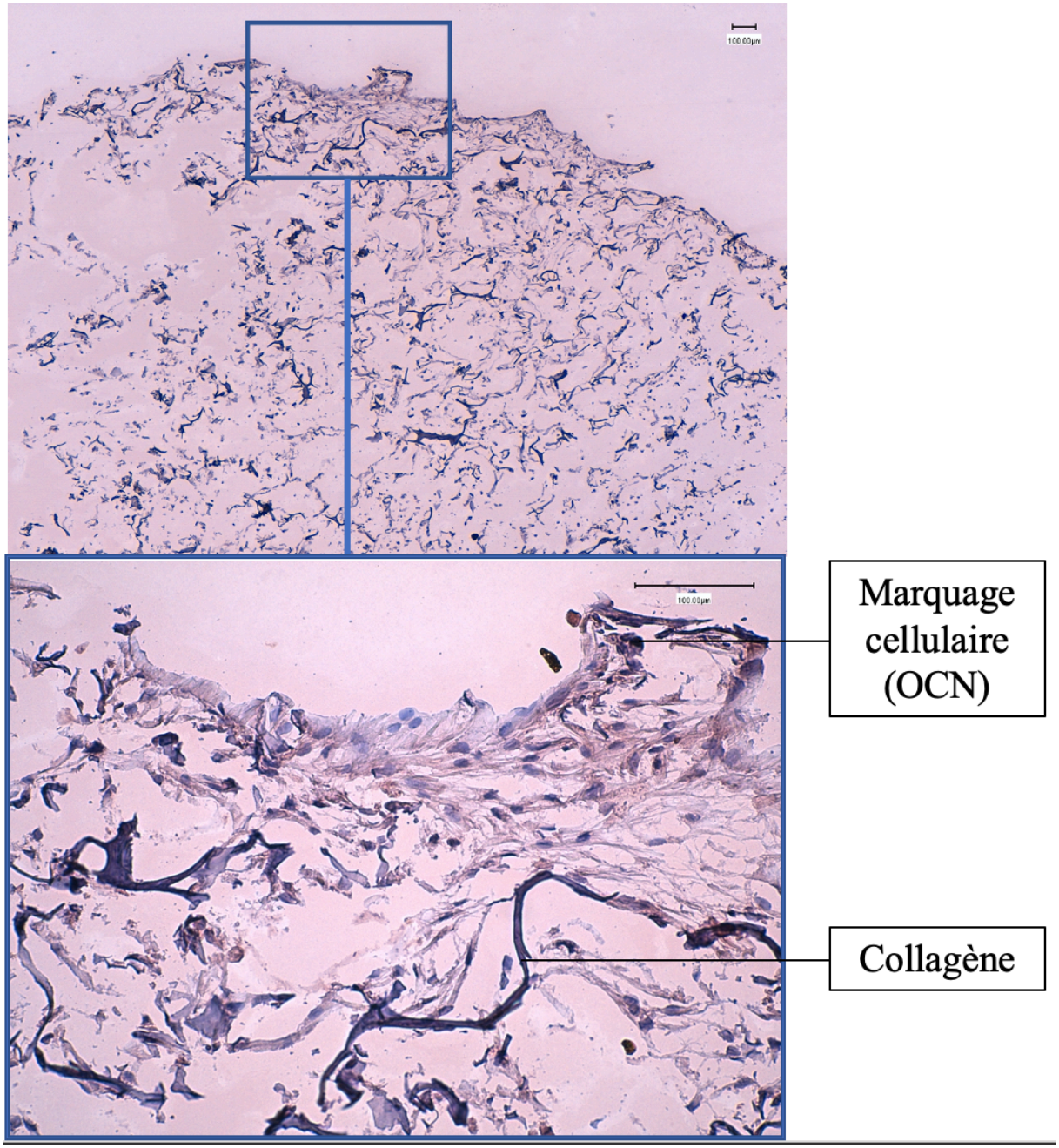


Figure 43 : coupes histologiques : éponge de collagène avec hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite, ensemencée avec CSM-PD. Marquage immunohistochimique (OCN). A : optique x4. B : optique x20 (n=3).

L'OCN est une protéine spécifique de la MEC osseuse et reflète la différenciation ostéogénique. De précédents travaux réalisés sur des CSM d'autres sources ensemencées dans des matrices de collagène et HA ont démontré des résultats similaires, avec la présence d'un marquage de l'OCN bien réparti dans les matrices (368,369). L'étude de Bhuiyan *et al* en particulier (369), a choisi un design expérimental proche de notre expérimentation, autant pour la densité

d'ensemencement que la durée de culture. Des CSM-MO ont été ensemencées dans des matrices de collagène/PLGA et HA et mises en culture durant 28 jours dans du milieu de différenciation ostéogénique. Le marquage en immunohistochimie réalisé après ces 28 jours a révélé une présence homogène de CSM-MO exprimant l'OCN au sein des biomatériaux, de manière similaire à ce que nous avons obtenu. Hayrapetyan *et al* ont également obtenu après 28 jours de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique, un marquage homogène de l'OCN dans des matrices de collagène et HA ensemencées avec des MSC-TA ou des MSC-MO (368).

L'ensemencement de CSM-PD dans des matrices de collagène (131) ou d'une association d'une phase organique (collagène) et minérale (silice) (174) a été réalisé *in vitro* (131) et *in vivo* (174). L'expression de l'OCN a été détectée après 40 jours de culture avec du milieu de différenciation ostéogénique (131) ou après implantation 8 semaines en site ectopique chez la souris (174). S'il est possible de faire une comparaison entre nos matrices de collagène/HA avec les matrices de collagène/silice (association d'une phase organique et minérale) des travaux de Niu (174), contrairement à nos résultats, cette équipe n'a pas obtenu de marquage de l'OCN dans les biomatériaux lorsque les CSM-PD étaient mises en culture avec du milieu basal. Cette différence de comportement cellulaire peut s'expliquer soit par les conditions d'expérimentation (*in vivo vs in vitro*), soit elle souligne les propriétés ostéoinductrices de l'HA sur la différenciation ostéogénique des CSM-PD.

La présence de l'OCN de manière homogène dans nos différentes matrices ensemencées avec les CSM-PD démontre qu'elles constituent un support adéquat pour un développement osseux harmonieux, en particulier les matrices composées de collagène/alginate et HA.

4.3.2.2. CD31

A J28, indépendamment de la condition de culture (milieu basal ou milieux de différenciation ostéogénique), un marquage de CD31 a été décelé pour l'ensemble de nos matrices : éponges de collagène seules, collagène/alginate, collagène/alginate/HA et collagène/alginate/borosilicate (Figures 44 et 45).

Ce marquage était important et réparti de façon homogène dans les matrices, avec néanmoins une localisation légèrement plus marquée en périphérie et moins au centre pour les biomatériaux constitués de collagène/alginate/borosilicate.

La condition « éponges de collagène enrichies avec l'hydrogel alginate/HA + milieu de différenciation ostéogénique » est celle qui permet d'obtenir le marquage le plus homogène avec une répartition du marquage dans l'ensemble de l'éponge.

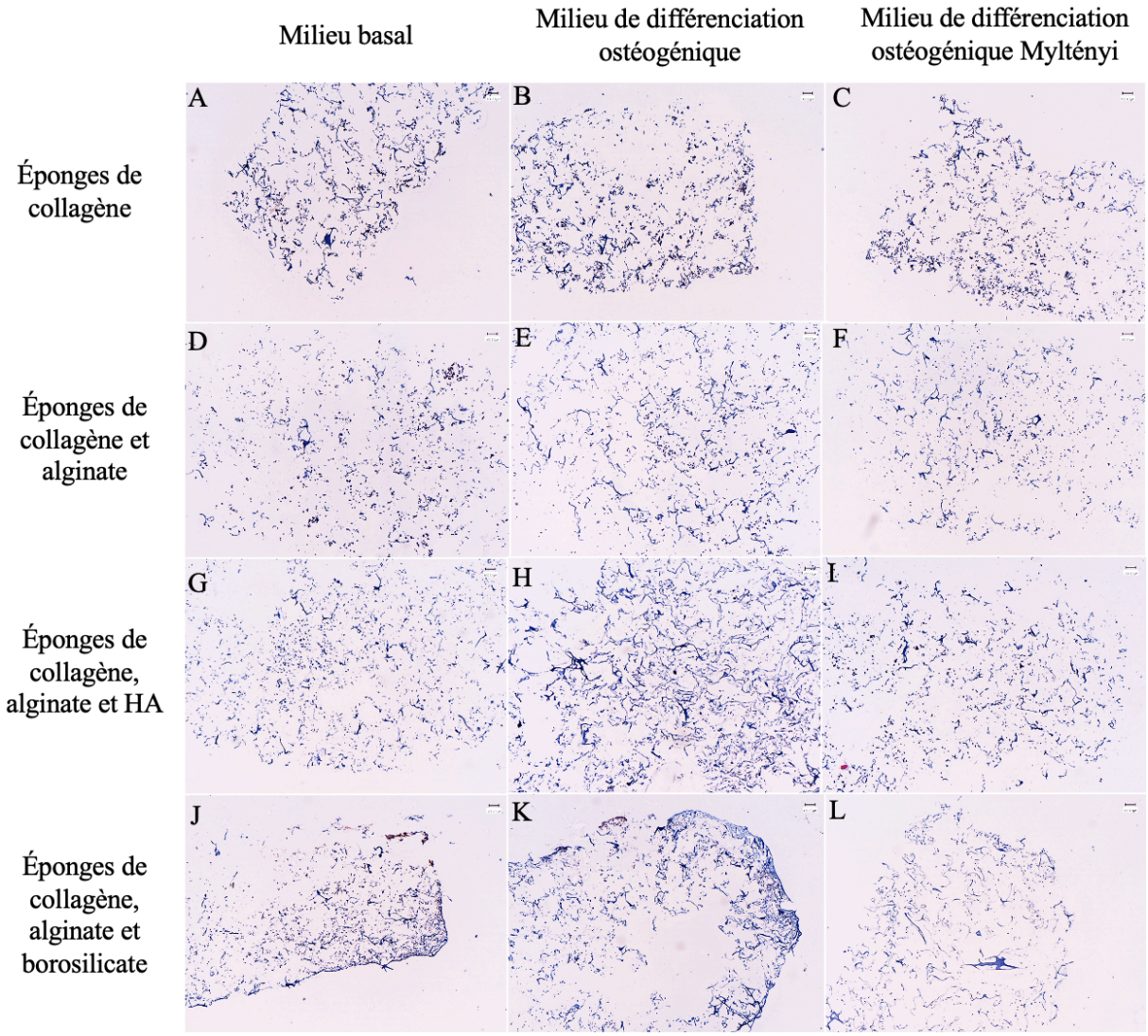


Figure 44 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (CD31). Présence d'un marquage sur toutes les coupes histologiques (A à L). Optique x4 (n=3).

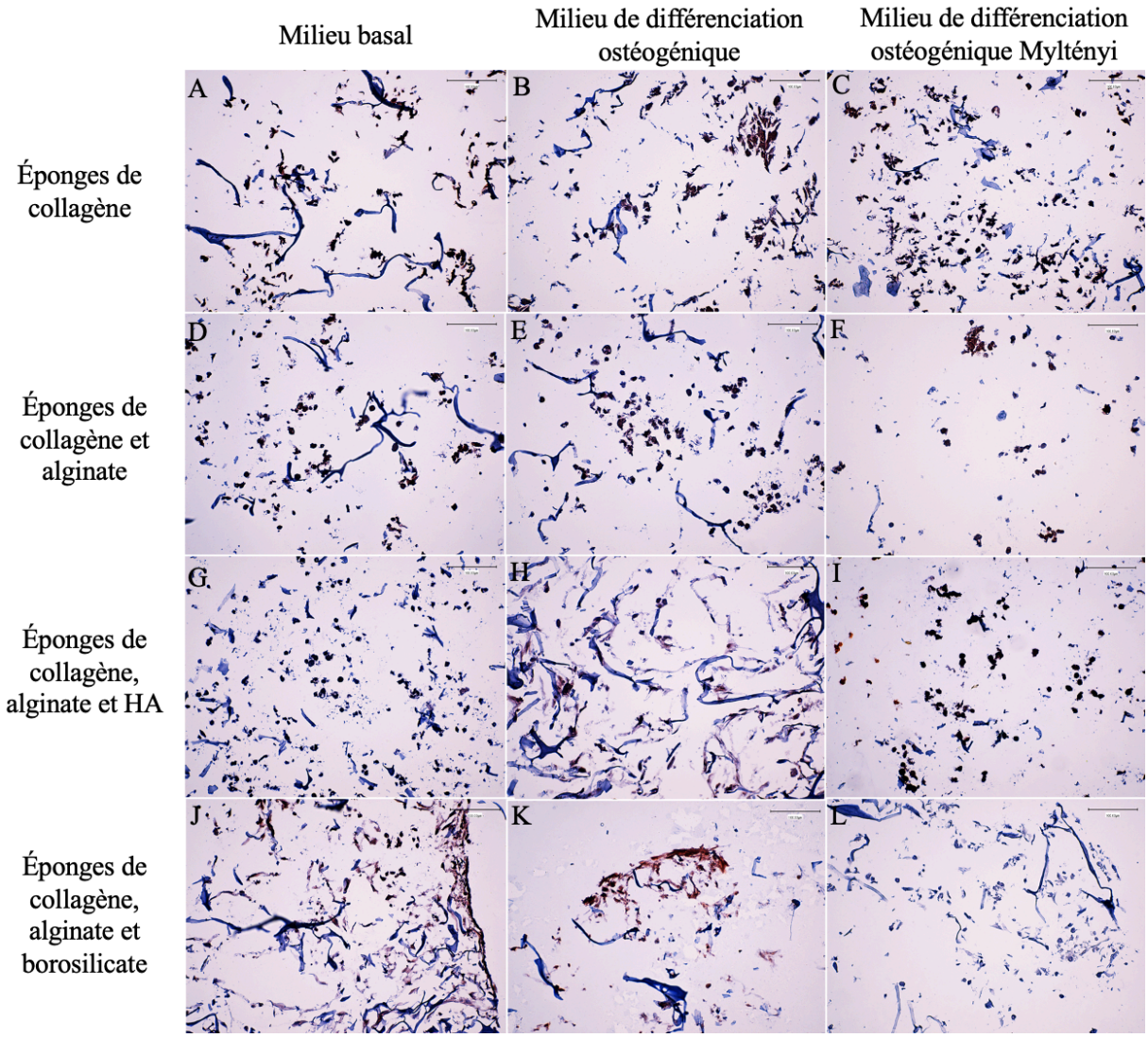


Figure 45 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (CD31). Présence d'un marquage sur toutes les coupes histologiques (A à L). Optique x20 (n=3).

CD31, ou PECAM1, est une protéine reflet de la prolifération endothéliale et de la néoformation vasculaire.

Il est intéressant de constater que nous avons obtenu un marquage homogène à J28 dans toutes nos matrices, toutes constituées d'une base d'éponge de collagène. Une étude *in vivo* a démontré que l'implantation chez le rat en site cutané d'éponges de collagène (*vs* une cicatrisation guidée sans éponges) permettait d'obtenir 1) une surexpression de CD31 après 14 jours 2) un marquage homogène et important de CD31 dans les biomatériaux, révélé en immunohistochimie sur les coupes des éponges implantées, et 3) une meilleure cicatrisation des sites lésés (373). La quantité et la distribution du marquage de cet acteur de la prolifération

vasculaire dans les biomatériaux apparaissent donc primordiaux pour l'obtention d'une néovascularisation et d'une meilleure régénération tissulaire.
Il a par ailleurs été démontré que la combinaison de CSM-PD à des matrices à base de collagène puis leur implantation *in vivo* dans des défauts osseux de taille critique chez le rat permet d'améliorer la qualité de la régénération osseuse et d'obtenir de plus vastes réseaux vasculaires en site d'implantation, par rapport aux matrices de collagène seules (138). De ces points de vue, les produits d'ingénierie tissulaire que nous avons développés semblent donc parfaitement satisfaire à ces points cruciaux qui sont en particulier l'ébauche du développement vasculaire et constituer des biomatériaux prometteurs pour une utilisation ultérieure *in vivo* en ingénierie tissulaire osseuse prévascularisée.

4.3.2.3. Ostéopontine

Le marquage de l'OPN réalisé à J28 s'était révélé présent uniquement dans les matrices constituées de collagène/alginate/HA mises en culture avec le milieu d'induction ostéogénique commercial. Dans ces matrices avec cette condition de culture, le marquage était extrêmement réduit avec seulement quelques cellules exprimant l'OPN au centre du biomatériau. Ce marquage est visualisé par une flèche noire en figures 46 et 47.
Aucun marquage n'avait été observé pour les autres conditions de culture (milieu basal et milieu de différenciation ostéogénique non commercial) pour les matrices de collagène, de collagène/alginate ou de collagène/alginate/borosilicate.
Cette faiblesse de marquage pourrait être liée au fait que l'OPN est un marqueur précoce de différenciation.

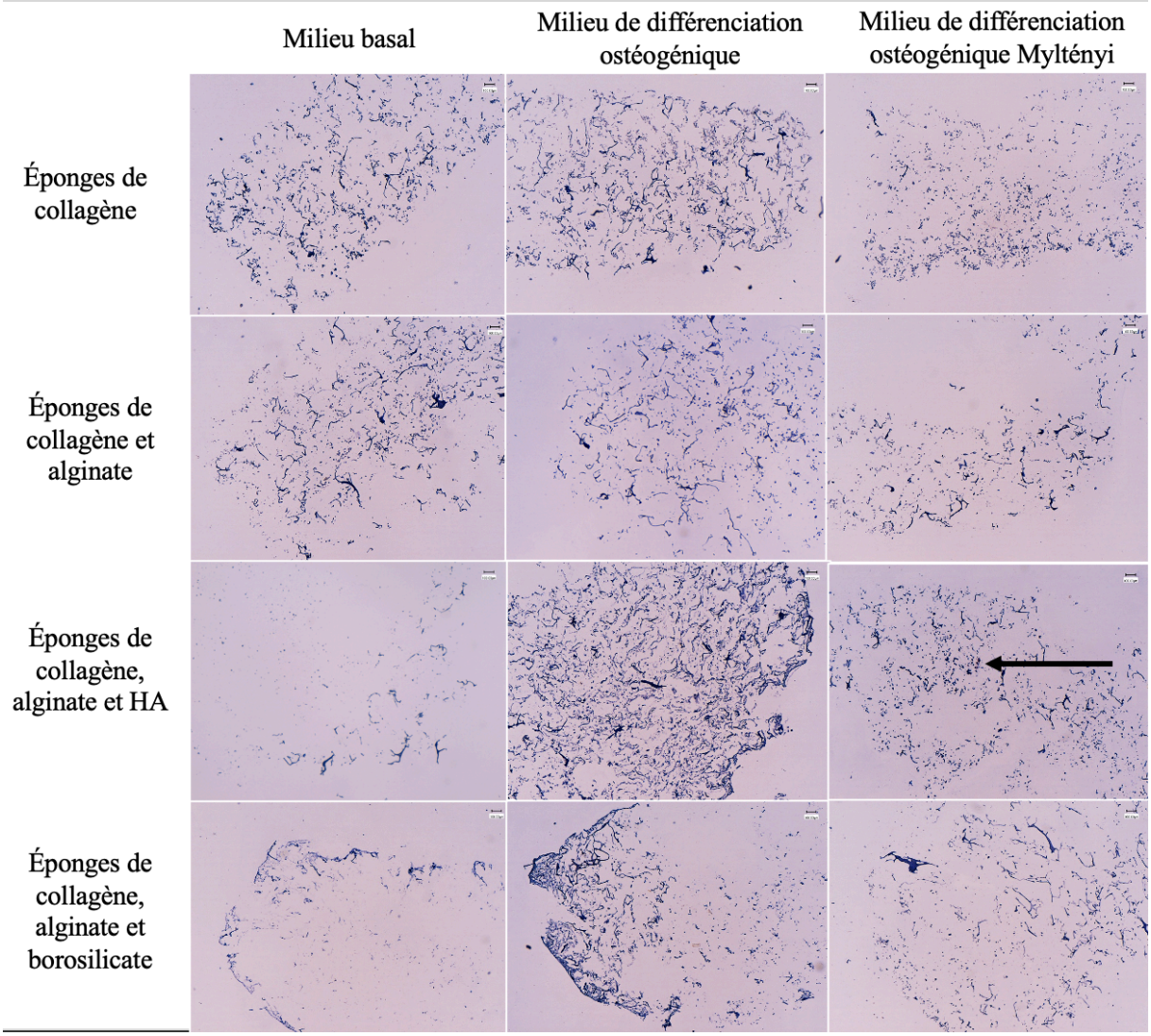


Figure 46 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (OPN) objectivé par la flèche noire. Optique x4 (n=3).

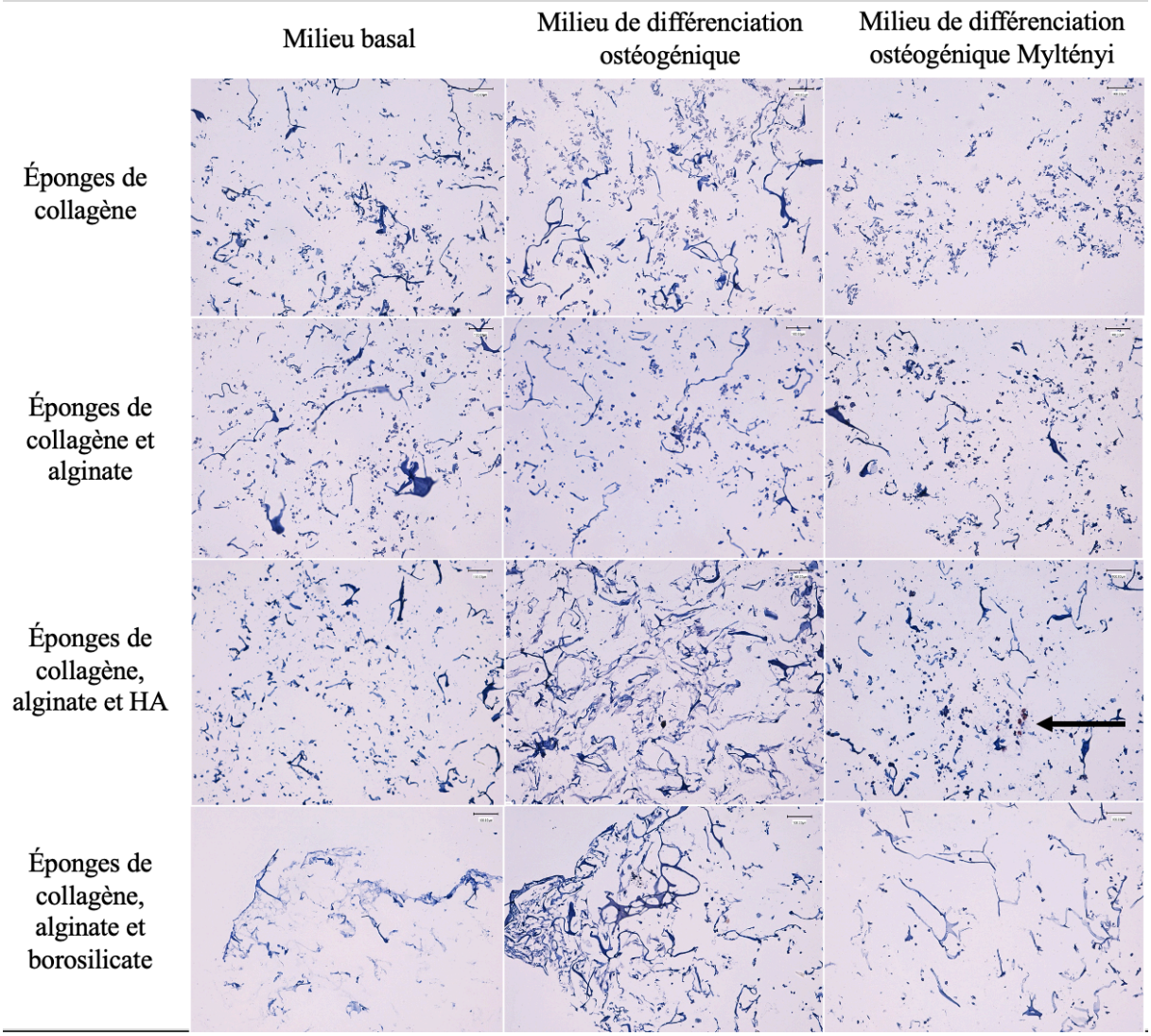


Figure 47 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (OPN) objectivé par la flèche noire. Optique x10 (n=3).

L'OPN est un marqueur précoce de la différenciation ostéogénique. Après 28 jours de culture, aucun marquage n'avait été observé à l'exception de quelques cellules dans les matrices de collagène/alginate/HA.

Peu d'études sont disponibles dans la littérature sur l'expression de l'OPN en immunohistochimie par les CSM-PD dans des biomatériaux similaires aux nôtres. Néanmoins, une équipe s'est intéressée à l'expression de l'OPN, visualisée par immunofluorescence dans des coupes de matrices de collagène ensemencées avec des CSM-PD (131). Dans ce travail, les auteurs ont mis en évidence une expression importante de l'OPN, homogènement répartie dans les matrices, après 8 jours de culture, avec un pic d'expression à 16 jours et ensuite une

décroissance progressive jusqu'à 40 jours. Notre analyse immunohistochimique du marquage de l'OPN ayant été réalisée après 28 jours de culture, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un marquage plus important aurait pu être observé plus tôt lors de la différenciation ostéogénique de nos CSM-PD et visualisé si nous avions réalisé ce même marquage à 8 ou 15 jours de culture comme l'a fait l'équipe de Riccio *et al* (131). Le faible nombre de cellules exprimant le marquage résiduel à J28 dans cette dernière étude pourrait aller dans le sens de notre hypothèse.

4.3.2.4. VE-Cadhérine

De la même manière que pour le marquage de l'OPN, le marquage de VE-Cadhérine avait uniquement été détecté pour quelques cellules dans les matrices de collagène/alginate/HA mises en culture avec du milieu de différenciation ostéogénique. Ce marquage peut être repéré par les flèches noires en figures 48 et 49.
Aucun marquage n'avait été détecté dans les autres matrices et pour les autres conditions de culture.

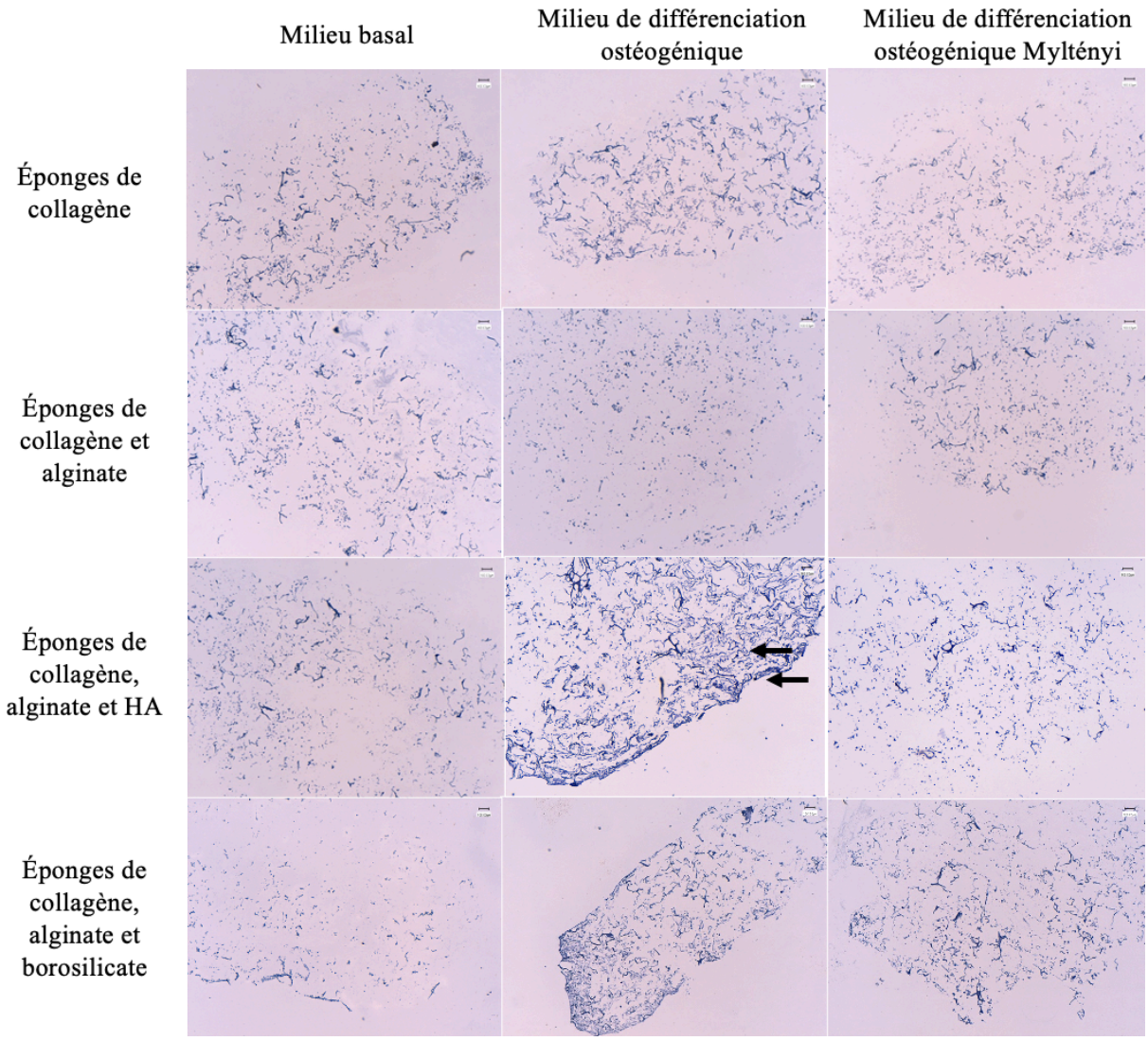


Figure 48 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (VE-Cadhérine) objectivé par les flèches noires. Optique x4 (n=3).

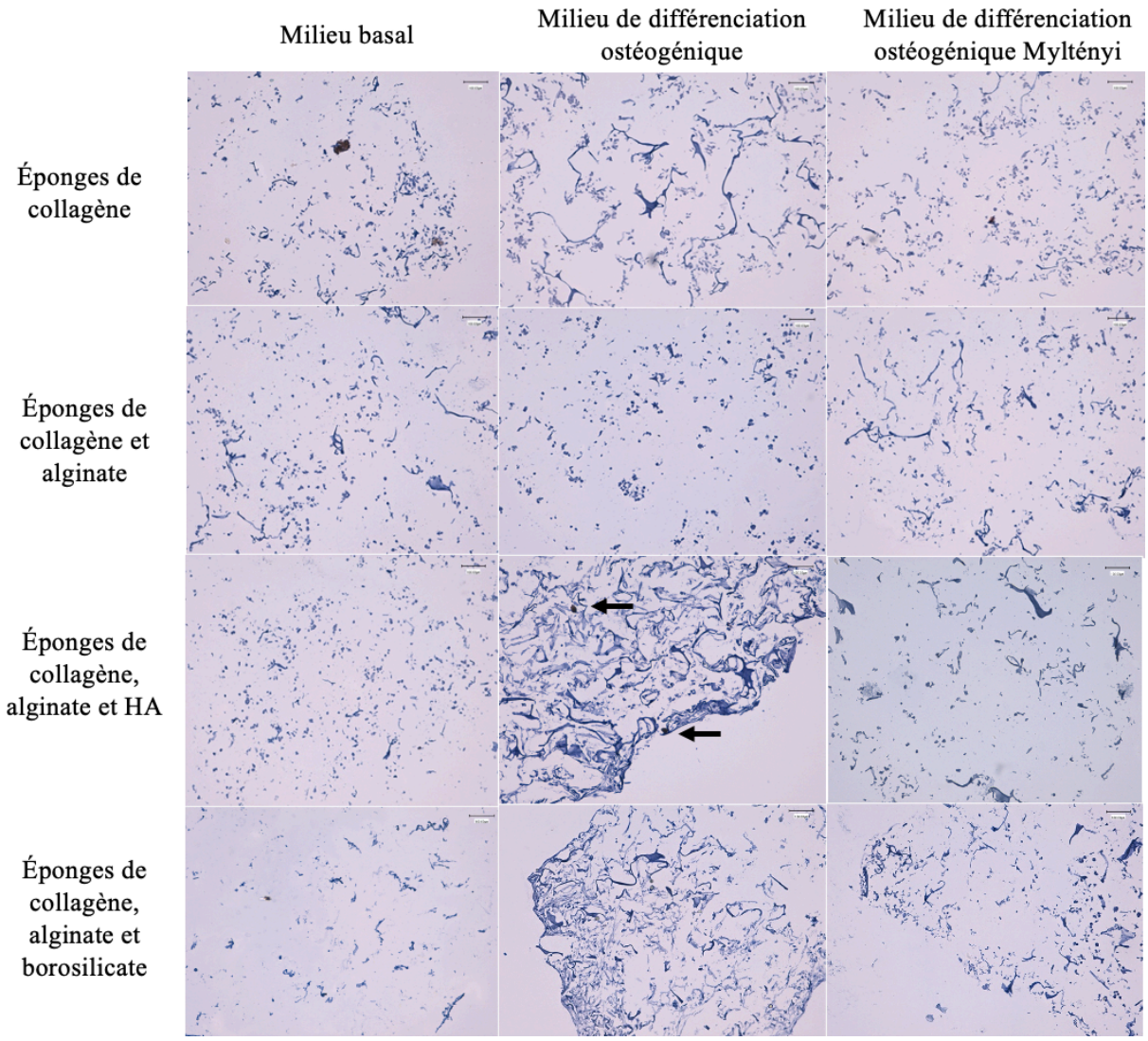


Figure 49 : coupes histologiques des biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD (28 jours de culture). Marquage immunohistochimique (VE-Cadhérine) objectivé par les flèches noires. Optique x10 (n=3).

La VE-Cadhérine est la molécule majeure des jonctions intercellulaires entre CE. Protéine transmembranaire d'adhésion, elle assure la cohésion des structures vasculaires et est impliquée dans l'homéostasie des CE ainsi que dans la signalisation intercellulaire (374). La VE-Cadhérine est nécessaire à l'organisation d'un système vasculaire stable durant l'angiogenèse et il a été démontré que son absence empêche les CE de s'organiser en structures vasculaires fonctionnelles (375). L'absence de présence d'un marquage de la VE-Cadhérine (à l'exception du très faible nombre de cellules marquées pour les biomatériaux collagène/HA/alginate) dans nos travaux pourrait être expliquée par le fait que la néo vascularisation dans nos biomatériaux, suggérée par la présence de cellules exprimant CD31, n'est pas à un stade de réseau vasculaire

stable et organisé. Nous n'avons pas pu comparer ces résultats à d'autres expérimentations similaires publiées dans la littérature, non disponibles à notre connaissance.

Pris dans leur globalité, les résultats de cette partie de nos travaux semblent démontrer que nous avons obtenus une différenciation ostéogénique et angiogénique dans nos biomatériaux ensemencés avec les CSM-PD après 28 jours de culture dans du milieu de différenciation ostéogénique. Par ailleurs, parmi nos différents choix de biomatériaux élaborés pour l'ensemencement cellulaire, celui qui semble favoriser au mieux les capacités de colonisation, prolifération et différenciation des CSM-PD semble être le biomatériau de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en HA.

Afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus en 2D, il serait intéressant de refaire cette étude en comparant l'influence de la teneur en glucose de l'environnement sur la différenciation ostéogénique des cellules cultivées en 3D (milieux *low et high glucose*).

---

5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Actuellement, la prise en charge des pertes de substance osseuse de grande étendue représente un défi majeur en médecine. Si la chirurgie, les greffes osseuses autologues ou l'utilisation de substituts osseux permettent dans certaines situations de faire face à ces pertes de substances qu'elles soient d'origine infectieuse, traumatique, tumorale ou congénitale, ces solutions trouvent leurs limites et ne permettent pas d'offrir des réponses à toutes les situations cliniques (2,3,376). La prise en charge des défauts osseux de taille critique notamment, impose de rechercher des alternatives aux options thérapeutiques « classiques » et nous fait nous tourner vers l'ingénierie tissulaire osseuse. La recherche d'une stratégie se basant sur la triade de cette ingénierie tissulaire (cellules, matrice, molécules bioactives), impose de développer un substitut osseux alliant ces trois acteurs tout en potentialisant leurs propriétés respectives et réciproques, et les atouts qu'ils peuvent apporter pour la médecine régénérative osseuse *in vivo*.

Nous avons choisi de nous intéresser à ces trois axes de recherche afin de développer un biomatériau fonctionnel pour l'ingénierie tissulaire osseuse, par 1) la création d'une matrice mimant au mieux le tissu osseux natif et sa MEC par le développement d'un biomatériau innovant composé de collagène, alginate et HA, 2) l'ensemencement de notre biomatériau par une source cellulaire prometteuse et obtenue de façon non invasive : les CSM-PD, 3) la détermination des conditions environnementales les plus appropriées et 4) par l'emploi de nanovésicules permettant l'encapsulation de facteurs de croissance et n'impactant pas les propriétés intrinsèques de nos CSM-PD : les nanoliposomes de lécithine de colza.

Ce travail a tout d'abord permis d'évaluer le comportement des CSM-PD cultivées en deux dimensions sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux : la présence de nanovecteurs, la concentration en glucose, la densité d'ensemencement et la présence de collagène dans les plaques de culture.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons tout d'abord démontré que les CSM-PD ne semblent pas impactées par la présence de certaines stimulations environnementales comme l'exposition aux nanoliposomes de lécithine de colza, qui n'ont pas induit de cytotoxicité ou soulevé des problèmes de biocompatibilité. Les nanoliposomes possédant des propriétés d'encapsulation, nous pourrions donc envisager de les utiliser pour vectoriser certains facteurs de croissance comme la famille des BMP et potentialiser les capacités intrinsèques (prolifération, différenciation) des CSM-PD en ingénierie tissulaire osseuse. Nous avons

ensuite déterminé qu'une densité d'ensemencement trop faible semblait délétère pour les CSM-PD et semblait altérer leur viabilité, prolifération et capacités de différenciation ostéogénique. Enfin, nous avons démontré d'une part que la capacité de différenciation ostéogénique des CSM-PD est similaire que ce soit en présence d'une faible (condition physiologique) ou d'une forte teneur en glucose (condition hyperglycémique), et d'autre part que la viabilité et la prolifération de ces cellules ne sont pas altérées dans des conditions hyperglycémiques. Les CSM-PD pourraient donc présenter un intérêt en ingénierie tissulaire chez le patient diabétique du fait de leur résistance au glucose et l'utilisation du milieu à faible teneur en glucose sera favorisé *in vitro* pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques.
Nous avons ensuite développé un modèle en trois dimensions *in vitro*, basé sur un biomatériau original pour l'ensemencent des CSM-PD et leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse, combinant HA, éponges de collagène et alginate. Cette association propose à la fois des propriétés mécaniques optimales et un microenvironnement favorable à la survie, la prolifération et la différenciation des CSM-PD en son sein. Cette partie de nos travaux a montré que les CSM-PD peuvent coloniser nos matrices, y proliférer et y déployer des capacités de différenciation ostéogénique, particulièrement remarquables lorsqu'elles sont ensemencées dans une matrice composée d'une association de collagène, alginate et HA. Nous avons également pu observer la présence de cellules endothéliales-like, probablement le reflet d'un processus de différenciation vasculaire engagé dans nos biomatériaux et prometteuse pour l'obtention d'un substitut osseux prévascularisé. Notre biomatériau innovant associant éponges de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite semble être donc un support de choix pour la différenciation ostéogénique des CSM-PD et l'obtention d'un substitut osseux prévascularisé.

Les résultats encourageants obtenus *in vitro* doivent être poursuivis par une validation de notre substitut osseux *in vivo*. Ainsi, il sera nécessaire de tester sa biofonctionnalité et d'évaluer ses capacités à induire une néoformation osseuse *in vivo* pour régénérer des défauts osseux. Pour cela, il sera intéressant d'une part, d'évaluer les capacités mécaniques de notre biomatériau et d'autre part, de tester notre substitut osseux dans des modèles de défauts osseux chez le petit animal. Nous pouvons envisager d'implanter notre biomatériau ensemencé par des CSM-PD dans des défauts osseux de taille critique de calvaria chez le rat ou le lapin afin d'évaluer ses capacités de générer une néoformation osseuse *in vivo,* après avoir testé ses capacités de résistance biomécanique.

Par ailleurs, l'optimisation des biomatériaux pour une utilisation clinique impose de concevoir leur réalisation en respectant des procédés de fabrication suivant les normes internationales et européennes. L'usage thérapeutique clinique implique de satisfaire à des recommandations de sureté et de choisir des pratiques reproductibles, standardisées et économiquement satisfaisantes. En Europe, les CSM sont considérées comme des produits de thérapie cellulaire (PTC) et leur utilisation est réglementée par la législation sur les médicaments de thérapie innovante (MTI). Ainsi, la production et l'utilisation clinique des CSM doivent être en accord avec les recommandations de bonne pratique européennes en vigueur qui imposent des contrôles qualité drastiques en termes de collection de l'échantillon, d'isolement des cellules, de transport, de manufacture, de stockage et du choix des réactifs utilisés répondant aux normes de l'utilisation clinique (353). Utiliser les CSM-PD comme MTI impose également une manipulation minimale des cellules (377).

Dans cette optique, il est ainsi recherché des solutions alternatives à l'utilisation de sérum d'origine xénogénique pour la culture cellulaire des CSM afin de réduire les risques de transmission d'agents pathogènes, l'incorporation de protéines exogènes et les réactions immunitaires que son utilisation engendre (280). L'utilisation de milieu de culture sans ajout de sérum a été explorée sur les CSM-PD (103,378–381), les CSM-MO (378,382,383), les CSM-TA (384) ou les CSM-CO (385,386), avec des résultats mitigés et une évidente difficulté des cultures primaires (280). Pour certains auteurs, l'utilisation de milieu sans sérum semble affecter les propriétés « souches » des CSM-PD et modifier leur phénotype, entrainant une régulation positive des marqueurs de différenciation ostéogénique et une perte des marqueurs de différenciation adipocytaires et chondrogéniques (378). L'utilisation de milieu sans sérum semble également affecter l'adhésion cellulaire (381) et la prolifération des CSM-PD (379) aux passages tardifs. D'autres travaux réalisés sur les CSM-PD ont à l'inverse démontré que la culture primaire sans sérum n'affectait ni leur temps de doublement ni leur prolifération et ne modifiait pas leur phénotype entre les passages 1 à 4 (387,388). Face à ces limites, il semble judicieux de chercher soit à enrichir ces milieux sans sérum avec des facteurs de croissance comme le FGF, l'insuline transferrine sélénium (ITS), l'acide ascorbique ou le cholestérol (380), soit à chercher d'autres alternatives pour remplacer le sérum xénogénique, l'utilisation de molécules exogènes étant limitée par le cadre réglementaire (377). Parmi ces alternatives, l'utilisation de lysat plaquettaire pourrait représenter une solution intéressante (142,389) (Annexe 5). Le lysat plaquettaire appartient à la famille des concentrés plaquettaires dérivés du sang. Bioactifs, les concentrés plaquettaires sont utilisés notamment en odontologie depuis les années 1990 pour la régénération tissulaire, seuls ou associés à des substituts osseux ou à des

greffes osseuses autologues (390). Les concentrés plaquettaires sont obtenus après prélèvement sanguin et différentes centrifugations ou procédés de lyse de la paroi cellulaire. Cela permet de libérer les facteurs de croissance, facteurs de coagulation et cytokines contenus dans le cytoplasme des thrombocytes, dont le TGF-β, le PDGF, l'EGF, les MMP, l'endostatine, l'angiostatine, le BDNF, le fibrinogène, le facteur de Willebrand, l'IL-8, les MCP-1 et 3 et RANTES (391). Le lysat plaquettaire peut être obtenu en lysant la paroi plaquettaire par des cycles de congélation-décongélation, par les ultrasons ou par l'induction de thrombine entrainant la dégranulation thrombocytaire (392). Il a été démontré *in vitro* que l'utilisation de milieu de culture enrichi en lysat plaquettaire permet d'obtenir de forts taux de prolifération et de différenciation des CSM (393), des fibroblastes (394), des ostéoblastes (395), des kératinocytes (396), des myoblastes (397) ou des CE (398). Le lysat plaquettaire semble également promouvoir la prolifération et la différenciation ostéogénique des CSM-PD *in vivo* et *in vitro* à une concentration de 5% dans le milieu de culture (142,399). L'utilisation de concentrés plaquettaires comme substituts des sérums xénogéniques semble donc une piste intéressante pour la culture, la manufacture des CSM-PD et leur utilisation comme MTI.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V.

Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy.

Tissue Engineering Part B, 2019, 25 : 78-88

Tissue Engineering
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168

Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy

Charlène Kichenbrand, DDS, Emilie Velot, PhD, Patrick Menu, PhD, Vanessa Moby, DDS, PhD.

Kichenbrand C [1,3,4], Velot E [1,2], Menu P [1,2], Moby V [1,3,4,*].

[1] CNRS UMR 7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Université de Lorraine, Biopôle de l'Université de Lorraine, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France.

[2] Faculté de Pharmacie, Nancy, France.

[3] CHRU de Nancy-Service Odontologie, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[4] Faculté d'Odontologie, Université de Lorraine, Nancy, France.

* Corresponding author : vanessa.moby@univ-lorraine.fr

Running title: Dental pulp-derived conditioned medium and therapy

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Abstract

Mesenchymal stem cells have a lot of potential in regenerative medicine and mesenchymal stem cell-based therapies are currently explored in numerous research fields. Among these cells, deciduous or permanent dental pulp-mesenchymal stem cells represent a promising option in tissue engineering. This expectation is based on their capacity to self-renew, to repair various damaged tissues and organs due to their multipotency, as well as their ability to modulate immune system. They present other advantages such as the harvesting by a simple, painless and non-invasive procedure and the absence of ethical considerations.

The role played by these cells in the reparative process is mainly attributed to paracrine mechanisms mediated by their secreted factors, namely the secretome. The secreted factors can be found in the cell culture medium, called conditioned medium. Moreover, conditioned medium presents many advantages compared to cells such as possible use in allogeneic therapies. This mini review aims at investigating the therapeutic use of dental pulp mesenchymal stem cell-derived conditioned medium, in order to develop cell-free therapies. The analysis of the available literature illustrates its massive panel of potential applications: mainly reduction of inflammation, promotion of angiogenesis and neurogenesis, reduction of stroke or ischemia, and organ regeneration. Furthermore, studies often highlight its superiority over the other sources of conditioned medium derived from other stem cells for the same applications.

Dental pulp mesenchymal stem cell-derived conditioned medium is an attractive non-invasive and acellular tool for therapeutic approaches in regenerative medicine. This promising novel approach should be further explored for clinical applications.

Key words: Mesenchymal stem cells, conditioned medium, secretome, dental pulp, regenerative medicine

Impact Statement:

Regeneration of damaged tissues represents a major public health issue. Mesenchymal stem cells (MSC) have many potentialities in regenerative medicine. The role played in the reparative process is mainly attributed to factors released by these cells: their secretome,

which can be found *in vitro* in the conditioned medium (CM). Among MSC, dental pulp MSC represent a promising option in tissue engineering. Studies often highlight the superiority of dental pulp MSC-derived CM over the other sources of CM for the same applications. This attractive non-invasive and acellular tool could represent a new landscape of cell-free therapeutic strategies in tissue regeneration.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) are unspecialized cells characterized by their self-renewal capacity and their differentiation potential into multiple cell lineages. They can be isolated from several sources of adult tissues such as bone marrow, adipose tissue, peripheral blood, dental pulp, as well as perinatal tissues such placenta, cord blood and umbilical cord. [1-3] Despite painful and invasive harvesting, bone marrow represents currently the most popular source of MSC for clinical applications. [4]

However, investigations have shifted to less invasive MSC sources without any ethical concerns. The dental pulp is a connective dental soft tissue, which represents an attractive option for tissue regeneration and answers to these criteria. Each dental pulp provides a large number of cells that easily supports cryopreservation. [5] Dental pulp collection is realized during routine dental acts and does not need supplementary processes. Dental pulp tissue can be extracted from two different sources of teeth: adult teeth, mostly third molar extracted for therapeutic routine, or deciduous teeth. Dental MSC can be isolated from the dental pulp tissue by two techniques: enzymatic digestion (dispase and collagenase) or mechanical extraction by explants methods. [6] Adult teeth and exfoliated deciduous teeth provide respectively dental pulp stem cells from permanent teeth (DPSC) and dental pulp stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). DPSC and SHED are both excellent candidates for tissue engineering, but do not present exactly the same degree of maturity: SHED represent a more immature stem cell population than DPSC. [7]

Like MSC from other sources, DPSC and SHED are not identified by a specific marker but by a panel of positively expressed surface markers including STRO-1, cluster of differentiation (CD) markers such as CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, and other negatively expressed markers such as CD14, CD34, CD45 or human leukocyte antigen (HLA) markers. They can differentiate into mesodermal lineages (adipocytes, osteocytes, odontoblates, and chondrocytes), ectodermal (neurocytes) and endodermal lineages. [3] DPSC and SHED have been reported to have regeneration capacities of various tissues (bone, adipose, or neuronal tissue). [5, 8] It also has been demonstrated [2] that the DPSC potential in terms of proliferation and ability to induce mineralisation is greater than bone marrow MSC (BMSC) potential. Lastly, DPSC can be combined with many scaffolds to regenerate tissue defects and have immune privilege and anti-inflammatory properties

that make them prime candidates among MSC for *in vivo* allogeneic transplantations. [2] Dental pulp is considered as an excellent non-invasive source to be used for regenerative therapies.

It is currently admitted that the therapeutic potential of MSC depends greatly of the release of molecules and factors in the extracellular environment. [9] These secreted substances are endowed with paracrine activity and are defined as the secretome, which includes soluble factors (proteins, nucleic acids, lipids) and extracellular vesicles (EV). Soluble factors derived from BMSC are commonly studied and used in regenerative medicine whereas EV have begun to cause increased attention. EV can be subdivided into apoptotic bodies (large EV), microparticles (medium and small EV) and exosomes (small EV (sEV)) [10-12]. There is an increasing evidence that secretome containing EV, or the EV themselves, are responsible of the regenerative abilities of MSC and retain the homing properties of their parent cells [12,13]. This secretome displays immunomodulatory, anti-apoptotic, angiogenic and anti-inflammatory activities, is involved in wound healing and tissue regeneration, and could have neuroprotective and antitumoral effects. [14] Secretome is contained in the conditioned medium (CM) *in vitro*.

Currently, CM is collected by various methods according to studies: it can be obtained from 24h [15-19] to 72h [20-26] or every two or four days [27] after cell conditioning, at different cell confluencies (from 50%[15, 17, 28] to 80%[29, 30, 22, 31]) or culture passages (from passage 3 [29, 32] to passage 10 [21]). However, all authors performed a starving of DPSC or SHED by maintaining culture medium supplemented with serum [33, 27] or switching it to serum-free medium [15, 16, 21, 23, 25, 26, 29, 30, 32, 34-36] or low serum concentration (0.1% [20], 0.5% [27]). Then, the culture medium was collected, centrifugated [21, 25, 27, 29, 32] or concentrated [15, 16, 19, 36, 37] and the supernatent constituting the conditoned medium was stored with [15, 17, 33, 37] or without [16, 20] proteinase inhibitors. Finally, the CM can be immediately used [37] or frozen at -30°C [37] or -80°C [15, 17, 20, 27].

The CM isolation and production protocols need to be standardized and to respect good manufacturing practices in order to be considered for clinical applications.

Furthermore, to our knowledge, a DPSC or SHED secretome comprehensive analysis with proteomic characterization was conducted only by two groups. Kumar *et al.* have

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

performed a partial proteomic characterization of DPSC-CM, as an hepatic lineage proteins analysis. [25] Tachida *et al.* have explored secreted protein profiles of DPSC-derived CM by mass spectroscopy. [36] A proteomic analyses of SHED-derived CM has not been conducted so far. This characterization was performed on BMSC secretome by recents works. [38-40] Schira performed a proteomic and functional analysis of the secretome. They have characterized more than 1000 proteins in the BMSC-derived CM. [38] The mapping of MSC secretome revealed a huge variety of growth factors and cytokine profile, and showed the essential role of extravesicules. The same proteomic analysis of the DPSC secretome has to be conducted.

Recently, a research has highlighted the regenerative potential of DPSC-CM or SHED-CM. Very few works have evaluated the interest of EV derived from DPSC-CM as a therapeutic tool in regenerative medicine. [41-43] All agree to emphasize the importance of EV in the regenerative induction capability of MSCs. These CM could represent a new landscape of cell-free therapeutic strategies in tissue regeneration.

.

This minireview focuses on the therapeutic potential of conditioned medium derived from DPSC or SHED in regenerative medicine (Figure 1) and aims at making a statement on the recent developments in this field.

Search strategy

We have selected all publications evaluating the effects of dental pulp MSC (SHED and DPSC) in *in vitro* and *in vivo* models of tissue regeneration by using Pubmed electronic database and the following search terms: “conditioned medium or secretome” and “dental pulp stem cells or stem cells from human exfoliated deciduous teeth” and “regenerative medicine or tissue regeneration”. Researches were performed by two independent individuals. We have included all *in vitro* and *in vivo* studies that evaluated the effects of DPSC-CM or SHED-CM in regenerative medicine. We have selected only articles written in English.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

DPSC-and SHED-conditioned medium as new therapeutic alternative.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

1. Reparation of dental tissues.

Dental diseases have been ranked by the World Health Organization as the most prevalent diseases worldwide. [44] Caused by poor oral hygiene, xerostomia or treatments such as chemotherapy or radiotherapy, it can lead to irreversible damages of dental tissues, inflammation or necrosis of dental pulp. Currently, there is a lack of therapeutic solutions to regenerate dental damaged tissues. Thus, it may be interesting to benefit from the CM regenerative potential to restore dental tissues.

DPSC-CM can promote proliferation and migration of cells such as fibroblastic cells [45], myoblast cells [15] or DPSC. [16] These effects were decreased with Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium (BMSC-CM) and Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium (ASC-CM). [16] These results were confirmed *in vivo* by Hayashi who observed that DPSC-CM has the highest migratory effect on host odontoblastic cells as compared to the other evaluated CM. [17] This promotion can be potentialized by modification of cell environment. For example, the use of CM obtained from DPSC mobilized by Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) [45] or the combination of DPSC-CM with a chemical agent as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [15] has improved the positive effects of DPSC-CM described previously.

These studies highlight also the beneficial effect of DPSC-CM on odontoblastic differentiation. Murakami *et al.* (2015) showed that DPSC-CM promotes *in vitro* odontoblastic differentiation of DPSC. [16] This induction was increased when DPSC-CM was replaced by BMSC-CM or ASC-CM. The DPSC-CM effects could be due to the presence of high levels of cytokines involved in odontoblast differentiation such as: Neurotrophin 3 (NT3) or Bone Morphogenetic Protein (BMP) in DPSC-CM. [46] It is also known that NT3 expression is upregulated during differentiation of dental MSC into odontoblasts [47] and accelerated pulp cell differentiation [48], whereas BMP promote odontoblastic differentiation. [49] However, the unique use of DPSC-CM was not sufficient to induce odontoblastic differentiation of nondental cells such as myoblast cells. EDTA supplementation was necessary because it helps to create a favorable microenvironment for pulp regeneration by selecting biochemical components. [15] On the contrary, Huang *et*

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

al. pointed out the *in vivo* stimulatory effect of DPSC-CM on odontoblastic differentiation and more particularly a component of this CM: the exosomes. [41] These small EV of nanometeric scale are secreted from healthy and unhealthy cells, notably mesenchymal stem cells. They are involved in intercellular communications and are implicated in the protection and regeneration of damaged tissues. [50] Huang *et al.* compared in an *in vivo* ectopic tooth transplantation model the effects of DPSC derived exosomes and DPSC alone on odontoblastic differentiation. The odontoblastic differentiation occurred only with DPSC exosomes. [41]

In summary, the studies highlight that DPSC-CM presents a greater efficiency on odontoblastic differentiation compared to BMSC-CM and ASC-CM, opening a huge landscape of possible applications of DPSC-CM in regeneration of dental tissues. It will be interesting to evaluate its capacity to regenerate non-dental tissues notably extraoral tissues.

2. Vascular diseases.

Ischemia reduction and promotion of neovascularization are two major elements to consider when assessing impact reduction of many thrombotic diseases like cardiovascular ischemic strokes.

Different research teams conducted studies on DPSC-CM paracrine effects on endothelial cells and angiogenesis. Controversial results are described in the literature. Indeed, DPSC-CM can promote [28] or not [20] proliferation of endothelial cells. However, the protocol design was different in the two studies: on the one hand, macrovascular endothelial cells were cultured in presence of 20 % CM while on the other, microvascular endothelial cells were cultured in presence of 100% CM. DPSC-CM enhances migration of endothelial cells [20] as well as SHED-CM. [21] DPSC-CM showed anti-apoptotic capacities [28], which were greater than those promoted by ASC- or BMSC-CM. These anti-apoptotic capacities were applied on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) [28], fibroblast cell line NiH_3T_3 [45] or myocytes. [21] Yamagushi *et al.* (2015) compared this property to that of SHED-CM. [21] Furthermore, SHED-CM could influence the immune system by exerting an immunomodulation of NiH_3T_3 cells [33] or suppress the expression of proinflammatory

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

cytokines (Tumor Necrosis Factor α (TNFα), Interleukin (IL)-1β and -6, inducible nitric oxyde synthase (iNOS)) and then acute inflammatory response of myocytes [21] or chronic inflammatory response of macrophages. [29, 32] Moreover, intravenous injection of SHED-CM in a mouse model of myocardial ischemia allows a reduction of the infarct size, apoptosis and inflammation in the ischemic myocardium. [21] These effects were greater compared to those of ASC- and BMSC-CM.

DPSC-CM induces angiogenesis stimulation of cells like embryonic muscle myoblast cells [17], NiH_3T_3 cells [33] or HUVEC [15, 16, 33] by promoting endothelial differentiation [15, 33] or tube-like network formation. [16, 33] This effect was reduced in presence of other sources of conditioned medium such as BMSC-CM or ASC-CM. [17, 33] This stimulation of angiogenesis was mainly related to the presence of angiogenic factors in the conditioned medium such as the chemokines Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) [20] and Chemokine CXC Motif Ligand 14 (CXCL14) [17], Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [20, 28], IL-8, Insulin Growth Factor (IGF), Endostatin [20], Matrix MetalloProteinase-3 (MMP-3), G-CSF and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). [28] Their levels in the DPSC-CM were increased compared to those at the cellular level. [20]

These *in vitro* results were confirmed *in vivo* by using ectopic subcutaneous root transplantation mice model (injection of conditioned medium in dental root). The promotion of neovascularization was greater in the group receiving DPSC-CM transplant than in those with BMSC-CM or ASC-CM transplants. [17] The CM angiogenic potential was enhanced when DPSC were cultured in presence of G-CSF, which is an adjuvant allowing cells mobilization. [16]

Those results show promising possibilities for the use of DPSC-CM in cardiovascular and ischemic diseases by promoting neovascularization and ischemia reduction.

3. Osteoarticular disorders.

Musculoskeletal and osteoarticular disorders affect a large proportion of the population and, currently, no effective therapy can be found. [51] Inflammatory pathologies of the articulations, such as arthritis, include only symptomatic treatment. It consists in the administration of anti-inflammatory drugs that induce many adverse effects. [42] In this

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

context, DPSC-CM and SHED-CM -that contain factors regulating the inflammatory environment- could be a tool to efficiently treat these diseases. [21, 29, 32, 33]

In vitro, SHED- and DPSC-CM promote a *phenotypic switch* in *macrophage* polarization favoring a M2 *anti-inflammatory* state. Indeed, in the SHED-CM treated cells, expression of M1 specific genes (such as TNFα, IL-1β, IL-6, iNOS, MMP-3, MMP-9) was downregulated whereas expression of M2 specific genes (notably arginase 1 and FIZZ1) was up regulated. These effects were decreased in presence of BMSC-CM. [30] DPSC-CM did not decrease the expression of IL-1β and TNFα but has increased IL-10 expression. [18] This highlights the capacity of SHED-CM and DPSC-CM to induce an anti-inflammatory environment.

These *in vitro* results were confirmed *in vivo* by the capacity of SHED-CM to reduce the clinical signs of inflammation such as oedema in a model of arthritis. [30] This effect was not observed after injection of BMSC-CM. [30] Pivoraite *et al.* have reported that exosomes from SHED-CM would be more efficient to reduce paw oedema in a model of articular acute inflammation than current anti-inflammatory treatments. The anti-inflammatory effect of SHED-derived exosomes was expressed at a later stage than usual anti-inflammatory treatment (prednisolone). [42] Reduction of clinical signs of inflammation was due to the efficient ability of SHED-CM to decrease the synovial inflammation by inhibiting the expression of genes implicated in osteoclast differentiation such as Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP), Cathepsin K, Receptor Activator of Nuclear factor Kappa (RANK), Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-Ligand (RANKL), Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATcl). It was associated with a prevention of bone and cartilage destruction. In the same manner, SHED-CM promotes the expression of osteoprotegerin, a protein involved in the inhibition of bone resorption. The combination of this protein with RANKL inhibits the fixation of RANKL on RANK receptor and then inhibits osteoclast differentiation. [30]

Taken together, these *in vitro* and *in vivo* results demonstrate that SHED-CM improves arthritis symptoms by inducing an anti- inflammatory environment and reducing tissue destruction by abrogation of RANKL expression and RANKL-induced osteoclastogenesis.

DPSC-CM could also be used in the regeneration of bone defects such as non-union. Indeed, DPSC-CM has a potential of osteogenic differentiation. DPSC-CM induces an *in vitro* stimulation of osteogenic differentiation of DPSC. [27, 52] Alkharobi *et al.* (2016) have

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

explored the growth factors contained in the CM derived from DPSC differentiated into osteoblast (OB)-like cells and detected the presence of two specific factors: Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP-2) and IGFBP-3. The IGFBP-2 level was increased following differentiation of DPSCs into OB-like cells, whereas IGFBP-3 level was reduced. This means that these two growth factors and then DPSC-CM are involved in the regulation of DPSC differentiation. The study of Ma *et al.* highlights the influence of cell age on DPSC-CM properties. They showed that osteogenic differentiation and mineralisation ability of juvenile DPSCs was improved in presence of adult DPSC-CM. [52] On the contrary, juvenile DPSC-CM decreased osteogenic differentiation and mineralisation capacity of adult DPSC. [53]

Interestingly, these results are promising by both the reduction of tissue destruction involved in osteoarticular disorders and by the induction of a new osteogenic tissue formation. It opens great perspectives for the treatment of musculoskeletal and articular disorders.

4. Neurological diseases.

Neurological diseases include various pathologies such as neurodegenerative diseases (Parkinson's disease [PD], Alzheimer's disease [AD]…), peripheral nerve injuries, and ischemic brain injuries. All these pathologies do not currently have an effective treatment. The capacity of DPSC-CM to induce neuroblastoma cell differentiation into neuronal cells and neuronal cell recruitment was described notably in a recent *in vitro* study. [54] The healing ability of dental cell-CM and notably DPSC-CM could be used to develop new therapies of brain regeneration.

DPSC-CM provided neuroprotective effects in an *in vitro* model of AD by suppressing apoptosis of neuroblastoma cells and improving cell viability. [37] The same effects were described by Mita *et al.* for SHED-CM on neuronal cells *in vitro,* and were also confirmed *in vivo*. [34] DPSC-CM has induced a significant increase in protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2, an anti-apoptotic protein) and a decrease of Bcl2 associated X, apoptosis regulator (Bax, a promoter of apoptosis) in neuroblastoma cells. Moreover, DPSC-CM appeared to contain neprilysin that has the ability to degrade the amyloid β peptide (Aβ), inductor of cytotoxicity and apoptosis. [37] DPSC-CM contains greater

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

concentrations of neuroprotective factors (GM-CSF, Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted [RANTES]), VEGF and anti-apoptotic factor (Fractalkine) compared to BMSC-CM or ASC-CM. [37] Mita *et al.* have shown that intranasal injection of SHED-CM in mouse model of AD has many positive effects: amelioration of the neurological dysfunction, suppression of Aβ-induced oxydative stress (inhibition of 3-Nitrotyrosine [3-NT] and iNOS), increase of the expression of neuroprotective trophic factors (Brain-derived neurotrophic factor [BDNF], Nerve growth factor [NGF], IGF). It also appeared that SHED-CM converts the inflamed environment of brain in an AD mouse model to an anti-inflammatory one by the suppression of the expression pro-inflammatory markers (IL-1β, TNF-α, iNOS) and upregulation of anti-inflammatory markers (Ym1, Arginase-1, FIZZ-1, IL-10) found in inflammatory zone. This work demonstrates that SHED-CM improves cognition in a mouse model of AD by attenuating the pro-inflammatory response and inducing an anti-inflamamtory neuronal environment. These results could offer new therapeutic strategies in neurodegenerative diseases such as AD. [34]

Moreover, SHED-CM could represent a therapeutic tool in the treatment of PD. Indeed, an *in vitro* study has highlighted the potential of SHED-CM to exerce neuroprotective effects. SHED-CM inhibits neuron apoptosis and enhances neurite outgrowth of neurons in an *in vitro* model of PD. [22] Jarmalaviciute *et al.* reproduced the same results using small EV derived from SHED-CM. [43] It was demonstrated that intravenously or intranasally administered small EV can reach the brain. [55, 56]

DPSC-CM provides a neuroprotective environment, which could offer a neuroprotective therapy in brain ischemia. Indeed, Song *et al.* showed that DPSC-CM has a cytoprotective effect in an *in vitro* model of hypoxic-ischemic brain damage. [23] This effect is expressed by the promotion of cell viability and protection against cell death. The use of BMSC-CM did not induce similar results. [23] This *in vitro* study was reproduced *in vivo* by using SHED-CM. [24, 31] Administration of SHED-CM in an *in vivo* model of hypoxic-ischemic brain damage induced a significant decrease of tissue loss and cell apoptosis, as well as an increase of cell density (neurons and endothelial cells). [24, 31] Indeed, expression of neuronal differentiation markers was detected in SHED-CM (Doublecortin [DCX], Neurofilament [NF], Neuronal nuclear protein [NeuN]). Moreover, DPSC-CM has antioxidant properties and anti-inflammatory effects by inhibiting Reactive Oxygen Species [ROS] production and

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

pro-inflammatory IL-1β expression in neuronal cells and stimulating anti-inflammatory IL-10 expression. [23] These results go along with a remarkable recovery of neurological function (behavioral tests), which suggests that SHED- and DPSC-CM improve the cerebral consequences of ischemic brain injury.

The neuroprotective role of DPSC- and SHED-CM was also described in an *in vitro* model of peripheral nerve injury. Both CM promote proliferation, migration and differentiation of Schwann cells. This stimulatory effect was also described for functional tests such as evaluation of angiogenesis and nerve extensions. [19, 57] Yamamoto *et al.* detected the presence of neuroprotective factors in DPSC-CM such as BDNF, IGF, NGF, as described by Mita *et al.* in SHED-CM in an *in vitro* model of AD [34], as well as angiogenic factors, such as VEGF in DPSC-CM, as described by Ahmed *et al.* in an *in vitro* AD model. [37] An *in vivo* model of peripheral nerve injury confirmed the *in vitro* results as well (nerve regeneration). [57] Neurotrophic factors were detected in SHED-CM, such as MCP-1 and secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 (sSiglec-9), which have anti-inflammatory effects by enhancing the expression of anti-inflammatory markers (IL-10, Arginine-1) and inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNFα, iNOS). SHED-CM would promote the functional recovery of the nerve injury through MCP-1/sSiglec-9 mediated signals. [57]

Similarly, Mead *et al.* showed in an *in vitro* model of a retinal nerve damage that DPSC-CM promotes neuroprotection and neuritogenesis as compared to BMSC-CM or ASC-CM. This induction was mediated by neuroprotective and proangiogenic factors. [58]

Taken together, these studies highlight that DPSC-CM contains higher levels of neuroprotective and proangiogenic factors than other CM such as BMSC-CM or ASC-CM. This results show that DPSC-CM would play a leading role in the tissue protection and regeneration in neurological diseases such as AD [34, 37], PD [22], hypoxic-ischemic brain injury [24], peripheral nerve injury. [19, 57, 58] Therefore, it is clear that both the SHED-CM and the DPSC-CM have the same neuronal regeneration capacity. [35]

5. Solid organ failures.

Solid organ (liver or lung) failure can lead to functional impotence or life threatening consequences from the same destruction mechanism, namely a reduction of functional

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

cells into the organ and a development of fibrosis instead of functional entities. This modification is associated with a loss of performance and an apparition of inflammation. It is important to develop therapies in which the suppression of the inflammation could be a key element in the treatment of these diseases.

In fact, DPSC-CM promotes hepatic cell proliferation as compared to BMSC-CM. [25] SHED-CM can remove chronic inflammation. The anti-inflammatory capacity of SHED-CM was previously described. [30, 42] This CM induces also the suppression of fibrotic markers such as α-Smooth Muscle Actin (α-SMA) and then reduces fibrosis by inducing switch of macrophage pro-inflammatory phenotype to anti-inflammatory phenotype. [29, 32] Expressions of pro-inflammatory cytokines (TNFα, IL-1β, iNOS) were suppressed as well. This transition promotes tissue regeneration. These positive effects were not observed with fibroblast-CM or BMSC-CM. This beneficial effect of dental pulp stem cells-derived CM could be due to the presence of a protein called Growth Arrest Specific protein 6 (GAS-6), which is implicated in hepatic regeneration and is present in DPSC-CM but not BMSC-CM. These *in vitro* results were confirmed *in vivo* by using mice liver fibrosis models. [29] The intravascular injection of SHED-CM allows the regeneration of the fibrotic area of liver [29] or lung [32] unlike the injection of BMSC-CM or fibroblast-CM.

These studies strongly suggest interesting effects of DPSC-CM and SHED-CM on solid organ fibrosis induced by a paracrine mechanism. This could be a tool in the treatment of many pathologies causing liver or lung failure.

6. Diabetes mellitus.

Diabetes is a metabolism disease characterized by a chronic hyperglycaemia resulting from an impaired insulin action or secretion by organism. It often leads to severe complications such as polyneuropathy, micro and macro angiopathy. Currently, the symptomatic treatments of these complications consist in surgical therapies. [18] It is necessary to develop a less-invasive alternative.

SHED-CM induces an amelioration of hyperglycemia in an *in vitro* diabetic model by enhancing the insulin secretion and reducing induced-cell death unlike BMSC-CM. [26] These results were also observed in an *in vivo* model of diabetic neuropathy. Intraperitoneal injection of SHED-CM, in this model, induced an improvement of

hyperglycaemia, a protection and a proliferation of pancreatic β-cells leading to an increase of insulin secretion. It suggests that CM-SHED has an effect on both the survival and the function of β-cells. Better effects were observed when using SHED-CM in comparison to BMSC-CM.

Those results are suggesting that SHED-CM and DPSC-CM contain neurotrophic, angiogenic and immunomodulatory factors that could help to reduce diabetic polyneuropathy and angiopathy.

Conclusions and future direction

Among the different tissue origins of MSC, dental pulp from permanent or exfoliated deciduous teeth is of particular interest and displays great advantages compared to other MSC sources. MSC isolated from this oral tissue are of embryonic origin and are neural crest-derived cells. [59] DPSC can differentiate into mesodermal but also into non-mesodermal tissue cells [60] (neurogenic cells, myogenic cells, keratocytes, hepatocytes, melanocytes) and demonstrate neurotropic characters. [61] For this reason, they have been intensively studied to exploit their therapeutic potential for neurodegenerative diseases. Studies have highlighted the potential of DPSC-derived nEV to treat neurodegenerative diseases. [43] This type of stem cells maintains their stemness properties even after long term passages. Indeed, the expressions of embryonic stem cell markers (like SKIL, MEIS1, and JARID2), reflection of the immunomodulatory properties of human DPSC, as well as cell proliferation markers, were shown to not be influenced by the total number of in vitro passages, contrary to BMSC. [62] Their easy acces contrasts with the invasive procedures to obtain BMSC. Also this tissue source did not induce morbidity at collection site. [63] One dental pulp tissue provides a great number of mesenchymal stem cells that show high proliferative capacities and high proliferation rate for self-renewal. [64] Compared to BMSC, DPSC show common expression profile and similar factors of regulation but displays an *in vitro* different proliferative ability, a development potential and an *in vivo* different development into distinct tissues depending on the microenvironment they are placed in. [65] Several gene expressions are promoted in DPSC compared to BMSC, mostly involved in cell signaling, cell communication or metabolism [59, 61, 65] probably a consequence of their

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

mixed embryonic origin. Finally, DPSC do not express a major histocompatibility complex class II antigen on their surface; these cells thus represent a major option in allogeneic graft due to their low immunogenicity and immunoregulatory properties. [60, 63]

There is increasing evidence that MSC-derived CM repeats regenerative induction ability of MSC. Therefore, dental pulp MSC-derived Conditioned medium (CM) has been of great interest in the past few years. The development of studies focusing on this type of CM confirmed their potential not only in dentistry but also in many other clinical areas. Indeed, CM shows useful basic abilities in tissue engineering as promotion of migration, proliferation and differentiation of many types of cells. It also helps to create a local microenvironment favorable to the tissue regeneration, notably of solid organs as liver, lung, or dental organ. It is able to induce a neovascularisation and a reduction of the apopotosis of endothelial cells and ischemia and consequently would be of great interest in thromboembolic diseases. Besides, it also presents anti-inflammatory and osteogenic properties that are promising for osteoarticular pathologies, and it has been demonstrated, *in vitro* and *in vivo*, that it contains many neuroprotectives factors, which could improve health conditions induced by neurological diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. Lastly, it proved its efficiency on endocrin diseases as diabetes mellitus by allowing a reduction of the death of cells secreting insulin (Table 1).

It was admitted that the composition and effects of conditioned medium varie with the cell origin. Interestingly dental pulp MSC-derived CM was compared in many studies with other CM, mostly with the current gold standard, the BMSC-CM. Many studies have highlighted the superiority of dental pulp MSC-derived CM in comparison with the other types of CM. These elements, together with the easy acces of dental pulp MSC in contrast to the invasive procedures to obtain BMSC, could set the dental pulp MSC-derived CM as the new standard in the infinite landscape of cell-free therapies and regenerative medicine.

Therefore, in order to anticipate future needs and similarly to the dental stem cell banking, the creation of banks of dental pulp stem cell derived conditioned medium could constitute an innovative approach in the development of personalized and regenerative medicine. However, such development is likely to take a long time.

Dental pulp stem cell derived CM represents a novel therapeutic strategy, which should be explored during clinical trials. Before this step, it is important to full characterize this promising tool for regenerative medicine and treatment of diseases.

Author's disclosure statement:

This article did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. No competing financial interests exist.

Acknowledgements:

We thank Dr Reine El Omar for the careful reading of the manuscript.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)

This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

References

1. El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.F., Menu, P., Velot, E., Decot, V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng Part B Rev **20**, 523, 2014.

2. Alge, D.L., Zhou, D., Adams, L.L., Wyss, B.K., Shadday, M.D., Woods, E.J. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. J Tissue Eng Regen Med **4**, 73, 2010.

3. Huang, G.T., 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 **88**, 792, 2009.

4. Vezzani, B., Pierantozzi, E., Sorrentino, V. Mesenchymal stem cells: from the perivascular environment to clinical applications. Histol Histopathol **11998**, 1, 2018.

5. Cristaldi, M., Mauceri, R., Tomasello, L., Pizzo, G., Pizzolanti, G., Giordano, C., Campisi, G. Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: a review of the curent literature and a look to the future. Regen Med **13**, 207, 2018.

6. Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., Bronckaers, A. Effects of isolation methodology on stem cells properties and multilineage differentiation of human dental pulp stem cells. Cell Tissue Res **353**, 65, 2013.

7. Hollands, P., Aboyeji, D., Orcharton, M. Dental pulp stem cells in regenerative medicine. Br Dent J, **224**, 747, 2018.

8. Matsubara, K., Matsushita, Y., Sakai, K., Kano, F., Kondo, M., Noda, M., Hashimoto, N., Imagama, S., Ishiguro, N., Suzumura, A., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. J Neurosci **35**, 2452, 2015.

9. La Noce, M., Paino, F., Spina, A., Naddeo, P., Montella, R., Desiderio, V., De Rosa, A., Papaccio, G., Tirino, V., Laino, L. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. J Dent **42**, 761, 2014.

10. Palmulli, R., Van Niel, G. To be or not to be...secreted as exosomes, a balance finely turned by the mechanisms of biogenesis. Essays Biochem **62**, 177, 2018.

11. Tkach, M., Kowal, J., Théry, C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 373, 2018.

12. Dostert, G., Mesure, B., Menu, P., Velot E. How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? Front Cell Dev Biol **5**, 2017.

13. Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Börger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F.A., Del Portillo, H.A., O'Driscoll, L., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Felderhoff-Mueser, U., Fraile, L., Gho, Y.S., Görgens, A., Gupta, R.C., Hendrix, A., Hermann, D.M., Hill, A.F., Hochberg, F., Horn, P.A., de Kleijn, D., Kordelas, L., Kramer, B.W., KrÄmer-Albers, E.M., Laner-Plamberger, S., Laitinen, S., Leonardi, T., Lorenowicz, M.J., Lim, S.K., Lötvall, J., Maguire, C.A., Marcilla, C.A., Marcilla, A., Nazarenko, I., Ochiya, T., Patel, T., Pedersen, S., Pocsfalvi, G., Pluchino, S., Quesenberry, P., Reischl, I.G., Rivera, F.J., Sanzenbacher, R., Schallmoser, K., slaper-Cortenbach, I., Stunk, D., Tonn, T., Vader, P., van Balkom, B.W., Wauben, M., Andaloussi, S.E., Théry, C., Rohde, E., Giebel, B. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. J Extracell Vesicles **31**, 30087, 2015.

14. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneifer, J., Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. Int J Mol Sci **18**, 1852, 2017.

15. Kawamura, R., Hayashi, Y., Murakami, H., Nakashima, M. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. Stem Cell Res Ther **7**, 77, 2016.

16. Murakami, M., Hayashi, Y., Iohara, K., Osako, Y., Hirose, Y., Nakashima, M. Trophic effects and regenerative potential of mobilized mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue as alternative cell sources for pulp/dentin regeneration. Cell Transplant **24**, 1753, 2015.

17. Hayashi, Y., Murakami, M., Kawamura, R., Ishizaka, R., Fukuta, O., Nakashima, M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. Stem Cell Res Ther **6**, 111, 2015.

18. Omi, M., Hata, M., Nakamura, N., Miyabe, M., Kobayashi, Y., Kamiya, H., Nakamura, J., Ozawa, S., Tanaka, Y., Takebe, J., Matsubara, T., Naruse, K. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. J Diabetes Investig **7**, 485,2016.

19. Yamamoto, T., Osako, Y., Ito, M., Murakami, M., Hayashi, Y., Horibe, H., Iohara, K., Takeuchi, N., Okui, N., Hirata, H., Nakayama, H., Kurita, K., Nakashima, M. Trophic effects of dental pulp stem cells on schwann cells in peripheral nerve regeneration. Cell Transplant **25**, 183, 2016.

20. Bronckaers, A., Hilkens, P., Fanton, Y., Struys, T., Gervois, P., Politis, C., Martens, W., Lambrichts, I. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. PLoS One **8**, 71104, 2013.

21. Yamaguchi, S., Shibata, R., Yamamoto, N., Nishikawa, M., Hibi, H., Tanigawa, T., Ueda, M., Murohara, T., Yamamoto, A. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. Sci Rep **5**, 16295, 2015.

22. Fujii, H., Matsubara, K., Sakai, K., Ito, M., Ohno, K., Ueda, M., Yamamoto, A. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. Brain Res **1613**, 59, 2015.

23. Song, M., Jue, S.S., Cho, Y.A., Kim, E.C. Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro. J Neurosci Res **93**, 973, 2015.

24. Inoue, T., Sugiyama, M., Hattori, H., Wakita, H., Wakabayashi, T., Ueda, M. Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. Tissue Eng Part A **19**, 24, 2013.

25. Kumar, A., Kumar, V., Rattan, V., Jha, V., Pal, A., Bhattacharyya, S. Molecular spectrum of secretome regulates the relative hepatogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow and dental tissue. Sci Rep **7**, 15015, 2017.

26. Izumoto-Akita, T., Tsunekawa, S., Yamamoto, A., Uenishi, E., Ishikawa, K., Ogata, H., Iida, A., Ikeniwa, M., Hosokawa, K., Niwa, Y., Maekawa, R., Yamauchi, Y., Seino, Y.,

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Hamada, Y., Hibi, H., Arima, H., Ueda, M., Oiso, Y. Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic β-cell function. BMJ Open Diabetes Res Care **3**, e000128, 2015.

27. Paschalidis, T., Bakopoulou, A., Papa, P., Leyhausen, G., Geurtsen, W., Koidis, P. Dental pulp stem cells' secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA-induced cytotoxicity. Dent Mater **30**, 405, 2014.

28. Iohara, K., Zheng, L., Wake, H., Ito, M., Nabekura, J., Wakita, H., Nakamura, H., Into, T., Matsushita, K., Nakashima, M. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells **16**, 2408, 2008.

29. Hirata, M., Ishigami, M., Matsushita, Y., Ito, T., Hattori, H., Hibi, H., Goto, H., Ueda, M., Yamamoto, A. Multifaceted therapeutic benefits of factors derived from dental pulp stem cells for mouse liver fibrosis. Stem Cells Transl Med **5**, 1416, 2016.

30. Ishikawa, J., Takahashi, N., Matsumoto, T., Yoshioka, Y., Yamamoto, N., Nishikawa, N., Hibi, H., Ishigro, N., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. Bones **83**, 210, 2016.

31. Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., Ueda, M. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. Stroke **44**, 551, 2012.

32. Wakayama, H., Hashimoto, N., Matsushita, Y., Matsubara, K., Yamamoto, N., Hasegawa, Y., Ueda, M., Yamamoto, A. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. Cytotherapy **17**, 1119, 2015.

33. Ishizaka, R., Hayashi, Y., Iohara, K., Sugiyama, M., Murakami, M., Yamamoto, T., Fukuta, O., Nakashima, M. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. Biomaterials **34**, 1888, 2013.

34. Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H., Ueda, M., Yamamoto, A. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res **293**, 189, 2015.

35. Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N.,

Ueda, M. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. J Clin Invest **122**, 80, 2012.

36. Tachida, Y., Sakurai, H., Okutsu, J., Suda, K., Sugita, R., Yaginuma, Y., Ogura, Y., Shimada, K., Isono, F., Kubota, K., Kobayashi, H. Proteomic comparison of the secreted factors of mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and dental pulp. J Protemoics Bioinform **8**, 12, 2015.

37. Ahmed, Nel-M., Murakami, M., Hirose, Y., Nakashima, M. Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cell Secretome for Alzheimer's disease Treatment: An in Vitro Study. Stem Cells Int **2016**, 1, 2016.

38. Schira J., Falkenberg, H., Hendricks, M., Waldera-Lupa, D.M., Kögler, G., Meyer, H.E., Müller H.W., Stühler, K. Characterization of regenerative phenoype of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from Human Umbilical Cord Blood (hUCB) by functional secretome analysis. Mol Cell Proteomics **14**, 2630, 2015.

39. Konala, V.B., Mamidi, M.K., Bhonde, R., Das, A.K., Pochampally, R., Pal, R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigme for cell-free regeneration. Cytotherapy **18**, 13, 2016.

40. Pawitan, J.A. Prospect of cell conditioned medium in regenerative medicine. Biomed Res Int **2014**, 965849, 2014.

41. Huang, C.C., Narayanan, R., Alapati, S., Ravindran, S. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. Biomaterials **111**, 103, 2016.

42. Pivoraitė, U., Jarmalavičiūtė, A., Tunaitis, V., Ramanauskaitė, G., Vaitkuvienė, A., Kašėta, V., Biziulevičienė, G., Venalis, A., Pivoriūnas, A. Exosomes from human dental pulp stem cells suppress carrageenan-induced acute inflammation in mice. Inflammation **38**, 1933, 2015.

43. Jarmalavičiūtė, A., Tunaitis, V., Pivoraitė, U., Venalis, A., Pivoriūnas, A. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. Cytotherapy **17**, 932, 2015.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

44. Peterson, P.E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol **31**, 23, 2003.

45. Nakayama, H., Iohara, K., Hayashi, Y., Okuwa, Y., Kurita, K., Nakashima, M. Enhanced regeneration potential of mobilized dental pulp stem cells from immature teeth. Oral Dis **23**, 620, 2017.

46. Joo, K.H., Song, J.S., Kim, S., Lee, H.S., Jeon, M., Kim, S.O., Lee, J.H. Cytokine expression of stem cells originating from the apical complex and coronal pulp of immature teeth. J Endod **44**, 87, 2018.

47. Mitsiadis, T.A., Feki, A., Papaccio, G., Caton, J. Dental pulp stem cells, niches, and Notch signaling in tooth injury. Adv Dent Res **23**, 275, 2011.

48. Mizuno, N., Shiba, H., Inui, T., Takeda, K., Kajiya, M., Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Kurihara, H. Effect of neurotrophin-4/5 on bone/cementum-related protein expressions and DNA synthesis in cultures of human periodontal ligament cells. J Periodontol **79**, 2182, 2008.

49. Sagomonyants, K., Mina, M. Biphasic effects of FGF2 on odontoblast differentiation involve changes in the BMP and Wnt signaling pathways. Connect Tissue Res **55**, 53, 2014.

50. Phinney, D.G., Pittenger, M.F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. Stem Cells **35**, 851, 2017.

51. Gause, A., Manger, B., Kalde, J.R., Burmester, G.R. Therapy of inflammatory rheumatic diseases: from current practice standards to future. Internist (Berl) **42**, 223, 2001.

52. Alkharobi, H., Alhodhodi, A., Hawsawi, Y., Alkafaji, H., Devine, D., El-Gendy, R., Beattie, J. IGFBP-2 and -3 co-ordinately regulate IGF1 induced matrix mineralisation of differentiating human dental pulp cells. Stem Cell Res **17**, 517, 2016.

53. Ma, D., Ma, Z., Zhang, X., Wang, W., Yang, Z., Zhang, M., Wu, G., Lu, W., Deng, Z., Jin, Y. Effect of Age and Extrinsic Microenvironment on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Rat Dental Pulp Stem Cells In Vitro. J Endod **35**, 1546, 2009.

54. Gervois, P., Wolfs, E., Dillen, Y., Hilkens, P., Ratajczak, J., Driesen, R.B., Vangansewinkel, T., Bronckaers, A., Brône, B., Struys, T., Lambrichts, I. Paracrine

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Maturation and Migration of SH-SY5Y Cells by Dental Pulp Stem Cells. J Dent Res **96**, 654, 2017.

55. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., Wood, M.J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat Biotechnol **29**, 341, 2011.

56. Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R.C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., Zhang, H.G.. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosomes encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. Mol Ther **19**, 1769, 2011.

57. Kano, F., Matsubara, K., Ueda, M., Hibi, H., Yamamoto, A. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 synergistically regenerate transected rat peripheral nerves by altering macrophage polarity. Stem Cells **35**, 641, 2017.

58. Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., Scheven, B.A. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. PLoS One **9**, e109305, 2014.

59. Stanko, P, Altanerova, U., Jakubechova, J., Repiska, V., Altaner, C. Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells and their exosomes. Stem Cells Int. **2018**, 8973613, 2018.

60. Anitua, E., Troya, M., Zalduendo, M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. Cytotherapy **20**, 479, 2018.

61. Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, 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. **158**, 373, 2014.

62. Diomede, F., Rajan, T.S., D'Aurora, M., Merciaro, I., Marchisio, M., Muttini, A., Capoti, S., Bramanti, P., Mazzon, E., Trubiani, O. Stemness maintenance properties in human oral stem cels after long-term passage. Stem Cells Int. **2017**, 5651287, 2017.

63. Ducret, M., Fabre, H., Degoul, O., Atzeni, G., McGuckin, C., Forraz, N., Mallein-Gerin, F., Perrier-Groult, E., Alliot-Licht, B., Farges, J.C. Immunophenotyping reveals the

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells *in vivo* and their evolution upon *in vitro* amplification. Frontiers In Physiology **7**, 512, 2016.

64. Harrington, J., Sloan, A.J., Waddington, J. Quantification of clonal heterogeneity of mesenchymal progenitor cells in dental pulp and bone marrow. Connective Tissue Research **55**, 62, 2014.

65. Huang, G.T.-J., 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 **88**, 792, 2009.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Contact information

E-mail: charlene.kichenbrand@univ-lorraine.fr

Tel: +33 3 72 74 65 81

Fax: +33 3 72 74 65 45

E-mail: emilie.velot@univ-lorraine.fr

Tel: +33 3 72 74 65 81

Fax: +33 3 72 74 65 45

E-mail: patrick.menu@univ-lorraine.fr

Tel: +33 3 72 74 65 87

Fax: +33 3 72 74 65 45

Corresponding author:

Vanessa Moby

E-mail: vanessa.moby@univ-lorraine.fr

Tel: +33 3 72 74 65 81

Fax: +33 3 72 74 65 45

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP20199, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France Cedex.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Table 1 *In vitro* and *in vivo* applications using dental pulp stem cell-derived conditioned medium and major contributing factors involved.

Reference number	Origine of CM	Model	Biological function	Contributing factors in CM
Reparation of dental tissues				
[45]	DPSC	*In vitro*	Promotion of fibroblast proliferation and migration, inhibition of fibroblast apoptosis	
[15]	DPSC	*In vitro*	Induction of odontoblastic differentiation of myoblasts in presence of EDTA, promotion of myoblast proliferation and migration	
[16]	DPSC	*In vitro*	Promotion of odontoblastic differentiation, proliferation and migration of DPSC	
[17]	DPSC	*In vivo* ectopic tooth transplantation model	Promotion of odontoblastic migration, proliferation and differentiation	
[41]	DPSC	*In vitro* *In vivo* root slice model	Promotion of odontoblastic differentiation of DPSC/BMSC Stimulation of odontoblastic differentiation	Exosomes

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Vascular diseases				
[28]	DPSC	*In vitro*	Promotion of macrovascular endothelial cell proliferation (HUVEC) Inhibition of HUVEC apoptosis	VEGF, MMP-3, GM-CSF, G-CSF
[20]	DPSC	*In vitro*	Promotion of microvascular endothelial cell migration, decrease of microvascular endothelial cell proliferation	MCP-1, VEGF, IL-8 IGF, Endostatin
[21]	SHED	*In vitro* *In vivo* model of myocardial ischemia	Promotion of endothelial cell migration, inhibition of myocyte apoptosis Suppression of acute inflammatory response of myocytes, reduction of infarct size, apoptosis and inflammation in the ischemic myocardium	
[45]	DPSC	*In vitro*	Inhibition of fibroblast apoptosis	
[33]	DPSC	*In vitro*	Immunomodulation of fibroblasts Stimulation of fibroblast angiogenesis, promotion of endothelial differentiation	

			and tube-like network formation	
[29]	SHED	*In vitro* model of liver fibrosis	Suppression of inflammmatory chronic response of macrophages	
[32]	SHED	*In vitro* model of lung fibrosis	Suppression of inflammmatory chronic response of macrophages	
[17]	DPSC	*In vitro* model of pulp disease *In vivo* model of pulp disease	Stimulation of myoblast angiogenesis Promotion of neovascularization	CXCL14
[15]	DPSC	*In vitro* model of pulp disease	Promotion of HUVEC angiogenesis, promotion of endothelial differentiation	VEGF
[16]	DPSC	*In vitro* model of pulp disease	Promotion of HUVEC angiogenesis Promotion of tube-like network formation	

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Osteoarticular disorders				
[30]	SHED	*In vitro* model of arthritis *In vivo* model of arthritis	Promotion of M2 anti inflammatory state Reduction of oedema	
[42]	SHED	*In vivo* model of articular acute inflammation	Reduction of oedema	
[27], [53]	DPSC	*In vitro*	Promotion of osteogenic differentiation of DPSC	
[52]	DPSC	*In vitro*	Promotion of osteogenic differentiation of DPSC Increase of mineralisation capacity of DPSC	
Neurological diseases				
[54]	DPSC	*In vitro*	Promotion of neuronal cell differentiation and recruitment	
[37]	DPSC	*In vitro* model of Alzheimer disease	Inhibition of neuroblastoma cells apoptosis Increase of cell viability	Neprilysin, GM-CSF,

				RANTES, VEGF, fractalkine
[34]	SHED	*In vitro* model of Alzheimer disease *In vivo* model of Alzheimer disease	Inhibition of neuroblastoma cells apoptosis Increase of cell viability Amelioration of neurological dysfunction, suppression of oxydative stress, Induction of antiinflamatory neuronal environment	BDNF, IGF, NGF Ym1, arginase 1
[22], [43]	SHED	*In vitro* model of Parkinson disease	Inhibition of neuron apoptosis, promotion of neurite outgrowth	
[23]	DPSC	*In vitro* model of hypoxic-ischemic brain damage	Cytoprotective effect: promotion of cell viability and inhibition of cell apoptosis, antiinflammatory effect	
[31]	SHED	*In vivo* model of hypoxic-ischemic brain damage	Cytoprotective effect: promotion of cell viability and inhibition of cell apoptosis Increase of cell density (neurons and endothelial cells) Decrease of tissue loss	Doublecortin, NF, NeuN

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

[24]	SHED	*In vivo* model of cerebral ischemia	Cytoprotective effect: promotion of cell viability and antiapoptosis effect Increase of cell density Decrease of tissue loss	Doublecortin, NF, NeuN
[57]	SHED	*In vitro* model of peripheral nerve injury *In vivo* model of peripheral nerve injury	Promotion of Schwann cell differentiation, proliferation and migration Promotion of nerve regeneration	MCP-1/sSiglec-9
[19]	DPSC	*In vitro* model of nerve section	Promotion of Schwann cell differentiation, proliferation and migration	BDNF, IGF, NGF
[58]	DPSC	*In vitro* model of retinal nerve damage	Neuroprotection, stimulation of neuritogenesis	VEGF, NGF, BNDF, VEGF
[35]	SHED DPSC	*In vitro and in vivo* model of spinal cord transection	Neural regeneration	

Solid organ failures				
[25]	DPSC	*In vitro*	Promotion of hepatic cell proliferation	
[29]	SHED	*In vitro* *In vivo* model of liver fibrosis model	Induction of anti-inflammatory phenotype Promotion of liver regeneration	GAS6
[32]	SHED	*In vitro* *In vivo* model of lung fibrosis	Induction of anti-inflammatory phenotype Promotion of lung regeneration	
Diabetes mellitus				
[26]	SHED	*In vitro* diabetic model *In vivo* model of diabetic neuropathy	Decrease of cell apoptosis Increase of insulin secretion Improvment of pancreatic β-cells survival, proliferation and function, amelioration of hyperglycemia	

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Abbreviations: 3-NT: 3-Nitrotyrosine, BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor, BMSC: Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells, BMP: Bone Morphogenetic Protein, CM : Conditioned medium, CXCL14: C-X-C Motif Chemokine Ligand 14, DPSC: Dental Pulp Stem Cells, DACC: Developping Apical Complex Cell, EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid , FLT-3: receptor-type tyrosine-protein kinase, GAS6: Growth Arrest-Specific 6, G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, IGF: Insulin-like Growth Factor, IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein, IL: Interleukin, iNOS: inductible Nitric Oxyde Synthase, MCP1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein-1, MMP: Matrix Metallo Proteinase, NeuN: Neuronal nuclear protein, NF: Neurofilament, NFATcl: Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic 1, NGF: Nerve Growth Factor, NGFR: Nerve Growth Factor Receptor, NT3: Neurotrophin 3, RANK: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa, RANL-L: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa Ligand, SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.
Tissue Engineering
l pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Downloaded by UNIV OF LIVERPOOL from www.liebertpub.com at 09/09/18. For personal use only.

Tissue Engineering
Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy (DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0168)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

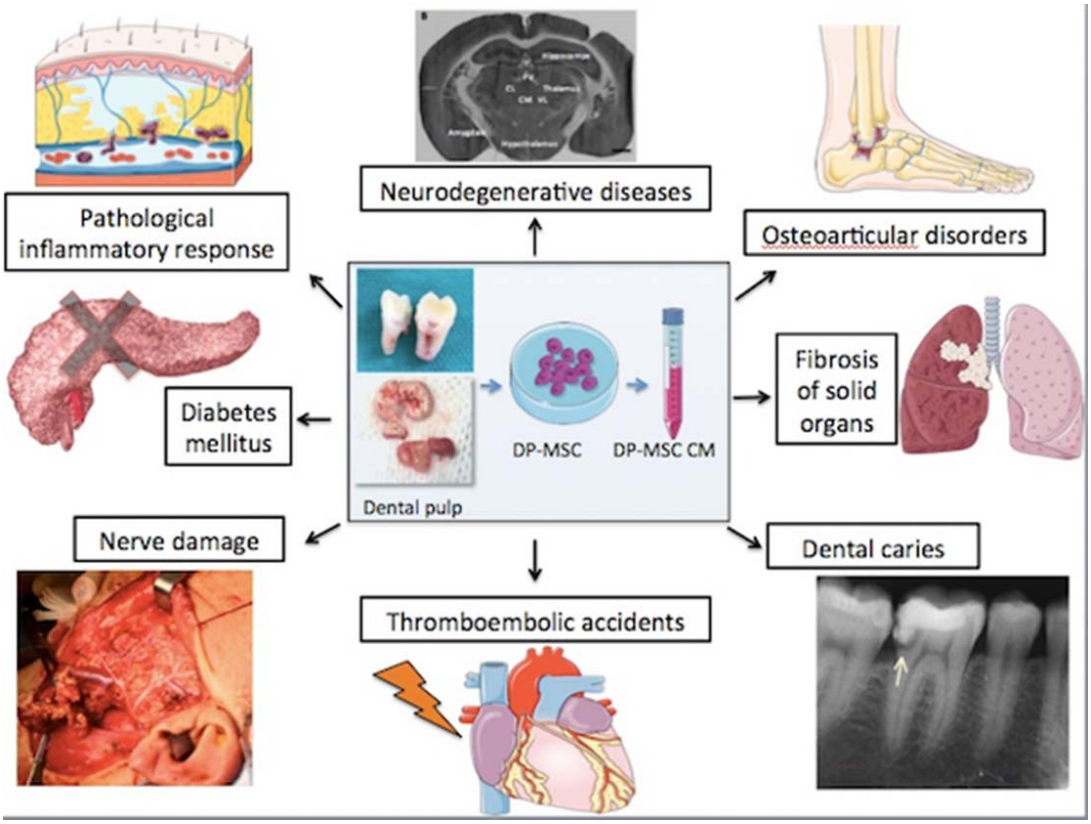


Figure 1: **Therapeutic and regenerative potential of conditioned medium derived from dental pulp mesenchymal stem cells**

DP-CM obtained from dental pulp can be used in different clinical applications: neurodegenerative diseases, osteoarticular damages, solid organ failures, dental diseases, thromboembolic pathologies, reparation of nerve damages, diabetus mellitus, or pathological inflammatory responses.

DP-MSC : Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells

DP-CM : Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells-derived Conditioned Medium

ANNEXE 2 :

Kichenbrand C, Grossin L, Menu P, Moby V.

Behavior of human dental pulp stem cell in high glucose condition: impact on proliferation and osteogenic differentiation.

Archives of Oral Biology, 2020, 1;118:104859

Archives of Oral Biology 118 (2020) 104859

Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Behaviour of human dental pulp stem cell in high glucose condition: impact on proliferation and osteogenic differentiation

Charlene Kichenbrand[a,b,c], Laurent Grossin[a], Patrick Menu[a,d], Vanessa Moby[a,b,c,*]

[a] Université de Lorraine, CNRS, UMR 7365, IMoPA, F-54000 Nancy, France
[b] CHRU Nancy, Service Odontologie, F-54000 Nancy, France
[c] Faculté d'Odontologie, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
[d] Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:
dental pulp stem cells
cell proliferation
osteogenic differentiation
glucose
bone tissue engineering

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate the changes of human dental pulp stem cell (hDPSC) viability, proliferation and osteogenic differentiation in high glucose condition.
Design: After 21 days of culture in low (5.5 mM) and high (20 mM) glucose medium, hDPSC viability and proliferation were assessed with respectively the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and Hoechst assays.

To investigate the influence of glucose on osteogenic differentiation hDPSCs were cultured for 28 days in low or high glucose medium with osteoinductive cocktail. Mineralization was examined by alizarin red staining/quantification and the expression of osteogenic-related genes [*Runt-related transcription factor 2* (*RUNX2), Osteocalcin (OCN), Collagen 1A1 (COL1A1)*] analyzed by RT-qPCR.
Results: We observed no significant difference ($p > 0.05$) on hDPSC proliferation or cell viability between low or high glucose groups. We did not highlight a significant difference after alizarin red staining and quantification between hDPSCs cultured with high or low glucose concentration in the culture medium. In the same manner, high glucose concentration did not appear to modify osteogenic gene expression: there was no significant difference in osteogenic-related gene expression between high or low glucose groups.
Conclusion: Proliferation, viability, and osteogenic differentiation of hDPSCs were not changed by high glucose environment.

1. Introduction

The main purpose in tissue engineering is to reconstruct native tissue by associating progenitor or mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) and a suitable scaffold. Some studies have shown that MSCs represent attractive cells for bone tissue engineering (Le Blanc and Pittenger (2005); Neuss et al., 2008; Zhang et al., 2009). MSCs can be obtained from different sources, but bone marrow MSCs (BM-MSCs) are widely considered as a gold standard (Polymeri, Giannobile, & Kaigler, 2016). BM-MSCs have been successfully used to repair critical-size bone defects *in vivo*, and their use is well-documented for years (Quarto et al., 2001; Wexler et al., 2003). However, BM-MSCs present some disadvantages (harvested by invasive and painful surgical procedure), and other sources of MSCs have been considered.

Among the wide family of MSCs of human origin such as adipose tissue-derived MSCs or umbilical cord-derived MSCs, dental pulp stem cells (DPSCs) are MSCs that originate from the cranial neural crest and reside within the perivascular niche of the dental pulp. DPSCs were first isolated and described in the early 2000s (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000) and represent a valuable non-invasive source of MSCs for tissue engineering or cell therapies (Kichenbrand, Velot, Menu, & Moby, 2019). Interestingly, they are easily accessible with

Abbreviations: AR, Alizarin red; BM, bone marrow; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, Dimethysulfoxide; DPSCs, dental pulp stem cells; FBS, fetal bovine serum; HG, high glucose; LG, low glucose; MSCs, mesenchymal stromal/stem cells; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, Phosphate Buffered Saline; PDLSCs, periodontal ligament stem cells; SCAPS, stem cells from the apical papilla; SHEDs, stem cells from human exfoliated deciduous teeth

* Corresponding author at: Université de Lorraine, CNRS, UMR 7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP20199, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54505, France.
E-mail addresses: charlene.kichenbrand@univ-lorraine.fr (C. Kichenbrand), laurent.grossin@univ-lorraine.fr (L. Grossin), patrick.menu@univ-lorraine.fr (P. Menu), vanessa.moby@univ-lorraine.fr (V. Moby).

https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104859
Received 18 February 2020; Received in revised form 16 July 2020; Accepted 26 July 2020
0003-9969/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

limited morbidity in the operation site and are often obtained from tooth extraction for orthodontic reasons. DPSCs have immune privilege and anti-inflammatory properties (Kichenbrand et al., 2019), display high growth rate (Alge et al., 2010), multilineage differentiation ability (Zhang, Walboomers, Shi, Fan, & Jansen, 2006) and so can regenerate various tissues. The osteogenic potential of DPSCs was described previously (Cha et al., 2015; Chamieh et al., 2016; Giuliani et al., 2013; Laino, Graziano et al., 2006; Ling et al., 2015; Wongsupa, Nuntanaranont, Kamolmattayakul, & Thuaksuban, 2017). DPSCs are capable of differentiating into osteoblasts *in vitro* after an induction by dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate supplementation (Cha et al., 2015; Laino, Carinci et al., 2006). They are able to form woven bone *in vitro* and *in vivo* by secreting abundant extracellular matrix (Laino, Carinci et al., 2006). This osteogenic potential of DPSCs has been demonstrated in rat models (Chamieh et al., 2016; Ling et al., 2015), rabbit models (Wongsupa et al., 2017) and in human studies to repair jaw defects (Giuliani et al., 2013). This osteogenic potential is therefore of major interest, notably in the field of oral and maxillofacial defect therapeutics.

Despite the considerable promise offered by MSCs to repair damaged bone tissue, bone constructs in human trials often present modest or short-lived benefits. The key to overcoming the limits after transplantation may lie in better understanding the influence of biochemical microenvironment and local factors such as hypoxia or glucose concentration. Glucose plays a major role in modifying cells proliferation and differentiation *in vitro* (Stolzing, Coleman, & Scutt, 2006; Weil, Abarbanell, Herrmann, Wang, & Meldrum, 2009). Pathological conditions such as diabetes mellitus are associated with hyperglycemic environment that impacts osteoblasts and bone formation (Kalaitzoglou, Popescu, Bunn, Fowlkes, & Thrailkill, 2016). Thus, diabetic patients are known to present an increased risk of delayed bone healing, that lead to major issues especially in the field of oral and maxillo-facial surgery (Jiao, Xiao, & Graves, 2015). Bone tissue engineering in those patients requires using MSCs that can overcome high glucose conditions in order to improve the benefits of bone constructs. Elucidating the impact of glucose concentration on cell culture is essential to enhance cell survival and differentiation potential. *In vitro*, MSCs can be amplified and differentiated toward different cell lineages for regenerative therapies by applying culture media of different composition, notably various glucose concentrations (Saki, Jalalifar, Soleimani, Hajizamani, & Rahim, 2013). The effects of glucose concentration have been investigated on several types of MSCs, including BM-MSCs (Elseberg et al., 2012; Li et al., 2007; Stolzing, Bauer, & Scutt, 2012; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2017), adipose-derived mesenchymal stem cells (Liang et al., 2012), periodontal ligament stem cells (PDLSCs) (Kato et al., 2016; Seubbuk, Sritanaudomchai, Kasetsuwan, & Surarit, 2017), tendon-derived stem cells (Lin et al., 2017), embryonic stem cells (Yang, Shen, Reece, Chen, & Yang, 2016) or stem cells from the apical papilla (SCAPs) (Wang, Wang, Lu, & Yu, 2019). To date, existing studies on the influence of glucose on MSC proliferation and differentiation exhibited quite puzzling results and did not provide a clear answer to the exact influence of glucose.

Furthermore, only one work focused on the impact of glucose on DPSC functioning (Kanafi, Ramesh, Gupta, & Bhonde, 2013), and its repercussion on DPSC osteogenic differentiation has not yet been clearly studied.

Therefore, in this work, we aimed to investigate the changes of DPSC proliferation, viability and osteogenic differentiation in high glucose environment. We chose two glucose concentrations that correspond to the routinely used culture medium (5.5 mM and 20 mM).

2. Materials and methods

2.1. Isolation and culture of human DPSCs (hDPSCs)

2.1.1. Isolation of hDPSCs

Impacted third molars were collected from healthy donors (aged 13–17 years) after receiving written informed consent from the patients and their parents, according to the amended Declaration of Helsinki and following a protocol approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CELSORDINO: ID-RCB: 2017-A00860-53). Only teeth between Nolla developmental stages 5 (crown almost completed) and 7 (one third root completed) were collected. The explant method was used to isolate hDPSCs as described previously (Ducret et al., 2015; Hilkens et al., 2013). Briefly, dental pulps were gently extirpated from teeth and cut into small fragments. Explants were placed into 6-well plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

2.1.2. Culture of hDPSCs

DPSCs migrated from the pulp explants were amplified (5×10^3 cells/cm^2) in the same medium and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C with a medium changes two times a week. They were either frozen after two passages or used to confirm the MSC phenotype by flow cytometry. Cells were negative for the hematopoietic surface markers CD34, CD45 and positive for CD73, CD 90 and CD105 (data not shown). Cells isolated from three different donors were used.

2.2. Assessment of cell proliferation

Post-thaw P3-DPSCs were plated in 6-well plates at conventional seeding density (5×10^3 cells/cm^2) and cultured for 21 days, in a humidified atmosphere of 5% CO2 at 37 °C, shared in two groups: 1) low glucose DMEM (LG-DMEM) with a glucose concentration of 5.5 mM; 2) high glucose DMEM (HG-DMEM) with a glucose concentration of 20 mM. Media were purchased from Gibco and supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin B (Sigma-Aldrich). The medium was changed every 3–4 days.

Cell proliferation was evaluated by measuring DNA concentration. This last was assessed using Hoechst 33342 fluorescent stain at days 1, 3, 7, 14 and 21. Cell amounts were determined by a fluorometric quantification of DNA using Hoechst assay. Cells were trypsinized (TypLE®, Gibco), centrifuged at 300*g* during 10 min and diluted in Hoechst buffer, followed by three cycles of freezing (−80 °C) and thawing (37 °C). After cell lysis, Hoechst 33342 fluorescent dye (0.1 µg/ml, Sigma-Aldrich, USA) was added. Sample supernatant (200 µl) was taken off, and the fluorescence was measured at a wavelength of 350–461 nm with a Varioskan™ LUX multimode microplate reader. A DNA standard curve was realized to determinate the DNA concentration in the samples. The DNA absorbances were used to normalize the cell viability.

2.3. Evaluation of cell viability

Cell viability was evaluated by analyzing the mitochondrial activities of the hDPSCs. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to quantitatively assess the number of viable hDPSCs grown in the two culture conditions (LG-DMEM and HG-DMEM). Post-thaw P3-hDPSCs were seeded in 96-well plates at conventional seeding density (5×10^3 cells/cm^2) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C and were cultured for 1, 3, 7, 14 and 21 days. The medium was changed every 3–4 days. The MTT solution was prepared by dissolving MTT in phosphate buffered saline (PBS), after which it was filtered and sterilized. After the predetermined time intervals (1, 3, 7, 14 or 21 days), cells were incubated with 5 mg/

ml MTT (Sigma) for 4 hours at 37 °C. The MTT solution was discarded and the blue formazan crystals formed, representative of cell viability, were solubilized from the cells by incubation with dimethylsulfoxide (DMSO) for 5 minutes at 37 °C. Aliquots of the resulting solutions were transferred to new plates. The absorbance was measured at 540 nm using a Varioskan™ LUX multimode microplate reader. The MTT absorbance normalized by Hoechst absorbance was calculated for each sample.

2.4. Osteogenic differentiation of hDPSCs

To evaluate the effect of glucose concentration on osteoblast differentiation, hDPSCs were incubated in HG or LG osteogenic culture medium (DMEM supplemented with 10% FBS, pyruvate, penicillin/streptomycin, amphotericin B and osteogenic cocktail dexamethasone (100 nM), ascorbic acid (50 µM), β-glycerophosphate (10 mM)). hDPSCs at passage 3 were cultured for 28 days in 24-well plates at conventional seeding density (5×10^3 cells/cm^2) and in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. The medium was changed every 3–4 days. We used as negative control DMEM without osteogenic differentiation cocktail.

2.4.1. Alizarin red staining

The formation of calcium nodules in osteogenic differentiated hDPSCs was assessed using alizarin red (AR) staining, according to Stanford (Stanford, Jacobson, Eanes, Lembke, & Midura, 1995). After culture under osteogenic-inducing conditions for 28 days in 24-well plates, hDPSCs were washed three times with PBS (pH 7.4), fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, incubated with 2% AR solution (Sigma-Aldrich) and finally rinsed three times with PBS. The calcium nodules were visualized under conventional microscopy (10× magnification). To quantify the mineralization, we extracted calcified nodules at low pH and neutralized with ammonium hydroxide, as previously described (Gregory, Gunn, Peister, & Prockop, 2004). Briefly, cultures were destained with acetic acid (10%v/v) for 30 minutes at room temperature. The monolayer was scraped off, heated at 85 °C for 10 minutes, cooled with ice for 5 minutes and centrifuged at 20,000 g for 15 minutes. Resulted supernatant was removed, and pH adjusted (4.1-4.5) with ammonium hydroxide.

The absorbance values at 405 nm were detected using a microplate reader, and AR staining concentrations were calculated according to its standard curve. Three independent experiments were performed in triplicates. We used as negative control DMEM without osteogenic differentiation cocktail.

2.4.2. RNA isolation and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

To analyze osteogenic-related gene expression, total RNA was isolated at day 28 by adding Quiazol reagent (QIAzol®Lysis Reagent, Qiagen) and extracted from cultured hDPSCs using Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). About 50 ng of total RNA were reverse transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) using the cDNA synthesis kit (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Biorad). The RT-qPCR was performed by using iTaq™ Universal SYBER® Green Supermix (Biorad) and system StepOne Plus Apparatus (Real Time PCR System, Applied Biosystem, USA) to compare the expression of Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*), osteocalcin (*OCN*) and collagen 1A1 (*COL1A1*) genes (Table 1) between cells cultured with different glucose concentrations.

Gene expression levels were obtained from cells of three different patients, cultured in triplicate. Gene expression levels were calculated by the comparative delta CT method ($2^{-\Delta ct}$ formula) after being normalized to the CT value of the ribosomal protein housekeeping gene (*RP29*).

Table 1
Primers used for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction analysis.

Genes	Primers	Sequences (5'-3')
RUNX2	Forward	CCCGTGGCCTTCAAGGT
	Reverse	CGTTACCCGCCATGACAGTA
OCN	Forward	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT
	Reverse	TCAGCCAACTCGTCACAGTC
COL1A1	Forward	AGGTGCTGATGGCTCTCCT
	Reverse	GGACCACTTTCACCCTTGT
RP29	Forward	AGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG
	Reverse	AGACACGACAAGAGCGAGAA

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error or medians (alizarin red assay). Each experimentation has been made in triplicate and was repeated independently three times ($n = 3$). Differences between groups were analyzed on ranks using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis (alizarin red assay) nonparametric tests (GraphPad Prism software (GraphPad Inc, CA, USA)). *P* values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of high glucose concentration on cell proliferation and viability

In Fig. 1A, results of Hoechst assay exhibited the influence of glucose concentration on hDPSC proliferation. DPSCs presented an increase in DNA quantity until 7 days and a decrease after. At 7 days, hDPSCs cultured with LG medium seemed to show higher DNA quantities (3.49 UI *vs* 2.31 UI) compared to those cultured in HG medium, but this difference was not significant ($p = 0.70$). Then, there was no significant difference ($p > 0.05$) after Hoechst assay between hDPSCs cultured in HG medium or LG medium.

MTT assay highlighted a progressive increase of cell metabolic activity until 21 days of culture (Fig. 1B). Whatever the glucose concentration, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in cell metabolic activity, whatever the kinetics point.

3.2. Osteogenic differentiation under different glucose concentrations

The osteogenic ability of hDPSCs was evaluated by the detection of mineralized bone nodules and expression of genes involved in bone development (*COL1A1*, *RUNX2*) and mineralization (*OCN*).

3.2.1. Alizarin red staining

After 28 days of culture, AR staining depicted the presence of precipitated calcium in hDPSCs cultured with osteogenic differentiation medium (Fig. 2A). Staining and then mineralization seemed visually more intense with HG medium than LG medium.

Mineralization quantitative assay highlighted that the increase of glucose concentration did not induce greater formation of precipitated calcium ($p = 0.40$) (Fig. 2B).

3.2.2. Expression of osteogenic-related genes

To investigate the influence of glucose concentration on hDPSC differentiation, we evaluated the modifications of gene expression of *RUNX2* (early osteogenic marker), *OCN* (late osteogenic marker) and *COL1A1* at day 28 in HG group and LG group. No significative differences (*RUNX2*, $p = 0.10$; *OCN*, $p = 0.33$; *COL1A1*, $p = 0.99$) were observed in gene expression of these three genes between the two groups (Fig. 3).

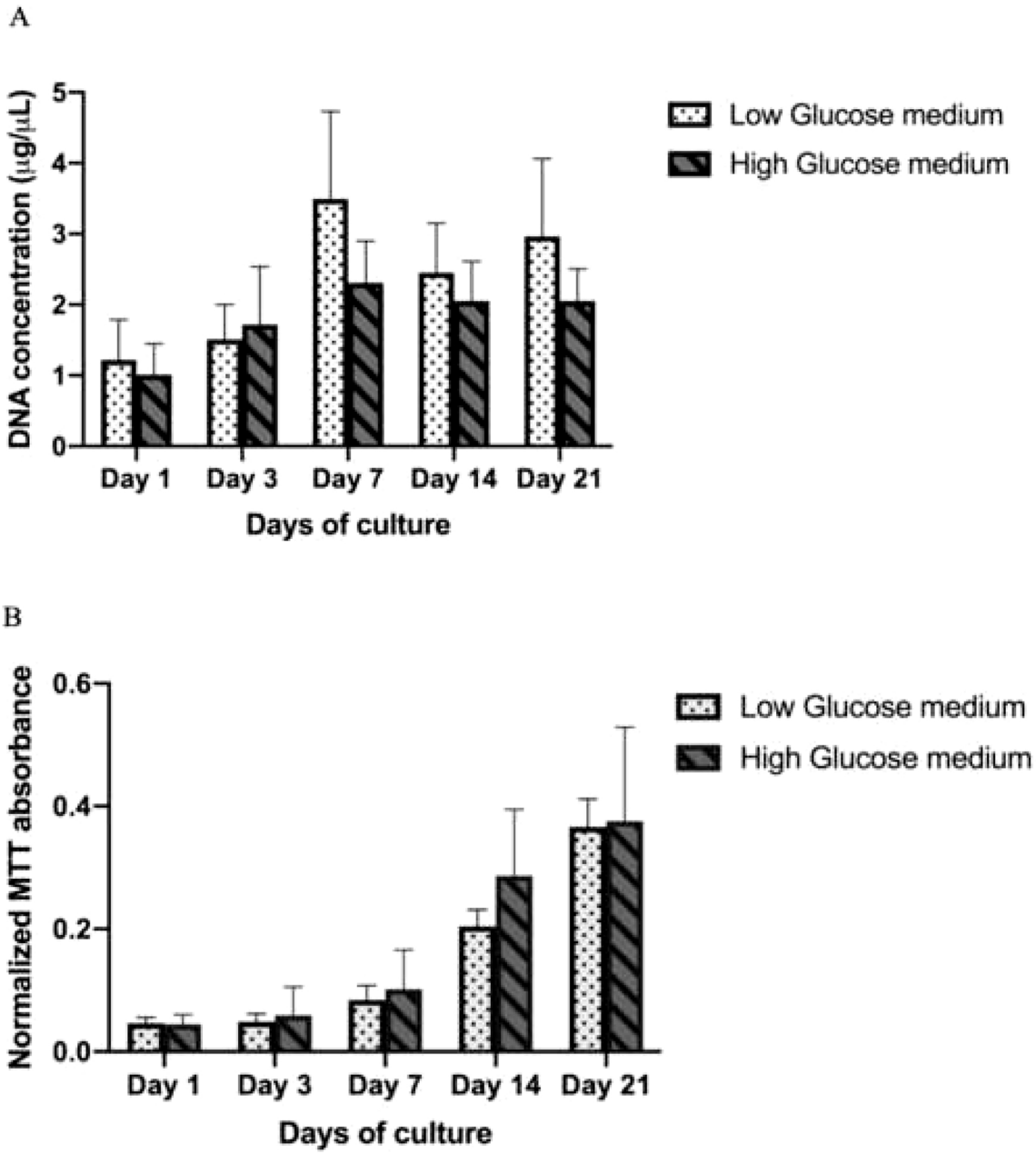


Fig. 1. Effect of different concentrations of glucose (low (5.5 mM) or high (20 mM) glucose concentration) on hDPSC proliferation and metabolic activity. DPSCs were cultured for 21 days. A. hDPSC DNA quantification (µg/µL), B. Measurement of MTT absorbance at 540 nm and normalized by DNA absorbance. Results are mean ± SE (n = 3).

4. Discussion

Human mesenchymal stem cells play a major role in regenerative medicine and offer great promise in the field of bone tissue engineering. Among MSCs, DPSCs represent an interesting therapeutic option for mineralized tissue regeneration, and there has been a growing interest in their use over the last years (Batouli et al., 2003; Gronthos et al., 2002). Indeed, DPSCs are easily accessible and can differentiate into multiple lineages including osteoblasts (Cristaldi et al., 2018). It also has been demonstrated that DPSC potential in terms of proliferation and ability to induce mineralization is greater than BM-MSC potential (Alge et al., 2010). There is an imperative need for further research on DPSCs to better understand their cell function in order to improve their *in vivo* therapeutic use. A better understanding and modulation of some factors of DPSC local microenvironment such as glucose concentration could ameliorate cell proliferation and differentiation (Salazar-Noratto et al., 2020). Glucose concentration is a parameter that can easily be adjusted *in vitro* via the culture medium. Improving cell function and survival depending on glucose concentration seems particularly relevant, given the involvement of hyperglycemia in many pathologies, in which stem cell therapies could be helpful. In our study, we aimed to compare two glucose concentrations (5.5 mM and 20 mM) in terms of influence on DPSC proliferation, viability, and differentiation. We chose to focus on these glucose concentrations because they correspond to the routinely used culture medium. We chose one glucose concentration that corresponds to normal condition (5.5 mM) and one considered as high (20 mM), both in reference to *in vivo* serum glucose concentration and *in vitro* glucose concentration of cell culture medium. In fact, 5.5 mM glucose concentration is usually considered as normal glucose serum condition and corresponds to LG culture medium *in vitro*. Glucose concentration of 20 mM is considered *in vitro* as HG culture medium and is compared to hyperglycemic environment that can be found *in vivo*

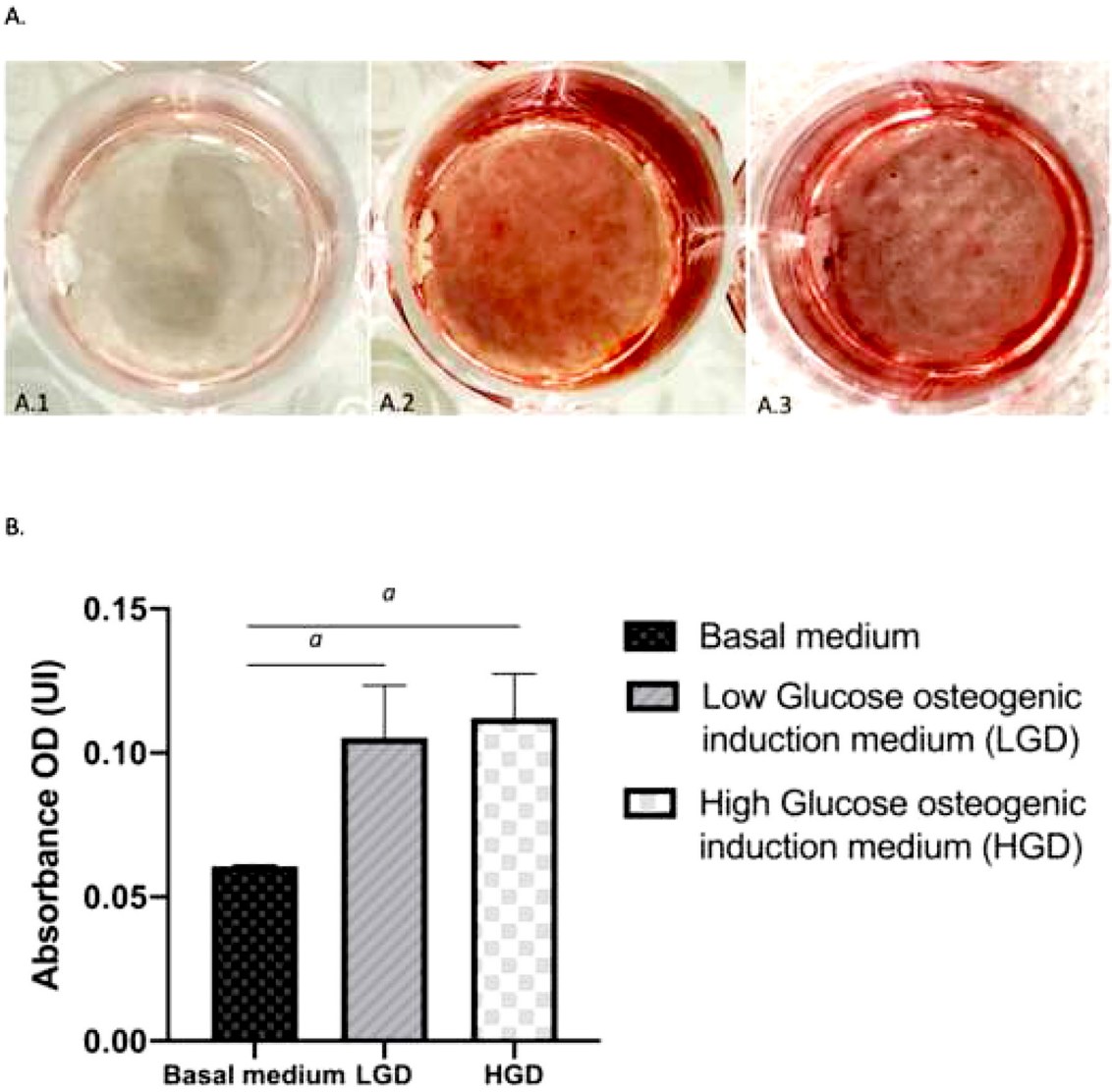


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the formation of mineralized bone nodules. A. Alizarin red staining of hDPSC cultured for 28 days in basal medium (A.1.), low glucose (LG, 5.5 mM) osteogenic induction medium (A.2.) and high glucose (HG, 20 mM) osteogenic induction medium (A.3.). B. Quantification of alizarin red staining for hDPSC cultured for 28 days in LG- or HG-medium supplemented (LGD and HGD) or not (control, basal medium) with osteogenic factors, *a:* $p < 0.05$ versus basal medium. Results are medians (n = 3).
(colors are necessary in print)

notably in diabetic patients (Kato et al., 2016). In the literature, several studies have investigated the influence of glucose on MSCs, but their results are divergent or inconsistent (Kanafi et al., 2013; Kato et al., 2016; Li et al., 2007; Lin et al., 2017; Seubbuk et al., 2017; Stolzing et al., 2006, 2012; Wang et al., 2013; Wang et al., 2019; Weil et al., 2009; Yamawaki, Taguchi, Komasa, Tanaka, & Umeda, 2017; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017). To our knowledge, among those studies, only one work is available on DPSCs (Kanafi et al., 2013).

The present work first studied the influence of glucose in hDPSC proliferation and viability. We found no significant differences in terms of viability between hDPSCs cultured with LG medium and hDPSCs cultured with HG medium for 21 days. The proliferation rate was also similar between the two groups ($p > 0.05$). It seems to demonstrate that HG concentration in cell culture medium did not increase or had deleterious effect on the hDPSC proliferation and viability. Those results are consistent with a previous study on DPSCs that showed no significant difference at day 8 in terms of proliferation rate and cell viability depending on glucose concentration (Kanafi et al., 2013). In our work, proliferation rate has been measured until day 21, but glucose effects seemed to be the same both on short- and long-term exposure. Similar results were obtained with BM-MSCs (Weil et al., 2009) in a work on glucose short-term exposure (2 days) with no significant difference depending on glucose concentration. Other studies on HG effects performed on other dental sources of MSCs displayed various results. Depending on studies, HG inhibited (Kato et al., 2016; Wang et al., 2019) or promoted (Salazar-Noratto et al., 2020; Seubbuk et al., 2017) proliferation of SCAPs (Wang et al., 2019), PDLSCs (Kato et al., 2016; Seubbuk et al., 2017) or stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) (Kanafi et al., 2013). The same contradictory results were observed concerning BM-MSCs with either boosting (Deschepper et al., 2013; Elseberg et al., 2012; Kim, Heo, & Han, 2006; Li et al., 2007; Wang et al., 2013) or suppressing (Keats & Khan, 2012; Stolzing et al., 2012; Zhang et al., 2017) effect of HG on cell proliferation. These different outcomes could be explained by several factors such as the variation in delay between the cell seeding and the achievement of the proliferation assay (from 4 days to 4 weeks depending on studies (Deschepper et al., 2013; Elseberg et al., 2012; Kanafi et al., 2013; Kato et al., 2016; Kim et al., 2006; Keats & Khan, 2012; Li et al., 2007; Stolzing et al., 2012; Seubbuk et al., 2017; Wang et al., 2013; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2017), variation of cell

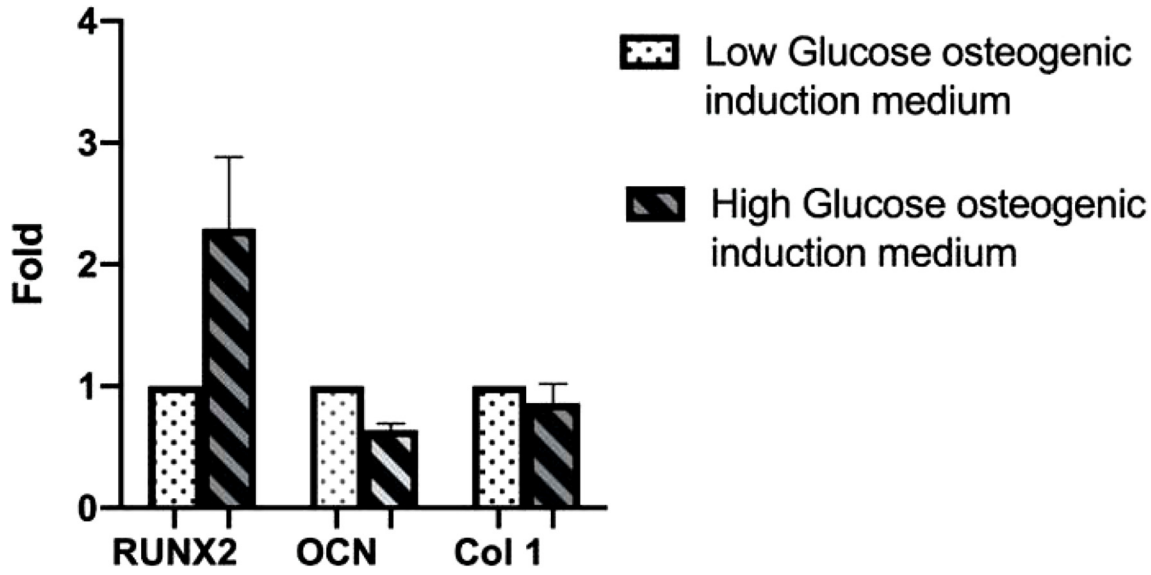


Fig. 3. Effect of glucose concentration on osteogenic gene expression in hDPSC. The expression of *RUNX2, OCN* and *COL1A1* genes in hDPSC was measured using real-time PCR. There was no significative difference ($p > 0.05$) at day 28 between low glucose (5.5 mM) *vs* high glucose (20 mM) groups in *RUNX2, OCN*, and *COL1A1* expression in DPSCs. Results are mean ± SE (n = 3).

seeding densities, the individual donors' variable trends (Li et al., 2007) or the differences between types of stem cells.

The second part of our work focused on the effects of glucose concentration on osteogenic differentiation and mineralization of human DPSCs. Studies demonstrated that hDPSCs can differentiate into osteoblast lineage in the presence of osteoinductive agents (Papaccio et al., 2006). The osteogenic differentiation of stem cells is regulated by specific molecules and factors of the microenvironment. Among these, the role of glucose on osteogenesis was mainly studied on BM-MSCs, and the results in the literature are confusing. Therefore, some studies have shown that HG culture medium enhanced the osteogenic differentiation of BM-MSCs (Li et al., 2007; Yamawaki et al., 2017), PDLSCs (Seubbuk et al., 2017) or SCAPs (Wang et al., 2019). In contrast, some other studies demonstrated that HG concentration suppressed or reduced BM-MSC (Stolzing et al., 2012; Wang et al., 2013) or PDLSC (Kato et al., 2016) osteoblastic differentiation. To our knowledge, no study compared the effects of LG and HG medium on osteogenic differentiation of DPSCs. One study obtained similar osteogenic differentiation of SHEDs or DPSCs in presence of hypoxia or HG (qualitative Von Kossa staining) (Kanafi et al., 2013). However, the osteogenic differentiation potential of DPSCs was not compared between HG and LG.

In our work, the mineralization assay by alizarin red staining on DPSCs after 28 days of culture showed no significant difference ($p > 0.05$) between cells cultured with HG osteoinductive medium (20 mM) or LG osteoinductive medium (5.5 mM). We obtained for both groups mineralized nodules, and even if the staining visually seemed stronger with the HG medium, the quantitative assay did not indicate significant difference ($p > 0.05$) between the two groups.

Then, we reviewed how glucose concentration could influence the expression of several osteoblastic-related genes: *RUNX2*, *OCN* and *COL1A1*. *RUNX2* is a transcription factor which is essential in the early stages of DPSC osteogenic differentiation (Yu et al., 2007). *OCN* is a later-stage marker of mineralized bones (Bai et al., 2010). *COL1A1* is a gene whose expression is closely correlated with the osteoblast proliferation stage (Nakashima & de Crombrugghe, 2003). Our results showed no significative difference ($p > 0.05$) between osteoblastic-related gene expression for hDPSCs induced with LG osteogenic medium and induced with HG osteogenic medium after 28 days of differentiation. These results confirmed previous results obtained with mineralization assay. Then, HG concentration appears to have no boosting or suppressive effect on hDPSC osteogenic-related gene expression.

To conclude, our work has not established evidence of neither boosting nor deleterious impact of high glucose on hDPSC behavior. hDPSCs cultured in HG medium did not exhibit a higher proliferation rate, viability or osteogenic differentiation compared with those cultured with LG medium. Despite the lack of numerous studies in the existing literature about the effects of glucose concentration on DPSCs, especially about DPSC osteogenic differentiation, we can formulate the following assumptions. First, the different type of stem cells used in the experiments could explain the different results. Secondly, cells were exposed to osteoinductive medium for different culture times. Thus, in our work, stem cells were cultured for 28 days in presence of osteoinductive media *vs*. 7 (Kanafi et al., 2013), 14 (Stolzing et al., 2012) or 21 days in other studies (Kato et al., 2016; Wang et al., 2013). Finally, Li et al. (2007) have performed only qualitative alizarin red staining after 28 days of BM-MSC culture with HG or LG osteoinductive medium.

Further investigations are required for a better understanding of the molecular mechanisms of glucose on DPSCs. Nevertheless, this finding seems to highlight an interesting resistance of hDPSCs against high glucose concentration and could be promising in bone tissue engineering in pathological conditions such as diabetes mellitus.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

Charlene Kichenbrand: Investigation, Writing - original draft, Formal analysis, Visualization. **Laurent Grossin:** Investigation. **Patrick Menu:** Supervision. **Vanessa Moby:** Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing - review & editing, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by CHRU Nancy (Direction de la Recherche et de l'Innovation).

We thank Doctor Ndeye Coumba NDIAYE (Epidemiologist/ Biostatistician) for her guidance and validation in the statistical analysis of data.

References

Alge, D. L., Zhou, D., Adams, L. L., Wyss, B. K., Shadday, M. D., Woods, E. J., ... Goebel, W. S. (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 4*(1), 73–81. https://doi.org/10.1002/term.220.

Bai, Y., Bai, Y., Matsuzaka, K., Hashimoto, S., Kokubu, E., Wang, X., & Inoue, T. (2010). Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. *Cell and Tissue Research, 342*(2), 221–231. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1046-9.

Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., ... Shi, S. (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of Dental Research, 82*(12), 976–981. https://doi.org/10.1177/154405910308201208.

Cha, Y., Jeon, M., Lee, H. S., Kim, S., Kim, S. O., Lee, J. H., & Song, J. S. (2015). Effects of in vitro osteogenic induction on in vivo tissue regeneration by dental pulp and periodontal ligament stem cells. *Journal of Endodontics, 41*(9), 1462–1468. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.010.

Chamieh, F., Collignon, A. M., Coyac, B. R., Lesieur, J., Ribes, S., Sadoine, J., ... Rochefort, G. Y. (2016). Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific Reports, 6*, 38814. https://doi.org/10.1038/srep38814.

Cristaldi, M., Mauceri, R., Tomasello, L., Pizzo, G., Pizzolanti, G., Giordano, C., & Campisi, G. (2018). Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: a review of the current literature and a look to the future. *Regenerative Medicine, 13*, 207–218. https://doi.org/10.2217/rme-2017-0112.

Deschepper, M., Manassero, M., Oudina, K., Paquet, J., Monfoulet, L. E., Bensidhoum, M., ... Petite, H. (2013). Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells, 31*(3), 526–535. https://doi.org/10.1002/stem.1299.

Ducret, M., Fabre, H., Degoul, O., Atzeni, G., McGuckin, C., Forraz, N., ... Farges, J. C. (2015). Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Frontiers in Physiology, 6*, 213. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00213.

Elseberg, C. L., Leber, J., Salzig, D., Wallrapp, C., Kassem, M., Kraume, M., & Czermak, P. (2012). Microcarrier-based expansion process for hMSCs with high vitality and undifferentiated characteristics. *The International Journal of Artificial Organs, 35*(2), 93–107. https://doi.org/10.5301/ijao.5000077.

Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., ... Papaccio, G. (2013). Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine, 2*(4), 316–324. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0136.

Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with the cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry, 329*(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97*(25), 13625–13630. https://doi.org/10.1073/pnas.24030979.

Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., ... Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research, 81*(8), 531–535. https://doi.org/10.1177/154405910208100806.

Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., ... Bronckaers, A. (2013). Effects of isolation methodology on stem cells properties and multilineage differentiation potential in human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research, 353*(1), 65–78. https://doi.org/10.1007/s00441-013-1630-x.

Jiao, H., Xiao, E., & Graves, D. T. (2015). Diabetes and its effects on bone and fracture healing. *Current Osteoporosis Reports, 13*(5), 327–335. https://doi.org/10.1007/s11914-015-0286-8.

Kalaitzoglou, E., Popescu, I., Bunn, R. C., Fowlkes, J. L., & Thrailkill, K. M. (2016). Effects of type 1 diabetes on osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Current Osteoporosis Reports, 14*(6), 310–319. https://doi.org/10.10007/s11914-016-0329-9.

Kanafi, M. M., Ramesh, A., Gupta, P. K., & Bhonde, R. R. (2013). Influence of hypoxia, high glucose, and low serum on growth kinetics of mesenchymal stem cells from deciduous and permanent teeth. *Cells Tissues Organs, 198*(3), 198–208. https://doi.org/10.1159/000354901.

Kato, H., Taguchi, Y., Tominaga, K., Kimura, D., Yamawaki, I., Noguchi, ... Umeda, M. (2016). High glucose concentrations suppress the proliferation of human periodontal ligament stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Journal of Periodontology, 87*(4), 44–51. https://doi.org/10.1902/jop.2015.150474.

Keats, E., & Khan, Z. A. (2012). Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and mesenchymal cells to high levels of glucose. *PloS One, 7*(6), 38752. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038752.

Kichenbrand, C., Velot, E., Menu, P., & Moby, V. (2019). Dental Pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. *Tissue Engineering Part B: Reviews, 25*(1), 78–88. https://doi.org/10.1089/ten.teb2018.0168.

Kim, Y. H., Heo, J. S., & Han, H. J. (2006). High glucose increases cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways. *Journal of Cellular Physiology, 209*(1), 94–102. https://doi.org/10.1002/jcp.20706.

Laino, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Pirozzi, G., Lanza, V., Valiante, S., ... Papaccio, G. (2006). An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology, 206*(3), 693–701. https://doi.org/10.1002/jcp.20526.

Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., d'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., ... Papaccio, G. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *Journal of Craniofacial Surgery, 17*(3), 511–515. https://doi.org/10.1097/00001665-2006055000-00021.

Le Blanc, K., & Pittenger, M. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy, 7*(1), 36–45. https://doi.org/10.1080/14653240510018118.

Li, Y. M., Schilling, T., Benish, P., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., ... Ebert, R. (2007). Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochemichal and Biophysical Research Communications, 363*(1), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.161.

Liang, C., Li, H., Tao, Y., Zhou, X., Li, F., Chen, G., & Chen, Q. (2012). Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *Journal of Translational Medicine, 10*, 49. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-49.

Lin, Y. C., Li, Y. J., Rui, Y. F., Dai, G. C., Shi, L., Xu, H. L., ... Teng, G. J. (2017). The effects of high glucose on tendon-derived stem cells: implications of the pathogenesis of diabetic tendon disorders. *Oncotarget, 8*(11), 17518–17528. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15418.

Ling, L. E., Feng, L., Liu, H. C., Wang, D. S., Shi, Z. P., Wang, J. C., ... Lv, Y. (2015). The effects of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103*(5), 1732–1745. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35303.

Nakashima, K., & de Crombrugghe, B. (2003). Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics, 19*(8), 458–466. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00176-8.

Neuss, S., Stainforth, R., Salber, J., Schenck, P., Bovi, M., Knüchel, R., & Perez-Bouza, A. (2008). Long- term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold. *Cell Transplantation, 17*(8), 977–986. https://doi.org/10.3727/096368908786576462.

Papaccio, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Graziano, M. F., Pirozzi, G., Menditti, D., ... Laino, G. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *Journal of Cellular Physiology, 208*(2), 319–325. https://doi.org/10.1002/jcp.20667.

Polymeri, A., Giannobile, W. V., & Kaigler, D. (2016). Bone marrow stromal stem cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Hormone and Metabolic Research, 48*(11), 700–713. https://doi.org/10.1055/S-0042-118458.

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, ... Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine, 344*(5), 385–386. https://doi.org/10.1056/NEJM200102013440516.

Salazar-Noratto, G. E., Luo, G., Denoeud, C., Padrona, M., Moya, A., Bensidhoum, M., ... Petite, E. (2020). Concise Review: Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells, 38*(1), 22–33. https://doi.org/10.1002/stem.3079.

Saki, N., Jalalifar, M. A., Soleimani, M., Hajizamani, S., & Rahim, F. (2013). Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy. *International Journal of Hematology- Oncology Stem Cell Research, 7*(3), 34–40.

Seubbuk, S., Sritanaudomchai, H., Kasetsuwan, J., & Surarit, R. (2017). High glucose promotes the osteogenic differentiation capability of human periodontal ligament fibroblasts. *Molecular Medicine Reports, 15*(5), 2788–2794. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6333.

Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A., & Midura, R. J. (1995). Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *Journal of Biological Chemistry, 270*(16), 9420–9428. https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9420.

Stolzing, A., Coleman, N., & Scutt, A. (2006). Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Research, 9*(1), 31–35. https://doi.org/10.1089/rej.2006.9.31.

Stolzing, A., Bauer, E., & Scutt, A. (2012). Suspension cultures of bone marrow derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. *Stem Cells and Development, 21*(14), 2718–2723. https://doi.org/10.1089/scd.2011.0406.

Wang, J., Wang, B., Li, Y., Wang, D., Lingling, E., Bai, Y., & Liu, H. (2013). High glucose inhibits osteogenic differentiation through the BMP signaling pathway in bone mesenchymal stem cells in mice. *EXCLI Journal, 12*, 584–597. https://doi.org/10.17877/DE290R-7335.

Wang, Y., Wang, Y., Lu, Y., & Yu, J. (2019). High glucose enhances the odonto/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via NF-KappaB signaling pathway. *BioMed Research International, 2019*, Article 5068258. https://doi.org/10.1155/2019/5068258.

Weil, B. R., Abarbanell, A. M., Herrmann, J. L., Wang, Y., & Meldrum, D. R. (2009). High glucose concentration in cell culture does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 296*(6), R1735–R1743. https://doi.

org/10.1152/ajpregu.90876.2008.
Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology, 121*(2), 368–374. https://doi.org/10.1055/s-0042-118458.
Wongsupa, N., Nuntanaranont, T., Kamolmattayakul, S., & Thuaksuban, N. (2017). Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(e-caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. *Journal of Materials Science Materials in Medicine, 28*(5), 77. https://doi.org/10.1007/s10856-017-5883-x.
Yamawaki, I., Taguchi, Y., Komasa, S., Tanaka, A., & Umeda, M. (2017). Effects of glucose concentration on osteogenic differentiation of type II diabetes mellitus rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on a nano-scale modified titanium. *Journal of Periodontal Research, 52*(4), 761–771. https://doi.org/10.1111/jre.12446.
Yang, P., Shen, W. B., Reece, E. A., Chen, X., & Yang, P. (2016). High glucose suppressed embryonic stem cells differentiation into neural lineage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication, 472*(2), 306–312. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.117.
Yu, J., Wang, Y., Deng, Z., Tang, L., Li, Y., Shi, J., & Jin, Y. (2007). Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biology of the Cell, 99*(8), 465–474. https://doi.org/10.1042/BC20070013.
Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., & Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineering, 12*(10), 2813–2823. https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2813.
Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Schantz, J. T., Fisk, N. M., Choolani, M. A., & Chan, J. (2009). Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells, 27*(1), 126–137. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0456.
Zhang, D., Lu, H., Chen, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, S., ... Pan, J. (2017). High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling. *Molecular Medicine Reports, 16*(2), 1685–1690. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6832.

ANNEXE 3 :

Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V

Les substituts osseux en odontologie. Partie 1 - structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges

Biomatériaux cliniques, 2018, 3 : 2-7

BIOLOGIE ET BIOMATÉRIAUX

Actualisation en continu

LES SUBSTITUTS OSSEUX EN ODONTOLOGIE

Partie 1 - Structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges

THIBAULT CANCEILL
AHU, Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse

CHARLENE KICHENBRAND
AHU, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

SABINE JONIOT
MCU-PH, Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse

VANESSA MOBY
MCU-PH, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

Dans ce premier chapitre d'une série de deux, nous proposons une brève description de la structure du tissu osseux, avant d'aborder le cahier des charges du substitut osseux idéal. Dans le prochain article, nous détaillerons la classification des substituts osseux utilisés en clinique.

Le recours à une greffe autologue ou à des substituts osseux est fréquent en odontologie. La connaissance des propriétés de ces matériaux est essentielle pour obtenir leur intégration à l'os et comprendre les mécanismes qui régissent leur éventuel remplacement par un tissu osseux néoformé.

The use of an autologous bone or bone substitute materials is common in dentistry. Knowledge of the properties of these materials is essential to optimally control osseointegration and to understand the mechanisms that govern their eventual replacement with a new bone tissue.

Actualisation via l'url: http://bit.ly/2y8Nx2n ou le QR code

L'augmentation du volume osseux pour des raisons thérapeutiques (volume osseux pré-implantaire insuffisant, par exemple) ou pour le comblement de pertes osseuses après pathologies (parodontites, ostéonécroses, cancers et autres lésions osseuses), traumatismes (fractures) ou anomalies congénitales (fentes), nécessite le recours à une greffe autologue ou à des substituts osseux.

L'os autogène (l'individu donneur et l'individu receveur sont les mêmes) constitue la référence absolue, le « gold standard » [1-3]. Il est en effet immunocompatible et surtout ostéogénique. Cependant, cette thérapeutique n'est pas parfaite et présente des inconvénients tels qu'une morbidité postopératoire importante, la nécessité d'une procédure invasive supplémentaire (deuxième site), un problème de disponibilité (quantité limitée) et la présence d'une résorption difficile à anticiper [3]. Pour contrer ces inconvénients, des alternatives ont été recherchées, menant au développement des substituts osseux.

STRUCTURE DU TISSU OSSEUX

L'os est constitué de deux structures distinctes : l'os cortical à l'extérieur et l'os trabéculaire à l'intérieur *(fig. 1)*.

L'os cortical étant compact et dense, il possède une grande résistance mécanique, notamment à la déformation.

L'os trabéculaire doit son nom à la présence d'un grand nombre de trabécules ou travées. Ces travées délimitent un grand nombre d'espaces, ce qui confère une plus faible résistance mécanique à l'os trabéculaire. Elles contiennent la moelle osseuse qui est riche en cellules et en structures vasculaires. Sa structure peut être comparée à celle d'une éponge.

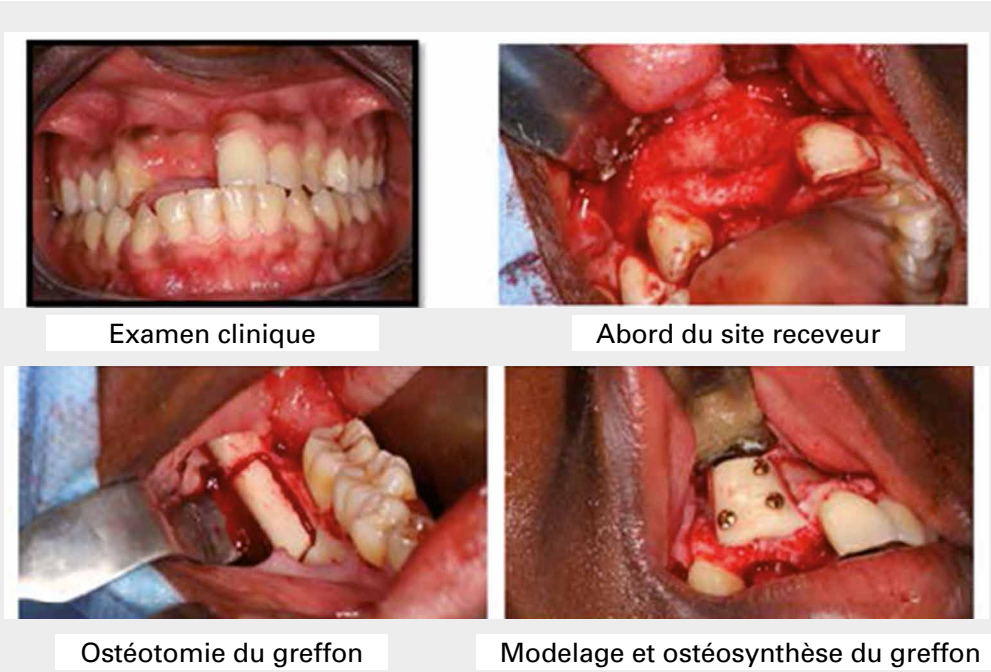
Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé d'origine mésenchymateuse, constitué de deux composantes indissociables : les cellules osseuses et la matrice osseuse [1-5]. Il subit deux phénomènes équilibrés tout au long de sa vie : le modelage et le remodelage. C'est l'homéostasie du tissu osseux.

C'est donc un tissu dynamique, en permanence soumis à deux processus opposés mais complémentaires : la formation osseuse et la résorption osseuse. Cela permet son renouvellement (permettant de pallier le vieillissement cellulaire), le contrôle de l'homéostasie phosphocalcique (libération des minéraux – calcium et phosphore – à la suite du processus de résorption) et la modification de l'architecture osseuse, par exemple en réponse à des contraintes mécaniques. Ces phénomènes sont régulés par trois types cellulaires : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Ces cellules osseuses sont présentes en proportions variables au niveau du tissu osseux : ostéocytes (90 %), ostéoblastes (10 %) et ostéoclastes (1 %). Les ostéoblastes sont des cellules situées à la surface de l'os. Ils synthétisent la trame collagénique et contrôlent le dépôt des minéraux sur cette trame. Ils régulent donc le processus de minéralisation. Ils participent aussi au maintien de l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse en régulant l'activité des ostéoclastes. Les ostéocytes sont des ostéoblastes qui ont été piégés dans la matrice qu'ils ont eux-mêmes élaborée. Ils participent également à l'homéostasie en régulant l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Les ostéoclastes sont les cellules osseuses assurant la résorption du tissu osseux. Leur activité est contrôlée par les ostéoblastes [6].

1. Photographie (x5) de la structure du tissu osseux l'os cortical (compact) apporte la résistance mécanique et l'os trabéculaire (travées et alvéoles) permet la colonisation par les cellules et les vaisseaux.

À cette composante cellulaire, on associe la matrice osseuse qui combine :

- une trame organique constituée principalement de protéines collagéniques (90 %), notamment de collagène 1, mais également de protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine…) et de facteurs de croissance ;



2. **Greffe osseuse autologue (cas du Dr Nasr Hasnaoui).**

- des minéraux (phosphore et calcium principalement) assemblés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ;
- des espaces non minéralisés contenant des vaisseaux sanguins [6].

Elle sert de support mécanique et joue également un rôle dans l'homéostasie osseuse en libérant des protéines intervenant dans le remodelage osseux [7].

La connaissance de cette structure fut le point de départ du développement des substituts osseux.

DÉFINITION DU SUBSTITUT OSSEUX

Un substitut osseux est un biomatériau d'origine naturelle ou synthétique utilisé pour le traitement de défauts osseux à la place d'une greffe osseuse autogène [4] *(fig. 2)*.

Dans les cas où la greffe autologue ne peut être envisagée, trois types de substituts peuvent être utilisés : d'origine humaine (allogreffe), d'origine animale (xénogreffe), d'origine synthétique (céramiques bioactives, matériaux composites, association de matrice cellularisée et de facteurs de croissance).

Il n'existe pas de définition officielle réglementaire des substituts osseux ayant fait l'objet d'un consensus international. La Société Française de Recherche en chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SoFROT) a proposé celle-ci [5] : « Peut être considéré comme un substitut osseux tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, destiné à l'implantation chez l'homme, dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux, qu'il s'agisse du renforcement d'une structure osseuse, du comblement d'une perte de substance, d'origine traumatique ou orthopédique, de la consolidation d'une fracture ou de son équivalent. »

La première utilisation clinique de substitut osseux date de 1892 : du sulfate de calcium avait été employé pour combler des défauts osseux [8].

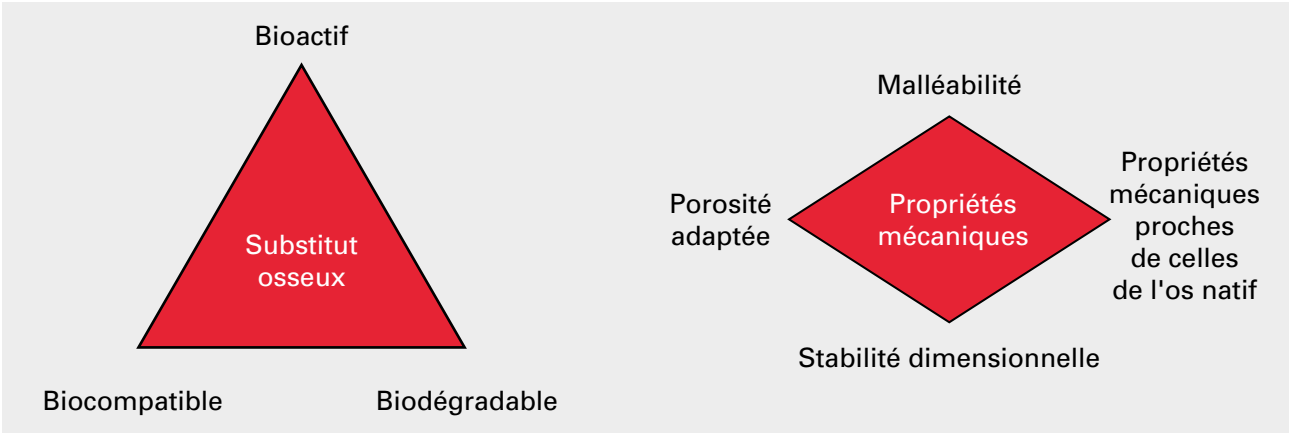
CAHIER DES CHARGES DU SUBSTITUT OSSEUX IDÉAL

Un substitut osseux doit posséder des caractéristiques biologiques et mécaniques précises.

Caractéristiques biologiques

Au niveau des propriétés biologiques, le substitut osseux idéal doit répondre à la règle des trois « B » : être biocompatible, bioactif et biodégradable *(fig. 3)*.

La biocompatibilité : elle est l'essence même de tout biomatériau. Elle regroupe l'absence de toxicité, mais également la présence d'interactions réciproques favorables



3. **La règle des trois « B » du substitut osseux idéal : biocompatible, bioactif et biodégradable**

4. **Caractéristiques mécaniques du substitut osseux idéal.**

entre le substitut osseux et l'organisme receveur, de façon à ce que l'un n'ait pas d'effets nocifs sur l'autre. Le substitut doit être non immunogène : absence de réaction d'hypersensibilité, voire d'allergie, absence de réponse inflammatoire dans l'organisme. Il ne doit pas non plus entraîner de contamination (transmission de virus, bactéries…) [9].

La bioactivité : elle est définie comme l'interaction directe des substituts osseux avec le milieu environnant, entraînant la formation de dépôts minéralisés. Cela implique trois notions : l'ostéoconduction, l'ostéoinduction et l'ostéogenèse *(voir encadré ci-contre)* [9]. Le substitut osseux, ou biomatériau de régénération osseuse, est donc un matériau de comblement servant de support physique (ostéoconducteur) sur lequel des cellules adhèrent, migrent, prolifèrent et se différencient (ostéoinduction) [10-13]. Le substitut osseux idéal comporterait l'ensemble des éléments (y compris les cellules) nécessaires à la formation osseuse et serait qualifié également de substitut ostéogénique.

La biodégradabilité : la substitution, correspondant au remplacement du biomatériau par de l'os nouvellement formé, implique la dégradation du substitut osseux implanté [14-16]. La biorésorption doit être progressive ; plus exactement la vitesse de biodégradation doit être adaptée au remplacement graduel par les cellules de l'hôte et à la formation d'un nouveau tissu osseux fonctionnel. En effet, en cas de résorption trop rapide du matériau, celui-ci n'assure plus son rôle de support de la formation osseuse et le volume néoformé risque d'être insuffisant. À l'inverse, s'il se dégrade trop lentement, la formation osseuse ne sera pas homogène sur le site et des fragments de substitut persisteront dans l'os néoformé. Dans certaines indications cliniques cependant, une faible résorption peut être souhaitée afin de maintenir, notamment, un volume compatible avec le projet prothétique. Les produits de dégradation seront métabolisés ou éliminés par voie rénale.

Caractéristiques mécaniques *(fig. 4)*

La porosité : les pores sont des espaces vides présents au sein d'un matériau. On distingue la macroporosité (pores > 100 µm de diamètre), la microporosité (pores < 5 µm de

Bioactivité des substituts osseux

Elle correspond à leur interaction avec l'environnement et met en jeu trois qualités essentielles du substitut osseux idéal (ostéoconducteur, ostéoinducteur, ostéogénique).

Ostéoconducteur : le substitut sert de support aux cellules (ostéoblastes, cellules souches), de trame pour la formation osseuse. Permet également l'invasion par les vaisseaux sanguins.

Ostéoinducteur : le substitut est capable de recruter localement des cellules indifférenciées (cellules souches) et de stimuler leur différenciation en ostéoblastes pour la synthèse d'une matrice osseuse.

Ostéogénique : le substitut contient tous les éléments y compris les cellules (ostéoblastes) nécessaires à la formation de l'os.

diamètre) et la mésoporosité pour les pores de diamètre intermédiaire. La macroporosité permet la pénétration des cellules et vaisseaux au sein du matériau, donc la colonisation du biomatériau. Ces pores sont les principaux responsables du caractère ostéoconducteur du substitut osseux. La macroporosité ne doit pas être trop importante, car elle s'accompagne d'une faible résistance mécanique. La microporosité permet la diffusion des molécules et des fluides biologiques dans le matériau et est donc responsable des échanges ioniques entre le biomatériau et le milieu environnant. Pour optimiser la circulation des cellules, des fluides et des molécules dans le matériau, les pores sont interconnectés [14, 17, 18].

Le taux de porosité au sein du biomatériau fait varier les propriétés mécaniques du substitut et influe sur sa vitesse de résorption. Plus la porosité est importante, plus la résorption est rapide.

La malléabilité : les substituts osseux doivent présenter des propriétés mécaniques permettant une utilisation la plus simple possible par le chirurgien. Ils doivent être disponibles sous différentes formes afin de s'adapter aux divers défauts osseux qu'il est possible de rencontrer [19].

La stabilité dimensionnelle : la stabilité, donc l'ancrage du substitut osseux, surtout lors des premières semaines suivant sa mise en place, sont des éléments primordiaux à prendre en compte pour espérer une bonne intégration du substitut au sein du site d'implantation, tout en respectant les tissus avoisinants (tissus mous, vaisseaux sanguins…).

En cas de mouvement, du tissu fibreux vient combler les espaces au lieu du tissu osseux, on aura alors seulement une réparation et non une régénération [14].

Les propriétés mécaniques : le substitut doit également avoir des propriétés mécaniques adaptées, se rapprochant le plus possible de celles du tissu natif, telles que la résistance en traction (module d'élasticité ou module de Young, contrainte de rupture) et en compression *(tableau 1)*. L'os cortical présente une résistance mécanique optimale liée à sa structure interne, constituée de lamelles osseuses orientées et étroitement associées les unes aux autres. À l'inverse, l'os trabéculaire présente une faible résistance mécanique.

Autres propriétés : il doit supporter la stérilisation et, idéalement, pouvoir être produit par un processus industriel simple, rapide et d'un coût limité.

CONCLUSION

Dans ce premier article, nous avons souligné l'importance de bien connaître la structure du tissu osseux pour choisir le substitut osseux dont les propriétés répondront le mieux possible aux impératifs de la situation clinique envisagée.

Le prochain article détaillera la classification des substituts osseux utilisés en odontologie, leurs avantages, leurs limites et leurs principales indications cliniques.

Les auteurs remercient le Dr Nasr Hasnaoui pour les photographies du cas clinique.

1 - Propriétés mécaniques du tissu osseux (d'après Wagoner Johnson) [20–27].

	Résistance à la compression (MPa)	Résistance à la flexion (MPa)	Résistance à la tension (MPa)	Module d'élasticité (GPa)	Taux de porosité (%)
Os cortical	130-180	135-193	50-151	12-18	5-13
Os trabéculaire	4-12		1-5	0,1-0,5	30-90

Les auteurs n'ont aucun lien d'intérêt.

Correspondance : thibault.canceill@sfr.fr

Références bibliographiques

1. Kataria S, Chandrashekar KT, Mishra R, Tripathi V. Autogenous bone graft for management of periodontal defects. J Int Clin Dent Res Organ 2016;8(1):70-5.

2. Pistilli R, Felice P, Piatelli M, Nisii A, Barausse C, Esposito M. Blocks of autogenous bone versus xenografts for the rehabilitation of atrophic jaws with dental implants: preliminary data from a pilot randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol. 2014;7(2):153-71.

3. Sakkas A, Ioannis K, Winter K, Schramm A, Wilde F. Clinical results of autologous bone augmentation harvested from the mandibular ramus prior to implant placement. An analysis of 104 cases. GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW 2016;5:Doc21. eCollection 2016.

4. Pryor LS, Gage E, Langevin CJ, Herrera F, Breithaupt AD, Gordon CR, Afifi AM, Zins JE, Meltzer H, Gosman A, Cohen SR, Holmes R. Review of bone substitutes. Craniomaxillofac Trauma Reconstr. 2009;2(3):151-60.

5. Mainard D. Les substituts de l'os, du cartilage et du ménisque. Paris, éd. Sauramps Medical, 2015, 195 p.

6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int 2015;2015:1-17.

7. Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. Am J Physiol 1995;268(5 Pt 1):C1090-103.

8. Dressmann H. Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens. Beitr Klin Chir 1892;9:804-10.

9. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. Injury 2011;42(Suppl 2):S77-81.

10. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. Periodontology 2000. 1999;19:74-86.

11. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2017;105(5):1285-99.

12. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. Bone 2015;81:112-21.

13. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone – a systematic review and meta-analysis. Eur J Oral Implantol 2014;7(Suppl 2):S219-34.

14. Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? Injury 2011;42(Suppl 2):S22-5.

15. Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. Histol Histopathol 1999;14(3):871-7.

16. Liu T, Zheng Y, Wu G, Wismeijer D, Pathak JL, Liu Y. BMP2-coprecipitated calcium phosphate granules enhance osteoinductivity of deproteinized bovine bone, and bone formation during critical-sized bone defect healing. Sci Rep 2017;7:1-12.

17. Yuan N, Rezzadeh KS, Lee JC.Biomimetic Scaffolds for Osteogenesis. Receptors Clin Investig. 2015;2(4):1-6.

18. M. Yamada, H. Egusa. Current bone substitutes for implant dentistry. J Prosthodont Res 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2017.08.010.

19. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. Acta Biomater 2014;10(3):1035-49.

20. Wagoner Johnson AJ, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. Acta Biomater 2011;7(1):16-30.

21. Zioupos P, Currey JD. Changes in the stiffness, strength, and toughness of human cortical bone with age. Bone 1998;22(1):57-66.

22. Sedlin ED. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. Acta Orthop Scand Suppl 1965;Suppl 83:1-77.

23. Dong XN, Guo XE. The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. J Biomech 2004;37(8):1281-7.

24. Giesen EB, Ding M, Dalstra M, van Eijden TM. Mechanical properties of cancellous bone in the human mandibular condyle are anisotropic. J Biomech 2001;34(6):799-803.

25. Røhl L, Larsen E, Linde F, Odgaard A, Jørgensen J. Tensile and compressive properties of cancellous bone. J Biomech 1991;24(12):1143-9.

26. Yeni YN, Fyhrie DP. Finite element calculated uniaxial apparent stiffness is a consistent predictor of uniaxial apparent strength in human vertebral cancellous bone tested with different boundary conditions. J Biomech 2001;34(12):1649-54.

27. Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. J Bone Joint Surg Am 1977;59(7):954-62.

ANNEXE 4 :

Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V

Les substituts osseux en odontologie. Partie 2 – Classification des substituts osseux

Biomatériaux cliniques, 2019, 4 : 46-51

BIOLOGIE ET BIOMATÉRIAUX

Actualisation en continu

LES SUBSTITUTS OSSEUX EN ODONTOLOGIE

Partie 2 - Classification

THIBAULT CANCEILL
AHU, Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse

CHARLENE KICHENBRAND
AHU, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

SABINE JONIOT
MCU-PH, Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse

VANESSA MOBY
MCU-PH, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

Ce second article traitant des substituts osseux détaille la classification de ces biomatériaux utilisés en odontologie, leurs avantages, leurs limites, tout en soulignant leurs principales indications cliniques.

Le succès d'une greffe osseuse par le chirurgien-dentiste est lié notamment à l'incorporation du greffon dans le processus de renouvellement du tissu osseux du patient. Des biomatériaux, d'origine naturelle ou synthétique peuvent être utilisés comme substituts osseux. Cependant, tous ne sont pas résorbés ni remplacés intégralement par de l'os naturel. Cet article décrit la classification de ces biomatériaux tels qu'ils sont disponibles sur le marché.

Actualisation via l'url :
http://bit.ly/2F1AW5Q
ou le QR code

BONE SUBSTITUTES IN ORAL SURGERY
Part 2 - Classification

Bone graft success in dental practice is partly related to the incorporation of the graft into the patient's bone renewal process. Biomaterials, from natural or synthetic origin, can be used as bone substitutes, but not all of them are resorbed nor completely replaced by natural bone.
This article describes these materials classification as they are available for the practitioner.

LES GREFFES OSSEUSES

L'inclusion des greffes dans la classification des biomatériaux est liée à leurs capacités de remplacement des tissus biologiques et d'induction de réponses de la part de ces tissus.

Pour rappel, le *gold-standard* en odontologie reste **l'os autogène** prélevé et réimplanté chez le même individu [1]. Cependant, la faible quantité d'os disponible ainsi que la morbidité d'un second site opératoire ont conduit à l'utilisation d'autres biomatériaux.

On parle d'**allogreffe** (fig. 1a) lorsque l'individu donneur et l'individu receveur ne sont pas les mêmes mais qu'ils appartiennent à la même espèce. Afin d'éviter tout phénomène de rejet lié aux éléments cellulaires et moléculaires contenus dans le greffon et tout risque de transmission virale, il faut lui faire subir divers traitements de déprotéinisation ou de déminéralisation, qui seront suivis de procédures de stérilisation. À l'issue de ces protocoles, le matériau obtenu n'est quasiment plus qu'ostéoconducteur. Les matériaux dont les propriétés ostéo-inductrices sont soumises à controverses ne sont pas utilisés en France. Il existe des banques d'os allogène qui permettent la mise à disposition de grande quantité d'os allogénique, sous la forme choisie par le praticien. Cet os est prélevé sur cadavres ou donneurs vivants. En France, **l'os déprotéinisé de type BioBank®** (fig. 1a) (prélevé sur **donneurs vivants**) est l'allogreffe la plus utilisée [2]. Il est dépourvu de cellules osseuses, de moelle osseuse et de protéines matricielles non collagéniques, il n'est donc plus qu'ostéoconducteur. Il a l'avantage de conserver une grande quantité de fibres de collagène ainsi que les minéraux et les propriétés mécaniques du tissu osseux [2, 3]. Il a un grand pouvoir de mouillabilité ou hydrophilie, ce qui permet de maintenir le caillot primaire, favorisant ainsi la néo-angiogenèse et donc la revascularisation du substitut. Cela aura un effet ostéoconducteur vis-à-vis des cellules responsables de la régénération osseuse [2, 3]. Ce substitut a l'avantage de ne nécessiter qu'un seul site opératoire diminuant ainsi la morbidité et les complications postopératoires. Du fait de l'absence d'ostéogenèse, la régénération osseuse est plus longue qu'avec une autogreffe.

Ce substitut se présente sous forme de poudre d'os spongieux ou cortico-spongieux, de lames corticales ou de blocs d'os spongieux ou cortico-spongieux.

La poudre d'os est préconisée principalement dans le cas de comblement d'alvéoles et pour des défauts osseux de petite taille.

Les blocs cortico-spongieux sont utilisés pour des reconstructions de moyenne et grande étendue. Ils associent en effet les qualités des deux types d'os : la résistance mécanique de l'os cortical due à sa densité et la cicatrisation osseuse rapide de l'os trabéculaire due à sa structure riche en travées et alvéoles.

1. Exemples de substituts osseux, en bloc ou en particules.

a. Allogreffe : os humain déprotéinisé de type BioBank®.

b. Xénogreffe : os bovin (particules de Bio-Oss®).

Le terme **xénogreffe** est employé lorsque le substitut provient d'un individu d'une espèce différente de celle du receveur (**hydroxyapatite d'origine bovine** comme le **Bio-Oss®**, Geistlich notamment) (fig. 1b). Comme pour les allogreffes, des traitements (déprotéinisation notamment) sont nécessaires pour éliminer les éléments immunogènes présents dans le greffon. Les xénogreffes sont donc également des matériaux ostéoconducteurs (porosité, structure cristalline et composition en minéraux proches de celles de l'os humain). Ces substituts conservent leurs propriétés mécaniques. Ils sont utilisés seuls ou en association avec l'autogreffe ou un autre type de substitut osseux.

On distingue les hydroxyapatites biologiques et les carbonates de calcium (corail), même si ces derniers ne sont plus disponibles à ce jour sur le marché français.

Depuis 2009 pour les xénogreffes et 2016 pour les allogreffes, ces matériaux sont considérés comme des dispositifs

médicaux et non plus comme de véritables greffes, ce qui permet aux patients « greffés » de pouvoir continuer à être donneurs de sang.
Ces substituts n'étant pas issus de banques d'os, l'accès est facilité, contrairement aux allogreffes.
Les résultats cliniques obtenus avec des allogreffes et des xénogreffes (hydroxyapatites biologiques) sont relativement proches [4, 5], mais les capacités de résorption des xénogreffes sont inférieures à celles des allogreffes, ce qui peut perturber le remodelage osseux. Cette résorption plus lente des hydroxyapatites d'origine bovine peut devenir un avantage dans le cas de régénération de défaut osseux important, car cela permet de maintenir l'espace plus longtemps. De plus, aucune étude à ce jour n'a totalement écarté le risque de transmission du prion (encéphalopathies spongiformes transmissibles) [6].
La xénogreffe se présente sous la forme de particules ou de granules d'os spongieux associés ou non à du collagène d'origine porcine (matériau composite associant une phase minérale (hydroxyapatite) à une phase organique (collagène)). Son association au collagène donne une structure en forme d'éponge qui augmente ainsi la malléabilité du substitut et facilite son adaptation au défaut osseux. Il permet également de maintenir en place les particules d'os. Sa bonne mouillabilité est favorable à la colonisation par les vaisseaux et les cellules, donc à la régénération osseuse. Il présente également un coût inférieur à celui des allogreffes et est principalement indiqué dans le cas de comblement d'alvéoles et de défauts osseux de petite taille.

Les **carbonates de calcium** sont des matériaux qui peuvent être considérés comme des xénogreffes particulières parce qu'ils sont retrouvés dans la nature (ce sont les principaux constituants du corail). Ils possèdent des pores interconnectés favorables à la colonisation en cellules et vaisseaux et sont donc favorables à la régénération osseuse. Le taux de porosité et le diamètre des pores varient en fonction de l'espèce coralienne. À ce jour, leur utilisation en chirurgie dentaire est très limitée, mais ils présentent, comme les phosphates de calcium, une très bonne adhésion à l'os. Ce sont des matériaux ostéoconducteurs, fragiles et dont la résorption varie selon les espèces.

LES CÉRAMIQUES BIOACTIVES SYNTHÉTIQUES

À l'inverse des greffes d'origine naturelle, des biomatériaux synthétiques ont été développés pour augmenter les quantités disponibles et permettre des restaurations de plus grande étendue (fig. 2). Les céramiques bioactives en représentent la principale famille. Ces matériaux sont **uniquement ostéoconducteurs**. D'origine synthétique, ils sont disponibles en quantité illimitée, n'entraînent aucun risque de transmission d'agents pathogènes et sont dépourvus d'antigénicité.

Les sels de calcium

Les phosphates de calcium

Le principe de l'utilisation des phosphates de calcium est de reproduire une structure proche du minéral osseux pour permettre une transmission harmonieuse des contraintes entre l'os et le matériau. Ces matériaux poreux à base de phosphate de calcium sont conditionnés principalement sous forme de granulés. Ils existent sous différentes porosités. Leur utilisation clinique passe par le mélange des granules avec du sérum physiologique ou du sang avant l'insertion dans la lésion osseuse. En effet, le sang contient des plaquettes riches en facteurs de croissance. Leur faible résistance mécanique limite leur utilisation à des situations cliniques où les contraintes mécaniques sont peu importantes. Ils sont donc relativement fragiles [7].

Les hydroxyapatites de synthèse (monophasés)

Les hydroxyapatites sont des phosphates de calcium de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (rapport Ca/P = 1,67). Elles sont ostéoconductrices et résorbées de façon incomplète [8], ce qui justifie leur utilisation dans des situations cliniques où le maintien du volume tissulaire est important [9].

Les phosphates tricalciques (monophasés)

On parle de β-TCP, pour bêta tri-calcium-phosphate, de formule $Ca_3(PO_4)_2$ (rapport Ca/P = 1,5). Leur structure est légèrement plus éloignée de celle du tissu osseux naturel. Ils sont ostéoconducteurs et, au contraire des hydroxyapatites, seront totalement résorbés [10]. Cependant, cela reste des matériaux fragiles.

Les céramiques biphasées

Les matériaux monophasés présentent des propriétés intéressantes, mais aucun d'entre eux ne les possède toutes. L'idée s'est alors développée de créer des matériaux biphasés associant plusieurs matériaux monophasés afin d'améliorer les propriétés mécaniques et biologiques de l'ensemble. L'association la plus commune est un mélange en proportions variables d'hydroxyapatites et de β-TCP dont l'ostéoinduction a déjà été démontrée [11]. Il existe une multitude de matériaux de ce type sur le marché, chacun présentant des proportions de matériaux monophasés différentes. Leur principal atout est d'associer les propriétés de maintien de volume de l'hydroxyapatite au potentiel de résorption du β-TCP. La cinétique de résorption est ainsi mieux contrôlée [12].

On qualifie les matériaux biphasés de BCP : phosphates de calcium biphasés. À ne pas confondre avec les β-TCP.

Les sulfates de calcium

Les sulfates de calcium sont le dernier type de céramiques monophasées à base de calcium. Ils sont davantage connus sous le nom de « plâtre de Paris ». Ces matériaux ostéoconducteurs présentent la particularité d'être très rapidement résorbés dans les tissus biologiques. À l'heure actuelle, leur utilisation en odontologie est exceptionnelle.

Les bioverres

Ce sont des biomatériaux non poreux, ostéoconducteurs. Ils sont plus ou moins résorbables en fonction de la teneur en minéraux. Leur composition chimique est très semblable à celle du tissu osseux (Ca, P, silice). Ils se lient à l'os sans interface de tissu conjonctif fibreux. En effet, au contact des fluides biologiques, la dissolution des bioverres entraîne la libération de minéraux et la formation d'une couche de phosphate de calcium à leur surface, créant un lien chimique étroit entre le bioverre et le tissu osseux. Cette couche d'apatite stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et favorise donc la régénération osseuse. Cliniquement, ils sont mélangés à du sérum physiologique ou à du sang du patient avant implantation. Les bioverres présentent une bonne maniabilité clinique. Leur résistance mécanique est supérieure à celle du phosphate de calcium [13-15].

MATÉRIAUX COMPOSITES

Ils sont basés sur l'association d'une phase organique (collagène par exemple) et d'une phase minérale (hydroxyapatite, β-TCP, BCP…). Ils se rapprochent de la composition de la trame osseuse. La disponibilité des BCP sous forme de granules a conduit les équipes de recherche à imaginer de nouvelles associations de ces matériaux avec des molécules capables de conférer à l'ensemble un aspect de gel plus facile à manipuler. C'est en faisant l'analogie avec la structure organique du tissu osseux que les hydrogels sont apparus. En effet, les céramiques peuvent être associées à des polymères hydrosolubles naturels (collagène, fibrine, acide hyaluronique, cellulose) ou synthétiques (polyéthylène glycol, polyméthylméthacrylate). La présentation de ce type de matériau en seringues est plus ergonomique pour le praticien. Ils ont également l'avantage d'avoir une bonne mouillabilité, ce qui est favorable à la stabilité du caillot [16]. La principale association rencontrée en clinique est celle d'une céramique apportant l'ostéoconduction avec du collagène apportant l'ostéoinduction. Leur résistance mécanique est faible.

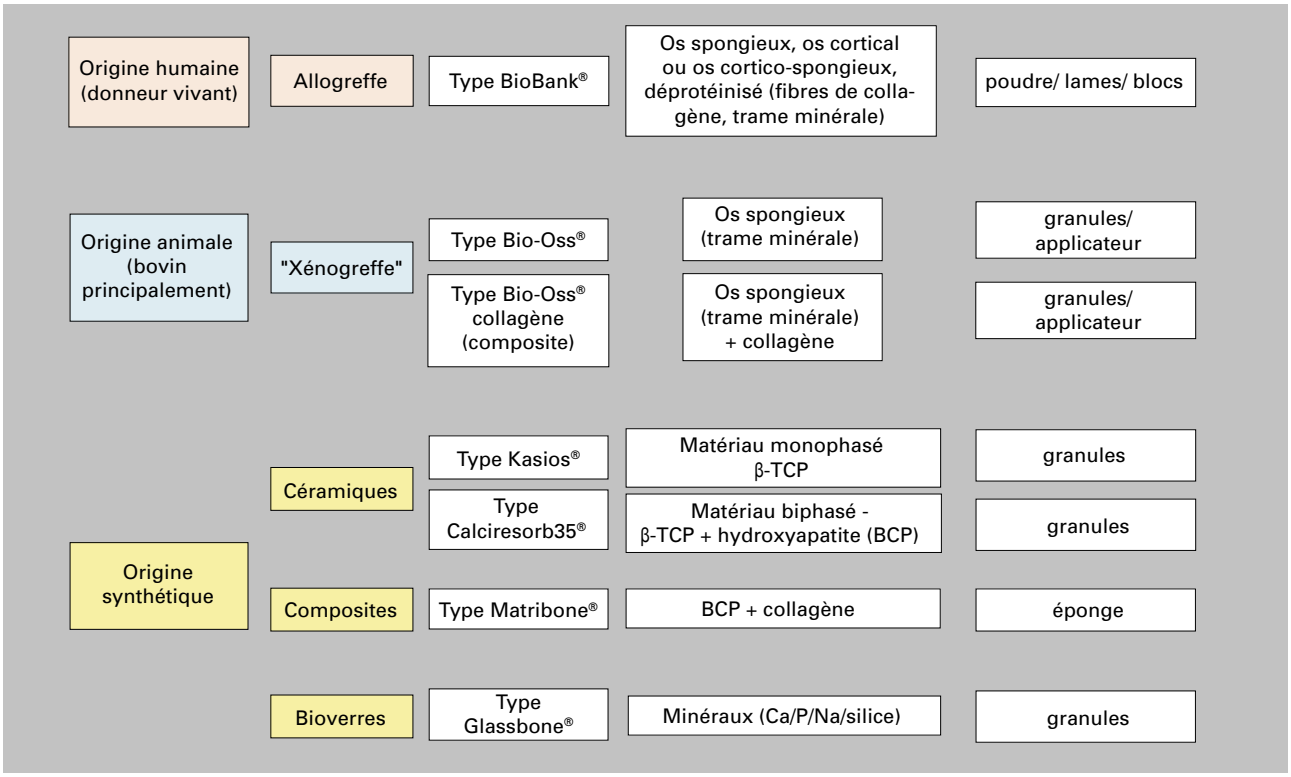
ASSOCIATION À DES FACTEURS DE CROISSANCE

Le développement croissant des substituts osseux a conduit à l'apparition de pistes pour rendre le matériau ostéoinducteur. L'utilisation de facteurs de croissance est limitée par le cadre réglementaire français. La famille la plus connue est celle des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) qui agissent sur le recrutement et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes. Dans le cadre de la recherche, la combinaison de facteurs de croissance (BMP2) et de cellules souches mésenchymateuses ensemencées au sein d'une matrice tridimensionnelle (β-TCP) revêt un intérêt majeur, car l'ensemble pourrait avoir un véritable effet synergique sur les capacités de réparation de défauts osseux. Le BMP a donc un rôle potentialisateur [17-19].

Il existe sur le marché un seul produit riche en protéines stimulant la régénération tissulaire (amélogénines d'origine porcine), connu sous le nom d'Emdogain®. Très utilisé en parodontologie, il est difficile d'y avoir recours pour des régénérations de grande étendue du fait de sa formulation sous forme de gel et de son coût.

PERSPECTIVES

Parmi l'ensemble des biomatériaux disponibles sur le marché (fig. 2), aucun n'a démontré de supériorité par rapport à l'autogreffe en termes de résultats cliniques [20]. Tous sont ostéoconducteurs, mais aucun ne présente une structure qui lui permettrait de répondre aux quatre caractéristiques mécaniques du substitut osseux idéal (malléabilité, porosité adaptée, propriétés mécaniques proches de l'os natif et stabilité dimensionnelle [1]). Il appartient ainsi au praticien d'adapter le choix de son biomatériau de comblement en fonction du cas clinique. Dans le cadre d'une reconstruction de volume important, un matériau moins rapidement résorbé et présentant de meilleures propriétés mécaniques sera plutôt envisagé, alors que dans le cas de lésions de plus faible étendue, le recours à des céramiques biphasiques, éventuellement sous la forme de granules en seringues ou associées à du collagène, pourra être envisagé [20]. Aujourd'hui, la recherche sur les substituts osseux s'oriente, grâce à l'ingénierie tissulaire, vers une combinaison de médiateurs biologiques (facteurs de croissance ou produits de sécrétion, cellules souches mésenchymateuses) et de biomatériaux céramiques ou polymères. Nous nous engageons dans une véritable « quête du Saint-Graal » afin d'aboutir à la création d'un matériau idéalement ostéogène qui pourra régénérer les défauts osseux de moyenne et grande étendue sans les problèmes, notamment de disponibilité et de morbidité, rencontrés avec l'os autogène qui reste à ce jour la référence.



2. Les substituts osseux en France : les alternatives aux autogreffes actuellement utilisées en odontologie (liste non exhaustive des produits commercialisés).

Références bibliographiques

1. Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les substituts osseux en odontologie. Partie 1-Structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges. BMC 2018; 3(1):46-51.

2. Moret M, Canonica M, Henriot E, Piral T, Princ G. Greffons osseux d'apposition allogéniques BioBank "modélisés" 3D. À propos de deux cas. Inf Dent. 2016;98(9):26-32.

3. Sindel A, Dereci Ö, Toru HS, Tozoğlu S. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized BoneDefects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. J Craniofac Surg 2017;28(7):1865-8.

4. Blaggana V, Gill AS, Blaggana A. A clinical and radiological evaluation of the relative efficacy of demineralized freeze-dried bone allograft versus anorganic bovine bone xenograft in the treatment of human infrabony periodontal defects: A 6 months follow-up study. J Indian Soc Periodontol 2014;18(5):601-7.

5. Serrano Méndez CA, Lang NP, Caneva M, Ramírez Lemus G, Mora Solano G, Botticelli D. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. Clin Implant Dent Relat Res 2017;19(4):608-15.

6. Kim Y, Rodriguez AE, Nowzari H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. Clin Implant Dent Relat Res 2016;18(6):1095-102.

7. Bertazzo S, Bertran CA. Morphological and dimensional characteristics of bone mineral crystals. Key Eng Mater 2006; 309-311:3-6.

8. Klein CP, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. J Biomed Mater Res 1983;17(5):769-84.

9. Kolmas J, Groszyk E, Kwiatkowska-Różycka D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. Bio Med Res Int 2014;2014:178123.

10. Liu B, Lun D. Current application of β-tricalcium phosphate composites in orthopaedics. Orthop Surg 2012;4(3):139-44.

11. Mangano C, Sinjari B, Shibli JA, Mangano F, Hamisch S, Piattelli A, Perrotti V, Iezzi G. A Human Clinical, Histological, Histomorphometrical, and Radiographical Study on Biphasic HA-Beta-TCP 30/70 in Maxillary Sinus Augmentation. Clin Implant Dent Relat Res 2015;17(3):610-8.

12. Bellucci D, Sola A, Cannillo V. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications. J Biomed Mater Res A 2016;104(4):1030-56.

13. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. Acta Biomater 2013;9(1):4457-86.

14. Satyanarayana KV, Anuradha BR, Srikanth G, Chandra PM, Anupama T, Durga PM. Clinical evaluation of intrabony defects in localized aggressive periodontitis patients with and without bioglass- an in-vivo study. Kathmandu Univ Med J (KUMJ) 2012; 10(37):11-5.

15. Biswas S, Sambashivaiah S, Kulal R, Bilichodmath S, Kurtzman GM. Comparative Evaluation of Bioactive Glass (Putty) and Platelet Rich Fibrin in Treating Furcation Defects. J Oral Implantol 2016;42(5):411-5.

16. Brkovic BM, Prasad HS, Rohrer MD, Konandreas G, Agrogiannis G, Antunovic D, Sándor GK. Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. Clin Oral Investig 2012;16(2):581-90.

17. Sandor GKB. Tissue engineering of bone: Clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors. Ann Maxollofac Surg 2012;2(1):8-11.

18. Miron RJ, Zhang Q, Sculean A, Buser D, Pippenger BE, Dard M, Shirakata Y, Chandad F, Zhang Y. Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. Clin Oral Investig 2016;20(8):2259-65.

19. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. Adv Drug Deliv Rev 2015;94:3-12.

20. Yamada M, Egusa H. Current bone substitute for implant dentistry. J Prosthodont Res 2018; 62(2):152-161.

Les auteurs n'ont aucun lien d'intérêt.

Correspondance : thibault.canceill@sfr.fr

ANNEXE 5 :

Canceill T, Campana S, Blasco-Baque V, Monsarrat P, Kichenbrand C, Joniot S, Cazalbou C, Moby V

Les concentrés plaquettaires en chirurgie orale. Quand la biologie et les matériaux ne font qu'un.

Biomatériaux cliniques, 2020, 5 : 2-10

MATÉRIAUX

Actualisation en continu

LES CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES EN CHIRURGIE ORALE

Quand la biologie et les matériaux ne font qu'un

THIBAULT CANCEILL
AHU, Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse
Laboratoire CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS

SOPHIE-CAROLINE CAMPANA
Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse

VINCENT BLASCO-BAQUE
Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), INSERM U1048

PAUL MONSARRAT
Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse
STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL 5311, EFS, ENVT, Inserm, UPS

CHARLÈNE KICHENBRAND
AHU, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

SABINE JONIOT
Université Toulouse III Paul Sabatier, Hôpitaux de Toulouse, France

SOPHIE CAZALBOU
Laboratoire CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS

VANESSA MOBY
MCU-PH, Université de Lorraine, CHRU Nancy
Équipe Bio-ingénierie Tissulaire, Vectorisation et Imagerie Articulaires (BiTiVIA), UMR CNRS-UL 7365

Actualisation via l'url : http://bit.ly/325BthM ou le QR code

La complexité de la régénération tissulaire en odontologie a conduit à l'utilisation de molécules bioactives naturellement retrouvées dans la nature : les facteurs de croissance (VEGF, EGF, TGF-ß…).
Cependant, l'implantation de telles protéines d'origine exogène est limitée par le cadre réglementaire.
Les plaquettes étant une source alternative intéressante de facteurs de croissance chez l'Homme, l'utilisation des dérivés plaquettaires autologues a connu un essor considérable depuis une vingtaine d'années.
Le PRP (plasma riche en plaquettes) et le PRF (plasma riche en fibrine), obtenus par centrifugations de prélèvements sanguins et bien connus en odontologie, ne sont pas les deux seuls dérivés plaquettaires qui existent. D'autres sont apparus plus récemment grâce à des modifications dans les protocoles de conception. Certains comme le plasma riche en facteurs de croissance (PRFC) sont utilisables cliniquement, d'autres sont encore utilisés seulement dans le domaine de la recherche (le lysat plaquettaire notamment).
Cet article présente les principaux concentrés plaquettaires, leurs modalités de production ainsi que les perspectives qu'ils offrent dans le domaine de la régénération tissulaire, notamment en chirurgie orale.

ORAL SURGERY AND PLATELET DERIVATES: WHEN BIOLOGY AND MATERIALS WORK TOGETHER

The complexity of tissue regeneration in dentistry requires the use of bioactive molecules naturally found in living organisms: the growth factors (VEGF, EGF, TGF-ß…). However, the implantation of such exogenous proteins is limited by the regulatory framework. The platelets being an interesting alternative source of growth factors, the use of platelet derivatives, from autologous origin, has undergone significant growth over the past twenty years. PRP (platelet-rich plasma) and PRF (platelet rich fibrin), obtained by centrifugation of blood samples and well known in dentistry, are not the only two platelet derivatives available. Others have emerged more recently as a result of changes in design protocols. Some, such as Plasma rich in growth factors (PRGF), can be used clinically, while others are still used only in research (platelet lysate in particular). This article presents the main platelet concentrates, their production methods and the prospects they offer in the field of tissue regeneration, particularly in oral surgery.

La préservation et la régénération des volumes osseux sont des problématiques quotidiennes pour le chirurgien-dentiste. Les pathologies orales conduisent à une destruction tissulaire qui concerne aussi bien les tissus durs que les tissus mous, ce qui constitue un enjeu majeur de reconstruction et de régénération. L'émail dentaire et la dentine peuvent être détruits par la carie [1], mais l'os alvéolaire peut aussi être touché [2,3] et le niveau gingival réduit également en cas de parodontite. La compétition entre les différents types cellulaires pour occuper le site [4], ainsi que la présence d'un grand nombre de bactéries [5,6] dans la cavité orale, compliquent d'autant plus le processus de cicatrisation que le patient peut aussi présenter un système immunitaire affaibli [6].

Dans sa pratique, notamment en chirurgie parodontale, préimplantaire et préprothétique, le chirurgien-dentiste dispose de différents biomatériaux qu'il peut greffer sur les sites touchés [7,8]. Les substituts osseux vont être utilisés dans les procédures de reconstitution du volume osseux alvéolaire, mais les résultats sont inconstants et dépendent du métabolisme et de l'état de santé propre à chaque patient [7,9,10]. Si les substituts osseux permettent donc de répondre en partie à cette problématique, l'utilisation de produits bioactifs en vue de stimuler les mécanismes d'ostéogenèse endogènes de l'hôte sans l'ajout de biomatériaux représente une alternative intéressante.

Les produits bioactifs dérivés du sang peuvent être isolés et/ou mis en forme à partir d'un simple prélèvement sanguin. Ils peuvent n'être constitués que d'une seule molécule, comme les immunoglobulines [11] ou l'albumine [12], ou d'une partie entière de l'échantillon sanguin [13]. La richesse du tissu sanguin en éléments cellulaires, et surtout protéiques (parmi eux, des facteurs de croissance, des cytokines…), offre des perspectives dans le traitement des pathologies pour lesquelles les processus de guérison sont déficients.

Les concentrés plaquettaires – appartenant aux dérivés du sang – trouvent une place grandissante en odontologie. Les premiers ont été décrits au début des années 1970 ; cependant, les principales évolutions dans leurs méthodes de préparation et leurs applications datent de la fin des années 1990 [14]. Leur bioactivité permet une utilisation

en association avec des greffes osseuses, des substituts osseux du commerce ou même seuls, à la croisée des chemins entre biologie et biomatériaux. Ils peuvent être utilisés au sein d'un cabinet dentaire, à la condition que le praticien ait été formé aux techniques de prise de sang ainsi qu'à l'utilisation du produit.

L'objectif est, après un rappel sur le rôle des thrombocytes, de présenter les principaux concentrés plaquettaires (CP) qui existent et les perspectives qu'ils offrent dans le domaine de la régénération tissulaire.

LES THROMBOCYTES, ACTEURS MAJEURS DE LA RÉGÉNÉRATION

La compréhension de la cascade de coagulation sanguine et du rôle des plaquettes menant à la régénération tissulaire après un traumatisme permet de mieux comprendre l'action thérapeutique de ces concentrés plaquettaires.

Les thrombocytes, ou plaquettes, sont des cellules dépourvues de noyau, formées suite à la fragmentation dans la moelle osseuse de cellules appelées mégacaryocytes [15]. Elles ont pour rôle principal de participer aux phénomènes de la coagulation sanguine dont les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires sont complexes et mènent à la réparation et à la régénération du tissu. Leur cytoplasme est riche en protéines comme le fibrinogène (capable d'être assemblé en polymères de fibrine), ou encore de nombreux facteurs de croissances. Parmi eux sont retrouvés notamment le TGF-ß *(transforming growth factor ß)*, le VEGF *(vascular endothelium growth factor)*, le PDGF *(platelet-derived growth factor)* et l'EGF *(epidermal growth factor)* [16]. Le VEGF est principalement dévoué à initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en promouvant la migration et la prolifération des cellules endothéliales [17]. Le PDGF a lui aussi un rôle dans l'angiogenèse, en favorisant la stabilisation des réseaux vasculaires [18,19]. L'EGF agit sur la croissance épithéliale, la formation du système nerveux et celle du système cardiovasculaire dans son ensemble [20]. En cas de blessure, les plaquettes sont activées, ce qui entraîne la libération dans le caillot de ces molécules trophiques, participant à stimuler les événements physiologiques complexes menant à la réparation et à la régénération des tissus.

De telles propriétés vis-à-vis des cellules de tissus hôtes permettent d'expliquer l'intérêt croissant porté aux CP. Après isolation de ces produits à partir de prélèvements sanguins, les plaquettes sont regroupées dans une petite quantité de volume plasmatique [21] et deviennent implantables – plus ou moins facilement selon la forme – sur le site à régénérer. La préparation des CP en pratique libérale impose la maîtrise des méthodes de prélèvements sanguins et l'utilisation d'une centrifugeuse. De façon simple, une prise de sang est effectuée sur le patient au début de l'intervention, puis les tubes sont centrifugés pour séparer les différentes phases sanguines. Le nombre de passages à la centrifugeuse, les tubes de prélèvement, la vitesse de rotation et le temps de centrifugation sont variables selon le produit à préparer. Les principaux CP utilisés sont le plasma riche en plaquettes (PRP), le plasma riche en fibrine (PRF) et le lysat plaquettaire.

LES PRINCIPAUX CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES

Le plasma riche en plaquettes (PRP)

Le PRP, comme la plupart des autres CP, contient les plaquettes de l'échantillon prélevé et une partie de ses globules blancs [16]. Il contient en moyenne trois à cinq fois plus de plaquettes et de facteurs de croissance que le sang périphérique [22]. Il s'agit d'un plasma liquide dérivé du sang prélevé dans des tubes enrichis en anticoagulants (tubes citratés) et isolé selon un protocole de centrifugation en deux étapes *(tableau 1, fig. 1)*. La première centrifugation se fait à basse vitesse (200 g, 7 min) afin d'obtenir un surnageant plasmatique pauvre en cellules, une phase intermédiaire riche en éléments cellulaires et une phase inférieure de globules rouges. La deuxième centrifugation, plus rapide (2 000 g, 10 min), est menée sur les deux premières phases précédentes et permet d'isoler un caillot inférieur de globules rouges résiduels et deux autres phases : le plasma pauvre en plaquettes (PPP) en haut et le plasma riche en plaquettes (PRP) au milieu [16].

Le PPP est pauvre en éléments permettant d'envisager son utilisation en régénération tissulaire [23] ; en revanche, le PRP possède des propriétés bioactives importantes. Selon que son contenu est épuré des globules blancs ou pas, il sera appelé P-PRP (Pure-PRP) ou L-PRP (Leucocytes-PRP) [16]. En fonction des protocoles, la dernière étape consiste à activer la gélification de la préparation. L'addition de chlorure de calcium ou de thrombine permet en effet de lancer la cascade de coagulation. Par exemple, la thrombine induit la transformation du fibrinogène en un réseau de fibrine possédant des propriétés hémostatiques et adhésives entraînant la gélification du composé. C'est le même principe que pour le Tissucol®, traitement sous forme de poudre de fibrinogène et de facteurs de la coagulation à reconstituer et destiné à favoriser l'hémostase locale.

Dans les années 2000, le PRP était le principal concentré plaquettaire utilisé en odontologie pour la régénération osseuse post-extractionnelle et également en association avec d'autres biomatériaux minéralisés, sous forme de granules, pour le traitement des lésions parodontales [24].

Tableau 1 - Protocoles de préparation des principaux concentrés plaquettaires.

	Anticoagulant	g		Temps (min)
PRP	Oui	1)	200	7
		2)	2000	10
PRFC	Oui	770		8
L-PRF	Non	2000		10
A-PRF	Non	500		10
I-PRF	Non	110		3
CGF	Non	1400		4

Le PRP peut libérer rapidement les facteurs de croissance au niveau du site de réparation, se prolongeant jusqu'à vingt-quatre heures [25].

Le plasma riche en facteurs de croissance (PRFC)

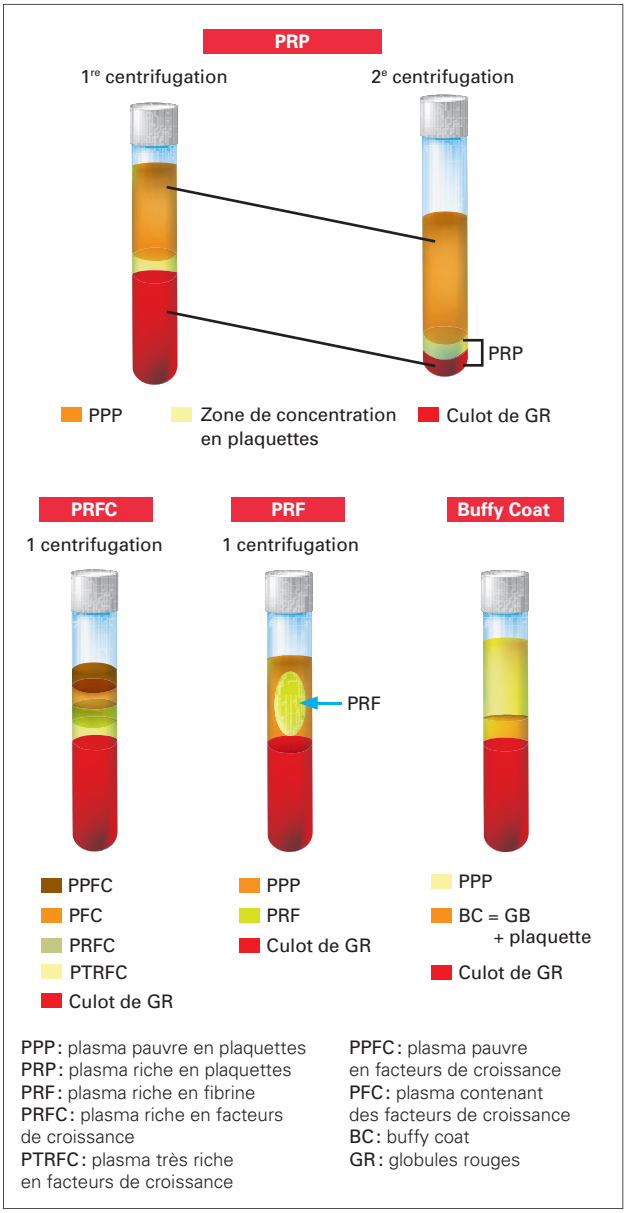
C'est une méthode plus simple de préparation de PRP. Une centrifugation de l'échantillon sanguin (770 g, 8 min) dans un contenant enrichi en anticoagulant permet d'isoler cinq phases différentes de haut en bas *(fig. 1)*: le plasma pauvre en facteurs de croissance (PPFC), le plasma contenant des facteurs de croissance (PFC), le plasma riche en facteurs de croissance (PRFC), le plasma très riche en facteurs de croissance (PTRFC), et une phase de globules rouges [26].

Les quatre premières phases représentent la totalité du plasma; seules les trois phases PFC, PRFC et PTRFC sont prélevées à l'aide d'une pipette, car elles revêtent un intérêt majeur en ce qui concerne la disponibilité des facteurs de croissance. Elles ont déjà été utilisées en chirurgie orale pour favoriser la cicatrisation des tissus durs et des tissus mous après l'intervention [26]. Une fois qu'elles sont recueillies, du chlorure de calcium est ajouté. Quelques minutes après, un gel, prêt à être utilisé, est obtenu [26].

Actuellement, le recours au PRFC n'est pas priorisé par les praticiens qui lui préfèrent d'autres concentrés comme le PRF, plus facile à manipuler.

Le plasma riche en fibrine (PRF) et ses déclinaisons

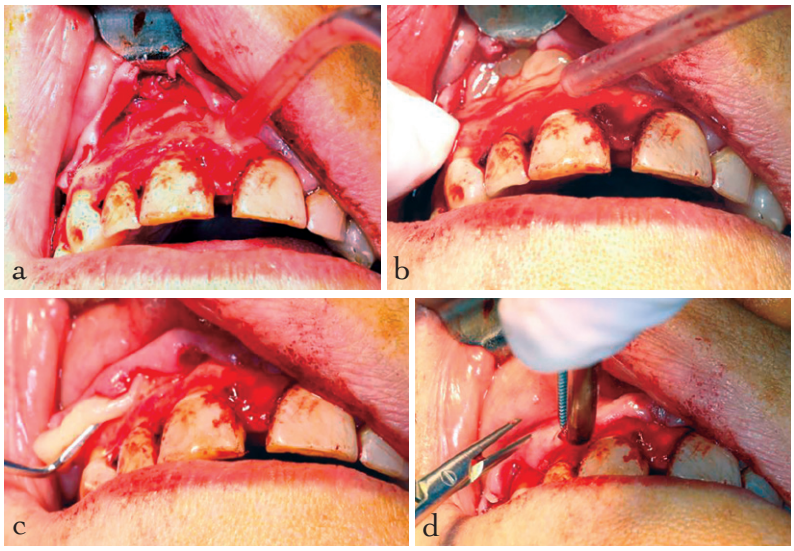
Le PRF (également appelé L-PRF pour leucocytes-plasma riche en fibrine) est un caillot de fibrine formé en l'absence d'anticoagulant lors du protocole de centrifugation [27]. Il représente aujourd'hui le concentré de choix en odontologie/chirurgie orale. Un seul passage dans la centrifugeuse est nécessaire pour sa préparation (2000 g, 10 min) immédiatement après le prélèvement sanguin [27,28]. Le caillot de PRF se forme au milieu du tube, entre les phases de PPP et de globules rouges *(fig. 1)* [27].



1. Les différentes techniques d'obtention des concentrés plaquettaires.

La fibrine extracellulaire naturellement présente dans le sang a polymérisé pour créer un réseau tridimensionnel de fibres servant de guide à l'angiogenèse et donc à la régénération tissulaire *(fig. 2)*. La matrice de fibrine va libérer progressivement les plaquettes, les leucocytes et les facteurs de croissance. Le taux est maintenu constant pendant environ dix jours [29]. Le PRF est utilisé sous forme de caillot ou de membrane. La méthode a progressivement été préférée à celle du PRP en chirurgie orale pour des raisons évidentes

2. Photographie de trois caillots de PRF obtenus après prélèvements sanguins et centrifugation chez une patiente, au cours d'une intervention.



3. Utilisation de PRF pour le comblement d'une lésion osseuse péri-apicale. a. Lésion osseuse après exérèse kystique sur la 11. b. Mise en place du PRF sur le site. c. Incorporation de PRF sous le lambeau. d. Repositionnement du lambeau gingival sur le PRF.

de simplification du protocole et de la manipulation [14]. Le PRF possède également des propriétés bénéfiques favorisant l'angiogenèse, la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire [14].

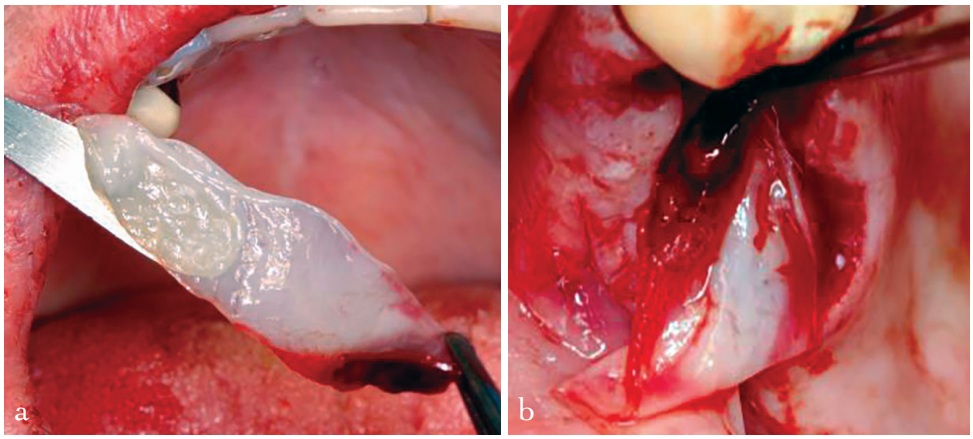
Les contenus du PRF et du PRP sont, de fait, très similaires, et la principale différence entre eux est leur consistance. Leurs indications sont également assez similaires, du comblement alvéolaire post-extractionnel [30] à la régénération osseuse guidée en passant par la gestion des tissus mous [14].

Le PRF est aussi utilisé en chirurgie endodontique pour combler la lésion osseuse péri-apicale *(fig. 3a à d)* à la fin de l'intervention. Chez des patients souffrant de retard de cicatrisation potentiel ou avéré, une membrane peut être appliquée par-dessus la lésion osseuse pour aider à stabiliser le caillot, favoriser le maintien d'un greffon et limiter l'exposition du site chirurgical au milieu buccal. Cette membrane peut être réalisée en PRF en positionnant un des caillots de fibrine obtenus entre deux plaques de verre pour le réduire en un film plus fin *(fig. 4a et b)*. La résistance et les propriétés mécaniques de ces membranes sont toutefois inférieures à celles de membranes résorbables disponibles sur le marché (manque de rigidité, dégradation trop rapide) [31]. En revanche, sous forme de caillot, le PRF a des propriétés mécaniques plus intéressantes et sa résorption est plus lente, de façon similaire à celle d'un caillot sanguin [29].

Depuis le développement du protocole de constitution du PRF, certaines adaptations ont été proposées pour élargir la gamme des PRF disponibles, avec comme principales modifications des changements au niveau de la vitesse et du temps de centrifugation. Si l'échantillon sanguin est centrifugé à très faible vitesse et pendant un laps de temps très court (110 g, 3 min), le caillot de fibrine n'a pas complètement le temps de se former et la phase récupérée au centre du tube devient injectable: on parle de PRF injectable (ou I-PRF) [32]. Si la centrifugation est légèrement plus rapide (500 g, 10 min), le caillot commence à se former. Il est plus petit que celui du PRF conventionnel mais englobe davantage de globules blancs: c'est le A-PRF *(Advanced-PRF)* [32,33]. Enfin, une centrifugation encore plus rapide mais brève (1400 g, 4 min) permet de générer un concentré de facteurs de croissance appelé CGF *(concentrated growth factors)*, qui appartient aussi à la famille des PRF [33].

L'isolation plaquettaire par la technique du buffy coat

La méthode du buffy coat représente davantage une technique de préparation et d'isolation des plaquettes qu'un dérivé en tant que tel *(fig. 1)*. Une première centrifugation à haute vitesse et en présence d'anticoagulant permet l'obtention de trois phases: un culot de globules rouges, une phase intermédiaire contenant les plaquettes et les globules blancs (phase appelée buffy coat) et une phase de



4. Constitution d'une membrane de PRF (a). Recouvrement d'alvéoles post-extractionnelles chez un patient souffrant d'ostéogenèse imparfaite et ayant reçu un traitement par biphosphonates (b).

PPP en haut [21]. Après isolation de la couche intermédiaire, une centrifugation à plus faible vitesse est appliquée pour isoler les plaquettes [21].
Une étape de déleucocytation par filtration peut être entreprise sur le concentré final pour terminer d'éliminer toute trace de globules blancs avant l'utilisation en biomédecine, car le taux de globules blancs résiduels est plus important avec la technique du buffy coat qu'avec celle du PRP par exemple [23]. Grâce à la filtration, ainsi qu'à d'autres mécanismes qui peuvent être mis en place comme l'irradiation, il est aussi possible de s'assurer que le dérivé plaquettaire ne contienne plus d'agent pathogène qui aurait pu le coloniser [34].
Les méthodes de préparation des différents concentrés plaquettaires sont regroupées dans le *tableau 1* et la *figure 1*.

Les lysats plaquettaires (LP)

Il s'agit du produit obtenu à partir des concentrés plaquettaires après destruction de la membrane plasmique des plaquettes qu'ils contiennent. Le contenu du cytoplasme, c'est-à-dire les facteurs de croissance, les molécules de fibrinogène, les cytokines et autres protéines, est libéré et directement accessible. Pour générer du LP, différentes méthodes existent: une supplémentation en thrombine pour initier la dégranulation des thrombocytes, des cycles d'ultrasons ou des congélations-décongélations successives pour lyser les membranes cellulaires [23].
Aucune séparation n'est nécessaire avant l'utilisation du lysat, même si une nouvelle centrifugation (220 g, 10 min) est possible pour éliminer les débris cellulaires [35]. La fibrine, déjà retrouvée dans les concentrés plaquettaires avant la lyse des thrombocytes, voit sa concentration augmenter dans le lysat, car une importante quantité était enfermée dans les cellules.
Peu communément retrouvés en pratique clinique courante, les LP sont en revanche plus largement utilisés en recherche *in vitro* comme supplément de milieu de culture cellulaire [36]. Ils sont de plus en plus préférés aux produits xénogéniques (Sérum de veau fœtal – SVF – par exemple), limitant ainsi la transmission de pathogènes [37]. De multiples types cellulaires comme les cellules stromales mésenchymateuses [38], fibroblastes [39,40], les cellules endothéliales [41], les ostéoblastes [42], les myoblastes [43] ou encore les kératinocytes [44], présentent de hauts degrés de prolifération et de différenciation quand ils sont cultivés dans des milieux enrichis en LP.
In vivo, le recours à la greffe de produits issus des lysats plaquettaires est particulièrement étudié sur des modèles de cicatrisation cutanée [45]. Parfois directement appliqué sur le site à traiter, il peut aussi être associé à des biomatériaux porteurs qui facilitent sa manipulation, prolongent son relargage [46-49] et ouvrent la voie à son utilisation dans d'autres contextes pathologiques (infarctus du myocarde [50,51], maladie de Parkinson [52]…).
Dans le cadre de l'odontologie, la perspective d'une utilisation en parodontite a déjà donné des résultats encourageants sur modèle murin [53,54], puisque des auteurs ont dégagé un effet positif de son implantation, en association notamment avec des ciments de phosphate de calcium. Cliniquement, leur utilisation se cantonne pour l'instant à des études chez l'Homme pour des pathologies inflammatoires chroniques, par exemple sur des plaies cutanées et tissulaires [27,55] ou même des mucosites [56].
Dans ce dernier cas, sept patients ont été traités pour une inflammation gingivale à l'aide d'une formulation mucoadhésive à base de lysat plaquettaire et six d'entre eux ont montré une réponse favorable au traitement. L'intérêt de ces lysats plaquettaires réside dans la disponibilité

immédiate des protéines et facteurs de croissance sur le site où ils sont greffés. Toutefois, leur manipulation reste compliquée car ils sont produits sous forme liquide.
Pour les utiliser plus aisément, leur gélification peut être obtenue de manière similaire aux autres produits cités, aboutissant ainsi à un réseau tridimensionnel de fibrine [57]. Le résultat est semblable au PRF mais avec une plus grande disponibilité des facteurs de croissance. Dans cette structure, les cellules trouveraient un milieu favorisant leur croissance et leur différenciation [58].
Les principales limites des polymères de fibrine restent malgré tout leur faible résistance mécanique et leur haut potentiel de dégradation [59]. La combinaison de LP avec d'autres biomatériaux plus résistants comme les substituts osseux minéralisés (hydroxyapatites, phosphates tri-calciques…) [8,60] permettrait de s'affranchir de cette faible résistance [61-63].

CONCLUSION

Les techniques de préparation des concentrés plaquettaires sont nombreuses [23], de nombreuses institutions ayant conçu leur propre protocole avec un haut niveau d'efficacité et une bonne reproductibilité des résultats [64-66]. Les indications cliniques de chacun n'ont en revanche pas encore été clairement définies, mais la multiplicité des produits disponibles et des « galéniques » qu'ils adoptent offre un éventail de choix très large pour le clinicien. Les conditions d'une utilisation en cabinet dentaire sont la formation aux méthodes de prélèvement sanguin et l'investissement dans une centrifugeuse, indispensable à la préparation des CP.
Il existe aujourd'hui sur le marché la possibilité d'acheter du matériel tout compris (centrifugeuse, tubes et tubulures de prélèvements) spécifiquement dédié à la préparation de CP – notamment de PRF – en pratique libérale. L'avenir de l'utilisation de ces produits bioactifs dérivés du sang réside certainement dans le traitement de diverses pathologies assimilées aux défauts cicatriciels chroniques, car les résultats préliminaires sur les tissus mous sont prometteurs.

Références bibliographiques

1. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res 2004;38(3):182-91.

2. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. Aust Dent J 2009;54 (Suppl 1):S11-26.

3. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94(3):281-93.

4. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol 1984;11(8):494-503.

5. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6(5):278-307.

6. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol 2014;35(1):3-11.

7. Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. Biomatter 2012;2(4):271-7.

8. Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les substituts osseux en odontologie. Partie 2 - Classification. BMC 2019 Oct;4(2):42-7.

9. Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple ILC, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. Periodontol 2000 2015;68(1):182-216.

10. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. Periodontol 2000 1999;19:74-86.

11. Sriaroon P, Ballow M. Immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. Immunol Allergy Clin North Am. 2015;35(4):713-30.

12. Rozga J, Piatek T, Małkowski P. Human albumin: old, new, and emerging applications. Ann Transplant 2013;18:205-17.

13. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. Blood Rev 2013;27(2):77-89.

14. Shah R, M G T, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. Eur J Prosthodont Restor Dent 2017;25(2):64-72.

15. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol 2013;201(6):785-96.

16. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol 2009;27(3):158-67.

17. Ehrbar M, Metters A, Zammaretti P, Hubbell JA, Zisch AH. Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity. J Control Release Off J Control Release Soc 2005;101(1-3):93-109.

18. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev 2008;22(10):1276-312.

19. Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. Cytokine Growth Factor Rev 2014;25(3):273-83.

20. Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. Semin Cell Dev Biol 2014;28:2-11.

21. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. J Cutan Aesthetic Surg 2014;7(4):189-97.

22. Arora S, Kotwal U, Dogra M, Doda V. Growth factor variation in two types of autologous platelet biomaterials: PRP versus PRF. Indian J Hematol Blood Transfus Off J Indian Soc Hematol Blood Transfus 2017;33(2):288-92.

23. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials 2016;76:371-87.

24. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. Immun Ageing A 2013;10(1):23.

25. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg 2004;62(4):489-96.

26. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthetic Dent PPAD 2001;13(6):487-93; quiz 487793.

27. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):e56-60.

28. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):e37-44.

29. Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. Aust Dent J 2012;57(2):207-12.

30. Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard JP, Ammann P. Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. Implant Dent 2013;22(3):295-303.

31. Sam G, Vadakkekuttical RJ, Amol NV. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. J Indian Soc Periodontol 2015;19(1):32-6.

32. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. Platelets 2018;29(2):171-84.

33. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). Int J Implant Dent 2016;2(1):19.

34. Viau S, Chabrand L, Eap S, Lorant J, Rouger K, Goudaliez F et al. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. PloS One 2017;12(8):e0181406.

35. Costa-Almeida R, Franco AR, Pesqueira T, Oliveira MB, Babo PS, Leonor IB et al. The effects of platelet lysate patches on the activity of tendon-derived cells. Acta Biomater 2018;68:29-40.

36. Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S, Majumdar AS, Seetharam RN. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biotechnol Lett 2012;34(7):1367-74.

37. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2014;16(2):170-80.

38. Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A et al. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplant 2007;40(8):785-91.

39. Naveau A, Lataillade JJ, Fournier BP, Couty L, Prat M, Ferre FC et al. Phenotypic study of human gingival fibroblasts in a medium enriched with platelet lysate. J Periodontol 2011;82(4):632-41.

40. Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. J Cell Mol Med 2009;13(8B):2030-8.

41. Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. J Tissue Eng Regen Med 2017;12(2):557-64.

42. Ruggiu A, Ulivi V, Sanguineti F, Cancedda R, Descalzi F. The effect of Platelet Lysate on osteoblast proliferation associated with a transient increase of the inflammatory response in bone regeneration. Biomaterials 2013;34(37):9318-30.

43. Ranzato E, Balbo V, Boccafoschi F, Mazzucco L, Burlando B. Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate. Cell Biol Int 2009;33(9):911-7.

44. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. Br J Dermatol 2008;159(3):537-45.

45. Sergeeva NS, Shanskii YD, Sviridova IK, Karalkin PA, Kirsanova VA, Akhmedova SA et al. Analysis of reparative activity of platelet lysate: effect on cell monolayer recovery in vitro and skin wound healing in vivo. Bull Exp Biol Med 2016;162(1):138-45.

46. Ito R, Morimoto N, Pham LH, Taira T, Kawai K, Suzuki S. Efficacy of the controlled release of concentrated platelet lysate from a collagen/gelatin scaffold for dermis-like tissue regeneration. Tissue Eng Part A 2013;19(11-12):1398-405.

47. Tenci M, Rossi S, Bonferoni MC, Sandri G, Boselli C, Di Lorenzo A et al. Particulate systems based on pectin/chitosan association for the delivery of manuka honey components and platelet lysate in chronic skin ulcers. Int J Pharm 2016;509(1-2): 59-70.

48. Rossi S, Faccendini A, Bonferoni MC, Ferrari F, Sandri G, Del Fante C et al. "Sponge-like" dressings based on biopolymers for the delivery of platelet lysate to skin chronic wounds. Int J Pharm 2013;440(2):207-15.

49. Ozturk S, Sahin C, Tas AC, Muftuoglu T, Karagoz H. Effect of allogeneic platelet lysate and cyanoacrylate tissue glue on the fibrovascularization of the porous polyethylene implant. J Craniofac Surg 2016;27(1):253-7.

50. Zhang Y, Ying G, Ren C, Jizhang Y, Brogan D, Liu Z et al. Administration of human platelet-rich plasma reduces infarction volume and improves motor function in adult rats with focal ischemic stroke. Brain Res 2015;1594:267-73.

51. Yamauchi T, Saito H, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S. Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for stroke therapy. Transl Stroke Res 2014;5(6):701-10.

52. Chou ML, Wu J-W, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Renn TY et al. Tailor-made purified human platelet lysate concentrated in neurotrophins for treatment of Parkinson's disease. Biomaterials 2017;142:77-89.

53. Babo PS, Cai X, Plachokova AS, Reis RL, Jansen J, Gomes ME et al. Evaluation of a platelet lysate bilayered system for periodontal

regeneration in a rat intrabony three-wall periodontal defect. J Tissue Eng Regen Med 2017;12(2), e1277-88.

54. Babo PS, Cai X, Plachokova AS, Reis RL, Jansen JA, Gomes ME et al. The role of a platelet lysate-based compartmentalized system as a carrier of cells and platelet-origin cytokines for periodontal tissue regeneration. Tissue Eng Part A 2016;22(19–20):1164-75.

55. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. PloS One 2014;9(8):e104662.

56. Del Fante C, Perotti C, Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F et al. Platelet lysate mucohadesive formulation to treat oral mucositis in graft versus host disease patients: a new therapeutic approach. AAPS PharmSciTech 2011;12(3):893-9.

57. Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326.

58. Walenda G, Hemeda H, Schneider RK, Merkel R, Hoffmann B, Wagner W. Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. Tissue Eng Part C Methods 2012;18(12):924-34.

59. Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, Grätz KW, Gnägi D, Müller R et al. Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc 2004;22(2):376-81.

60. Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les substituts osseux en odontologie. Partie 1 - Structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges. BMC 2018;3(1):46-51.

61. Chakar C, Soffer E, Cohen N, Petite H, Naaman N, Anagnostou F. Vertical bone regeneration with deproteinised bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in the rabbit calvarium: effect of autologous platelet lysate. J Mater Sci Mater Med 2015;26(1):5339.

62. Chakar C, Naaman N, Soffer E, Cohen N, El Osta N, Petite H et al. Bone formation with deproteinized bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in the presence of autologous platelet lysate: comparative investigation in rabbit. Int J Biomater 2014;2014:367265.

63. Babo PS, Carvalho PP, Santo VE, Faria S, Gomes ME, Reis RL. Assessment of bone healing ability of calcium phosphate cements loaded with platelet lysate in rat calvarial defects. J Biomater Appl 2016;31(5):637-49.

64. Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. Transplantation 2004;77(3):350–5.

65. Zurita M, Otero L, Aguayo C, Bonilla C, Ferreira E, Parajón A et al. Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. Cytotherapy 2010;12(4):522-37.

66. Michallet M, Pitard A. Transfusion de plaquettes : produits, indications. Haute Autorité de Santé; 2015. Report No.: 978-2-11-139104–8.

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.

Correspondance : thibault.canceill@univ-tlse3.fr

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les substituts osseux en odontologie Partie 2 - Classification. Biomatériaux cliniques. 2019;4:46-51.
2. Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby, V. Les substituts osseux en odontologie. Partie 1 - Structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges. Biomatériaux cliniques. 2018;3:2-7.
3. Jordana F, Le Visage C, Weiss P. Substituts osseux. Médecine/sciences. 2017;33(1):60-5.
4. Vicens F. Évaluation de la voie d'urgence intra-osseuse en médecine d'urgence pré-hospitalière. 2014.
5. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. Chem Rev. 2008;108(11):4742-53.
6. Wang X, Nyman JS, Dong X, Leng H, Reyes M. Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering. Synth Lect Tissue Eng. 2010;2(1):1-225.
7. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. BioMed Res Int. 2015;2015:1-17.
8. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3:S131-9.
9. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. Histol Histopathol. 2009;(24):909-69.
10. Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. Médecine/sciences. 2001;17(12):1252-9.
11. Krane SM. Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. J Exp Med. 2005;201(6):841-3.
12. Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. Am J Physiol-Cell Physiol. 1995;268(5):C1090-103.
13. Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. Dev Dyn. 2006;235(1):176-90.
14. Wagoner Johnson AJ, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. Acta Biomater. 2011;7(1):16-30.
15. Odin G. Modélisation numérique de l'os mandibulaire appliquée à l'implantologie dentaire et maxillo-faciale. 2008.
16. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. Front Oral Biol. 2016;18:9-16.
17. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. Physiology. 2016;31(3):233-45.
18. Rieger R. Modélisation mécano-biologique par éléments finis de l'os trabéculaire: des activités cellulaires au remodelage osseux. 2011.
19. Vernejoul M, Marie P. Cellules osseuses et remodelage osseux. Médecine/sciences. 1993;9(11):1192.
20. Gómez-Benito MJ, García-Aznar JM, Kuiper JH, Doblaré M. Influence of fracture gap size on the pattern of long bone healing: a computational study. J Theor Biol. 2005;235(1):105-19.
21. Schmitz JP, Hollinger JO. The Critical Size Defect as an Experimental Model for

Craniomandibulofacial Nonunions. Clin Orthop. 1986;205:299-308.
22. Saadeh PB, Khosla RK, Mehrara BJ, Steinbrech DS, McCormick SA, DeVore DP, et al. Repair of a Critical Size Defect in the Rat Mandible Using Allogenic Type I Collagen. J Craniofac Surg. 2001;12(6):573-9.
23. Sun Z, Kennedy KS, Tee BC, Damron JB, Allen MJ. Establishing a Critical-Size Mandibular Defect Model in Growing Pigs: Characterization of Spontaneous Healing. J Oral Maxillofac Surg. 2014;72(9):1852-68.
24. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. Bone Jt J. 2016;98:6-9.
25. Kamal M, Gremse F, Rosenhain S, Bartella AK, Hölzle F, Kessler P, et al. Comparison of Bone Grafts From Various Donor Sites in Human Bone Specimens. J Craniofac Surg. 2018;29(6):1661-5.
26. Sindel A, Dereci Ö, Toru HS, Tozoğlu S. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. J Craniofac Surg. 2017;28(7):1865-8.
27. McAuliffe JA. Bone graft substitutes. J Hand Ther. 2003;16(2):180-7.
28. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. Biomaterials. 2001;22(12):1599-606.
29. Bertazzo S, Bertran CA. Morphological and Dimensional Characteristics of Bone Mineral Crystals. Key Eng Mat. 2006;309-311:3-6.
30. Mangano C, Sinjari B, Shibli JA, Mangano F, Hamisch S, Piattelli A, et al. A Human Clinical, Histological, Histomorphometrical, and Radiographical Study on Biphasic HA-Beta-TCP 30/70 in Maxillary Sinus Augmentation: Biphasic HA-Beta-TCP 30/70 in Sinus Augmentation. Clin Implant Dent Relat Res. 2015;17(3):610-8.
31. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Acta Biomater. 2013;9(1):4457-86.
32. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science. 1999;284(5411):143-7.
33. Le Blanc K, Pittenger MF. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. Cytotherapy. 2005;7(1):36-45.
34. Rammal H, Harmouch C, Lataillade J-J, Laurent-Maquin D, Labrude P, Menu P, et al. Stem Cells: A Promising Source for Vascular Regenerative Medicine. Stem Cells Dev. 2014;23(24):2931-49.
35. Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. Cell Reprogramming. 2017;19(4):217-24.
36. Harmouch C, El-Omar R, Labrude P, Decot V, Menu P, Kerdjoudj H. Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):273-80.
37. El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(5):523-44.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. Tissue Eng. 2001;7(2):211-28.
39. Bari CD, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. Arthritis Rheum. 2001;44(8):1928-42.
40. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. Arthritis Rheum. 2004;50(3):817-27.
41. Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, et al. Isolation,

Characterization, and Transduction of Endometrial Decidual Tissue Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Menstrual Blood. BioMed Res Int. 2013;2013:1-14.
42. Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. Cytotherapy. 2018;20(4):479-98.
43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.
44. Huang GT-J, 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.
45. Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui P, Irastorza I, Luzuriaga J, Uribe-Etxebarria V, Unda F, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. Front Physiol. 2015;6:289.
46. Bojic S, Volarevic V, Ljujic B, Stojkovic M. Dental stem cells – characteristics and potential. Histol Histopathol. 2014;29(6):699-706.
47. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. Front Physiol. 2016;7:512.
48. Nuti N, Corallo C, Chan BMF, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. Stem Cell Rev Rep. 2016;12(5):511-23.
49. d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. Stem Cell Rev. 2008;4(1):21-6.
50. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(25):13625-30.
51. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. Cell Tissue Res. 2013;353(1):65-78.
52. Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. Cell Tissue Res. 2006;324(2):225-36.
53. Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, et al. Explant Culture: An Efficient Method to Isolate Adipose-Derived Stromal Cells for Tissue Engineering: isolating ASCs by explant culture. Artif Organs. 2011;35(2):105-12.
54. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M, Guo Y-J, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. Stem Cells. 2004;22(7):1330-7.
55. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. Stem Cells. 2003;21(1):50-60.
56. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftsoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Assessment of the Impact of Two Different Isolation Methods on the Osteo/Odontogenic Differentiation Potential of Human Dental Stem Cells Derived from Deciduous Teeth. Calcif Tissue Int. 2011;88(2):130-41.
57. Hendijani F. Explant culture: an advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. Cell Prolif. 2017;50(2).
58. Derringer KA, Linden RWA. Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet derived growth factor and transforming growth factor beta released in human dental pulp following orthodontic force. Arch Oral Biol. 2004;49(8):631-41.
59. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: An

Overview of Human Dental Tissue-Derived MSCs. Stem Cells. 2015;33(3):627-38.
60. Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas Ligand Regulates the Immunomodulatory Properties of Dental Pulp Stem Cells. J Dent Res. 2012;91(10):948-54.
61. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp: Transplantation. 2005;80(6):836-42.
62. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. J Cell Physiol. 2009;219(3):667-76.
63. Grottkau BE, Purudappa PP, Lin Y. Multilineage Differentiation of Dental Pulp Stem Cells from Green Fluorescent Protein Transgenic Mice. Int J Oral Sci. 2010;2(1):21-7.
64. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, et al. Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. BMC Dev Biol. 2015;15(1):14.
65. Zhang W, Shi S, Jansen JA. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. 2006;12(10):2813-23.
66. Moseti D, Regassa A, Kim W-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. Int J Mol Sci. 2016;17(1):124.
67. Nemeth CL, Janebodin K, Yuan AE, Dennis JE, Reyes M, Kim D-H. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Using Nanopatterned PEG-GelMA-HA Hydrogels. Tissue Eng Part A. 2014;20(21-22):2817-29.
68. Huang GT-J, Shagramanova K, Chan SW. Formation of Odontoblast-Like Cells from Cultured Human Dental Pulp Cells on Dentin In Vitro. J Endod. 2006;32(11):1066-73.
69. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Metab. 2015;33(4):371-82.
70. 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.
71. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for Dental Pulp Tissue Engineering. Adv Dent Res. 2011;23(3):333-9.
72. Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(l-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo. Acta Biomater. 2010;6(10):3856-63.
73. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2010;93(1):247-57.
74. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. Dent Mater. 2013;29(1):97-102.
75. Park S-J, Li Z, Hwang I-N, Huh KM, Min K-S. Glycol Chitin–based Thermoresponsive Hydrogel Scaffold Supplemented with Enamel Matrix Derivative Promotes Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. J Endod. 2013;39(8):1001-7.
76. Ferroni L, Gardin C, Sivolella S, Brunello G, Berengo M, Piattelli A, et al. A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-Like Tissue. Int J Mol Sci. 2015;16(3):4666-81.
77. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C, et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. Stem Cell Res. 2014;12(3):778-90.
78. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, et al. Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. Shi S, éditeur. PLoS ONE. 2013;8(8):e71104.
79. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, et al. Angiogenic Potential of Human Dental Pulp Stromal (STEM) Cells. Int J Immunopathol Pharmacol.

2009;22(3):699-706.
80. Lambrichts I, Driesen RB, Dillen Y, Gervois P, Ratajczak J, Vangansewinkel T, et al. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. J Endod. 2017;43(9):S12-6.
81. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. Stem Cells. 2008;26(3):638-45.
82. Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, et al. Dental Pulp-Derived CD31/CD146 Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. Tissue Eng Part A. 2011;17(9-10):1303-11.
83. Sui B, Chen C, Kou X, Li B, Xuan K, Shi S, et al. Pulp Stem Cell–Mediated Functional Pulp Regeneration. J Dent Res. 2019;98(1):27-35.
84. Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, Silva MCP, Lizier NF, Maranduba CMC, et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. Cell Prolif. 2009;42(5):587-94.
85. Gomes JÁP, Geraldes Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, et al. Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells. Investig Opthalmology Vis Sci. 2010;51(3):1408.
86. Ferro F, Spelat R, D'Aurizio F, Puppato E, Pandolfi M, Beltrami AP, et al. Dental Pulp Stem Cells Differentiation Reveals New Insights in Oct4A Dynamics. Cooney AJ, éditeur. PLoS ONE. 2012;7(7):e41774.
87. Song B, Jiang W, Alraies A, Liu Q, Gudla V, Oni J, et al. Bladder Smooth Muscle Cells Differentiation from Dental Pulp Stem Cells: Future Potential for Bladder Tissue Engineering. Stem Cells Int. 2016;2016(6979368):11.
88. Askari N, Yaghoobi MM, Shamsara M, Esmaeili-Mahani S. Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Oligodendrocyte Progenitors Using the Expression of Olig2 Transcription Factor. Cells Tissues Organs. 2015;200(2):93-103.
89. Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, et al. Neurogenic Maturation of Human Dental Pulp Stem Cells Following Neurosphere Generation Induces Morphological and Electrophysiological Characteristics of Functional Neurons. Stem Cells Dev. 2015;24(3):296-311.
90. Martens W, Sanen K, Georgiou M, Struys T, Bronckaers A, Ameloot M, et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. FASEB J. 2014;28(4):1634-43.
91. Chun SY, Soker S, Jang Y-J, Kwon TG, Yoo ES. Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic Neuron-like Cells in Vitro. J Korean Med Sci. 2016;31(2):171.
92. Gnanasegaran N, Govindasamy V, Abu Kasim NH. Differentiation of stem cells derived from carious teeth into dopaminergic-like cells. Int Endod J. 2016;49(10):937-49.
93. Urraca N, Memon R, El-Iyachi I, Goorha S, Valdez C, Tran QT, et al. Characterization of neurons from immortalized dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. Stem Cell Res. 2015;15(3):722-30.
94. Jung J, Kim J-W, Moon H-J, Hong JY, Hyun JK. Characterization of Neurogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells Cultured in Xeno/Serum-Free Condition: In Vitro and In Vivo Assessment. Stem Cells Int. 2016;2016:1-12.
95. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. Stem Cells. 2008;26(7):1787-95.
96. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. Stem

Cells Dev. 2010;19(9):1375-83.
97. Király M, Kádár K, Horváthy DB, Nardai P, Rácz GZ, Lacza Z, et al. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. Neurochem Int. 2011;59(3):371-81.
98. Yalvaç ME, Yarat A, Mercan D, Rizvanov AA, Palotás A, Şahin F. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. Brain Behav Immun. 2013;32:122-30.
99. Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, Niapour A, Bahramian H, Nasr-Esfahani MH, et al. Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. Stem Cells Dev. 2012;21(10):1794-802.
100. de Almeida FM, Marques SA, Ramalho B dos S, Rodrigues RF, Cadilhe DV, Furtado D, et al. Human Dental Pulp Cells: A New Source of Cell Therapy in a Mouse Model of Compressive Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 2011;28(9):1939-49.
101. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Nathan KRG, Ab. Aziz ZAC, Abdullah M, et al. Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Islet-like Aggregates. J Dent Res. 2011;90(5):646-52.
102. Ishkitiev N, Yaegaki K, Kozhuharova A, Tanaka T, Okada M, Mitev V, et al. Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117+ stem cells. Regen Med. 2013;8(5):597-612.
103. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, et al. High-purity Hepatic Lineage Differentiated from Dental Pulp Stem Cells in Serum-free Medium. J Endod. 2012;38(4):475-80.
104. Chen YK, Huang AHC, Chan AWS, Lin LM. Human dental pulp stem cells derived from cryopreserved dental pulp tissues of vital extracted teeth with disease demonstrate hepatic-like differentiation: Hepatic-like differentiation of cryopreserved DPSCs. J Tissue Eng Regen Med. 2016;10(6):475-85.
105. Cha Y, Jeon M, Lee H-S, Kim S, Kim S-O, Lee J-H, et al. Effects of In Vitro Osteogenic Induction on In Vivo Tissue Regeneration by Dental Pulp and Periodontal Ligament Stem Cells. J Endod. 2015;41(9):1462-8.
106. Yamada Y, Sugito T, Nagasaka T. A Feasibility of Useful Cell-Based Therapy by Bone Regeneration with Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, or Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology. 2010;16(6):1891-900.
107. Chamieh F, Collignon AM, Coyac B, Lesieur J, Ribes S, Sadoine J, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. Sci Rep. 2016;6(38814).
108. Ling LE, Feng L, Liu H, Wang D, Shi Z, Wang J, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. J Biomed Mater Res A. 2015;103(5):1732-45.
109. Wongsupa N, Nuntanaranont T, Kamolmattayakul S, Thuaksuban N. Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(ε-caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. J Mater Sci Mater Med. 2017;28(5):77.
110. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, et al. Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications. STEM CELLS Transl Med. 2013;2(4):316-24.
111. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In Vitro Bone Production Using Stem Cells Derived From Human Dental Pulp: J Craniofac Surg. 2006;17(3):511-5.

112. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. J Cell Physiol. 2006;208(2):319-25.
113. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. PLOS ONE. 2012;7(12):15.
114. Diomede F, Rajan TS, Gatta V, D'Aurora M, Merciaro I, Marchisio M, et al. Stemness Maintenance Properties in Human Oral Stem Cells after Long-Term Passage. Stem Cells Int. 2017;2017:1-14.
115. Stanko P, Kaiserova K, Altanerova 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. 2014;158(3):373-7.
116. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. Odontology. 2013;101(2):121-32.
117. Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. J Tissue Eng Regen Med. 2010;4(1):73-81.
118. Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, et al. 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):876-82.
119. Kumar A, Rattan V, Jha V, Bhattacharyya S. Secretome proteins regulate comparative osteogenic and adipogenic potential in bone marrow and dental stem cells. Biochimie. 2018;155:129-39.
120. Song M, Lee J-H, Bae J, Bu Y, Kim E-C. Human Dental Pulp Stem Cells are more Effective than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury. Cell Transplant. 2017;26(6):1001-16.
121. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Umemura-Kubota E, Baba S. Diagnostic Cytokines and Comparative Analysis Secreted from Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells for Functional Cell-Based Therapy. Int J Mol Sci. 2019;20(23):5900.
122. Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. Biol Cell. 2007;99(8):465-74.
123. Karaöz E, Demircan PC, Sağlam Ö, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Histochem Cell Biol. 2011;136(4):455-73.
124. Abbas OL, Gönen ZB, Özatik FY. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Dental Pulp as Sources of Cell Therapy for Zone of Stasis Burns. J Invest Surg. 2019;32(6):477-490.
125. Hara K, Yamada Y, Nakamura S, Umemura E, Ito K, Ueda M. Potential Characteristics of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Compared with Bone Marrow–derived Mesenchymal Stem Cells for Mineralized Tissue-forming Cell Biology. J Endod. 2011;37(12):1647-52.
126. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. Int J Polym Sci. 2011;2011:1-19.
127. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. Nature. 2004;428(6982):487-92.
128. Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. Nat Rev Rheumatol. 2009;5(12):685-97.
129. Pecci-Lloret MP, Vera-Sánchez M, Aznar-Cervantes S, García-Bernal D, Sánchez RO,

Pecci-Lloret MR, et al. Analysis of the Adherence of Dental Pulp Stem Cells on Two-Dimensional and Three-Dimensional Silk Fibroin-Based Biomaterials: J Craniofac Surg. 2017;28(4):939-43.
130. Bhuptani RS, Patravale VB. Porous microscaffolds for 3D culture of dental pulp mesenchymal stem cells. Int J Pharm. 2016;515(1-2):555-64.
131. Riccio M, Resca E, Maraldi T, Pisciotta A, Ferrari A, Bruzzesi G, et al. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. Eur J Histochem. 2010;54(4):46.
132. Jones TD, Kefi A, Sun S, Cho M, Alapati SB. An Optimized Injectable Hydrogel Scaffold Supports Human Dental Pulp Stem Cell Viability and Spreading. Adv Med. 2016;2016:1-8.
133. Tsukamoto J, Naruse K, Nagai Y, Kan S, Nakamura N, Hata M, et al. Efficacy of a Self-Assembling Peptide Hydrogel, SPG-178-Gel, for Bone Regeneration and Three-Dimensional Osteogenic Induction of Dental Pulp Stem Cells. Tissue Eng Part A. 2017;23(23-24):1394-402.
134. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CA de S. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. Braz Oral Res. 2016;30(1):e54.
135. Ghasemi Hamidabadi H, Rezvani Z, Nazm Bojnordi M, Shirinzadeh H, Seifalian AM, Joghataei MT, et al. Chitosan-Intercalated Montmorillonite/Poly(vinyl alcohol) Nanofibers as a Platform to Guide Neuronlike Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9(13):11392-404.
136. de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, et al. Reconstruction of Large Cranial Defects in Nonimmunosuppressed Experimental Design With Human Dental Pulp Stem Cells: J Craniofac Surg. 2008;19(1):204-10.
137. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater. 2009;18:75-83.
138. Maraldi T, Riccio M, Pisciotta A, Zavatti M, Carnevale G, Beretti F, et al. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. Stem Cell Res Ther. 2013;4(3):53.
139. Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, et al. Success of maxillary alveolar defect repair in rat using osteoblasts differentiated human deciduous dental pulp stem cells. J Oral Maxillofac Surg. 2016;74(4):829.e1-9.
140. Monti M, Graziano A, Rizzo S, Perotti C, Del Fante C, d'Aquino R, et al. In Vitro and In Vivo Differentiation of Progenitor Stem Cells Obtained After Mechanical Digestion of Human Dental Pulp: human dental pulp stem cells differentiation. J Cell Physiol. 2017;232(3):548-55.
141. Behnia A. Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. World J Stem Cells. 2014;6(4):505.
142. Chen B, Sun H-H, Wang H-G, Kong H, Chen F-M, Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. Biomaterials. 2012;33(20):5023-35.
143. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(10):5807-12.
144. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. Cell Biol Int. 2007;31(10):1191-7.
145. Zhang W, Walboomers XF, van Osch GJVM, van den Dolder J, Jansen JA. Hard Tissue Formation in a Porous HA/TCP Ceramic Scaffold Loaded with Stromal Cells Derived from Dental Pulp and Bone Marrow. Tissue Eng Part A. 2008;14(2):285-94.

146. Kraft DCE, Bindslev DA, Melsen B, Abdallah BM, Kassem M, Klein-Nulend J. Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity. Eur J Oral Sci. 2010;118(1):29-38.
147. Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: Micro-computed tomography and histomorphometric analysis. Arch Oral Biol. 2015;60(12):1729-35.
148. Cao Y, Liu Z, Xie Y, Hu J, Wang H, Fan Z, et al. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):249.
149. Qian J, Jiayuan W, Wenkai J, Peina W, Ansheng Z, Shukai S, et al. Basic fibroblastic growth factor affects the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in a treatment-dependent manner. Int Endod J. 2015;48(7):690-700.
150. Kang K-J, Lee MS, Moon C-W, Lee J-H, Yang HS, Jang Y-J. In Vitro and In Vivo Dentinogenic Efficacy of Human Dental Pulp-Derived Cells Induced by Demineralized Dentin Matrix and HA-TCP. Stem Cells Int. 2017;2017:1-15.
151. Seo B, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuiri T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Dis. 2008;14(5):428-34.
152. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, et al. Donor Age-Related Biological Properties of Human Dental Pulp Stem Cells Change in Nanostructured Scaffolds. PLOS ONE. 2012;7(11):12.
153. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. Biochem Biophys Res Commun. juin 2008;371(1):90-3.
154. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. Cell Biol Int. 2012;36(10):927-36.
155. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, et al. Engineering Bone Formation from Human Dental Pulp- and Periodontal Ligament-Derived Cells. Ann Biomed Eng. 2011;39(1):26-34.
156. Petridis X, Diamanti E, Trigas GCh, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. J Cranio-Maxillofac Surg. 2015;43(4):483-90.
157. Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Gervois P, Wolfs E, Lambrichts I. The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an *In Vivo* Model of Dental Pulp Regeneration. Stem Cells Int. 2017;2017:1-14.
158. Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. Exp Cell Res. 2012;318(5):453-63.
159. Annibali S, Cicconetti A, Cristalli MP, Giordano G, Trisi P, Pilloni A, et al. A Comparative Morphometric Analysis of Biodegradable Scaffolds as Carriers for Dental Pulp and Periosteal Stem Cells in a Model of Bone Regeneration: J Craniofac Surg. 2013;24(3):866-71.
160. Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, Cicconetti A, Cristalli MP, Quaranta R, et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary data: Micro-Ct/Pet Study Of Bone Regeneration in Critical Size Defect. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014;102(4):815-25.
161. Kuo T, Lee S-Y, Wu H-D, Poma M, Wu Y-W, Yang J-C. An in vivo swine study for xeno-grafts of calcium sulfate-based bone grafts with human dental pulp stem cells (hDPSCs). Mater Sci Eng C. 2015;50:19-23.

162. Li Y, Zhao S, Nan X, Wei H, Shi J, Li A, et al. Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):141.
163. Kim S, Song JS, Jeon M, Shin DM, Kim S-O, Lee JH. Ectopic Hard Tissue Formation by Odonto/Osteogenically In Vitro Differentiated Human Deciduous Teeth Pulp Stem Cells. Calcif Tissue Int. 2015;97(1):80-9.
164. Jeon M, Song JS, Choi B-J, Choi H-J, Shin D-M, Jung H-S, et al. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. Arch Oral Biol. 2014;59(10):1013-23.
165. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, Laino G, Piattelli A, Pacifici M, et al. Concave Pit-Containing Scaffold Surfaces Improve Stem Cell-Derived Osteoblast Performance and Lead to Significant Bone Tissue Formation. Najbauer J, éditeur. PLoS ONE. 2007;2(6):e496.
166. Graziano A, D'Aquino R, Laino G, Proto A, Giuliano MT, Pirozzi G, et al. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo: Germ dental pulp stem cells. Cell Prolif. 2008;41(1):1-11.
167. Xavier Acasigua G, Bernardi L, Braghirolli D, Filho M, Pranke P, Medeiros Fossati A. Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2014;9(4):330-7.
168. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ. 2007;14(6):1162-71.
169. Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. Arch Histol Cytol. 2009;72(1)51-64.
170. Riccio M, Maraldi T, Pisciotta A, La Sala GB, Ferrari A, Bruzzesi G, et al. Fibroin Scaffold Repairs Critical-Size Bone Defects *In Vivo* Supported by Human Amniotic Fluid and Dental Pulp Stem Cells. Tissue Eng Part A. 2012;18(9-10):1006-13.
171. Jang JY, Park SH, Park JH, Lee BK, Yun J-H, Lee B, et al. In Vivo Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Embedded in an Injectable In Vivo-Forming Hydrogel. Macromol Biosci. 2016;16(8):1158-69.
172. El-Gendy R, Yang XB, Newby PJ, Boccaccini AR, Kirkham J. Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stromal Cells on 45S5 Bioglass ® Based Scaffolds *In Vitro* and *In Vivo*. Tissue Eng Part A. 2013;19(5-6):707-15.
173. Wang X, Sha X-J, Li G-H, Yang F-S, Ji K, Wen L-Y, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Arch Oral Biol. 2012;57(9):1231-40.
174. Niu L, Sun J, Li Q, Jiao K, Shen L, Wu D, et al. Intrafibrillar-silicified collagen scaffolds enhance the osteogenic capacity of human dental pulp stem cells. J Dent. 2014;42(7):839-49.
175. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, et al. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. J Dent Res. 2016;95(2):206-14.
176. Roether JA, Gough JE, Occaccini ARB, Nch LLH. Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. :8.
177. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. J Mater Sci. 2009;44(9):2343-87.
178. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. Acta Biomater. 2012;8(9):3191-200.
179. Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55(12):1531-46.
180. Kruger TE, Miller AH, Wang J. Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated

Bone Regeneration. Sci World J. 2013;2013:1-6.
181. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials. 2003;24(24):4337-51.
182. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Arch Oral Biol. 2007;52(1):64-73.
183. Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. Biomaterials. 2010;31(3):467-80.
184. Hesse E, Hefferan TE, Tarara JE, Haasper C, Meller R, Krettek C, et al. Collagen type I hydrogel allows migration, proliferation, and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. J Biomed Mater Res A. 2010;94(2):442-449.
185. Zheng W-D, Ming J-J, Chang WL. The impact of collagen sponge composite bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in inducing interbody fusion. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(18):5822-7.
186. Dong Y, Chen X, Wang M, Hong Y. Construction of Artificial Laminae of the Vertebral Arch Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted in Collagen Sponge: Spine. 2012;37(8):648-53.
187. George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. Biotechnol Bioeng. 2006;95(3):404-11.
188. Watanabe J, Yamada M, Niibe K, Zhang M, Kondo T, Ishibashi M, et al. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with N-acetyl-L-cysteine enhances bone regeneration via reinforced resistance to oxidative stress. Biomaterials. 2018;185:25-38.
189. Yang W, Dong Y, Hong Y, Guang Q, Chen X. Evaluation of Anterior Vertebral Interbody Fusion Using Osteogenic Mesenchymal Stem Cells Transplanted in Collagen Sponge: Clin Spine Surg. 2016;29(4):E201-7.
190. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials. 2000;21(23):2347-59.
191. Michel J, Penna M, Kochen J, Cheung H. Recent Advances in Hydroxyapatite Scaffolds Containing Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. 2015;2015:1-13.
192. Trivedi S, Srivastava K, Saluja TS, Shyam H, Kumar S, Singh A, et al. Hydroxyapatite–collagen augments osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. Odontology. 2020;108(2):251-9.
193. Laydi F, Rahouadj R, Cauchois G, Stoltz J-F, de Isla N. Hydroxyapatite incorporated into collagen gels for mesenchymal stem cell culture. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):311-5.
194. Antebi B, Cheng X, Harris JN, Gower LB, Chen X-D, Ling J. Biomimetic Collagen–Hydroxyapatite Composite Fabricated via a Novel Perfusion-Flow Mineralization Technique. Tissue Eng Part C Methods. 2013;19(7):487-96.
195. Ning L, Malmstrom H, Ren Y-F. Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration. J Oral Implantol. 2015;41(1):45-9.
196. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. Biomaterials. 1993;14(2):97-106.
197. Scabbia A, Trombelli L. A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (BiostiteR) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-OssR) in the treatment of deep intra-osseous defects. J Clin Periodontol. 2004;31(5):348-55.
198. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2011;7(7):2769-81.

199. Yang X, Li Y, He W, Huang Q, Zhang R, Feng Q. Hydroxyapatite/collagen coating on PLGA electrospun fibers for osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells: Hydroxyapatite/collagen coating on PLGA electrospun fibers. J Biomed Mater Res A. 2018;106(11):2863-70.
200. Liu W, Dan X, Wang T, Lu WW, Pan H. A Bone–Implant Interaction Mouse Model for Evaluating Molecular Mechanism of Biomaterials/Bone Interaction. Tissue Eng Part C Methods. 2016;22(11):1018-27.
201. Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. Stem Cells. 2011;29(6):981-91.
202. Weszl M, Skaliczki G, Cselenyák A, Kiss L, Major T, Schandl K, et al. Freeze-dried human serum albumin improves the adherence and proliferation of mesenchymal stem cells on mineralized human bone allografts: adherence and proliferation of MSCs. J Orthop Res. 2012;30(3):489-96.
203. Wang T, Yang X, Qi X, Jiang C. Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly (ε-caprolactone)/ hydroxyapatite/collagen scaffolds. J Transl Med. 2015;13(1):152.
204. Wang M, Cheng X, Zhu W, Holmes B, Keidar M, Zhang LG. Design of Biomimetic and Bioactive Cold Plasma-Modified Nanostructured Scaffolds for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng Part A. 2014;20(5-6):1060-71.
205. Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swasdison S, Kasugai S. Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin–hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold for tissue engineering: Biocompatibility evaluation with human PDL fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells. J Biomater Appl. 2012;27(1):47-54.
206. Barbani N, Guerra GD, Cristallini C, Urciuoli P, Avvisati R, Sala A, et al. Hydroxyapatite/gelatin/gellan sponges as nanocomposite scaffolds for bone reconstruction. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(1):51-61.
207. Kazimierczak P, Benko A, Nocun M, Przekora A. Novel chitosan/agarose/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: comprehensive evaluation of biocompatibility and osteoinductivity with the use of osteoblasts and mesenchymal stem cells. Int J Nanomedicine. 2019;14:6615-30.
208. Chen J, Yu Q, Zhang G, Yang S, Wu J, Zhang Q. Preparation and biocompatibility of nanohybrid scaffolds by in situ homogeneous formation of nano hydroxyapatite from biopolymer polyelectrolyte complex for bone repair applications. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012;93:100-7.
209. Kim B-S, Kim JS, Chung YS, Sin Y-W, Ryu K-H, Lee J, et al. Growth and osteogenic differentiation of alveolar human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite fabric. J Biomed Mater Res A. 2013;101(6):1550-8.
210. Wang F, Zhang Y-C, Zhou H, Guo Y-C, Su X-X. Evaluation of in vitro and in vivo osteogenic differentiation of nano-hydroxyapatite/chitosan/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds with human umbilical cord mesenchymal stem cells: Evaluation of in vitro and in vivo Osteogenic Differentiation. J Biomed Mater Res A. 2014;102(3):760-8.
211. Ambre AH, Katti DR, Katti KS. Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymer scaffolds: Stem Cell Differentiation and Mineralized ECM Formation. J Biomed Mater Res A. 2013;101A(9):2644-60.
212. Bhumiratana S, Grayson WL, Castaneda A, Rockwood DN, Gil ES, Kaplan DL, et al. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. Biomaterials. 2011;32(11):2812-20.
213. Xu S, Xu S, Zhou P, Cheng X, Xie Y, Liang C, et al. Selective laser sintering fabrication

of nano-hydroxyapatite/poly-ε-caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. Int J Nanomedicine. 2013;4197.
214. Lu Z, Roohani-Esfahani S-I, Wang G, Zreiqat H. Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2012;8(4):507-15.
215. Amorosa L, Lee, Aydemir, Nizami, Hsu, Patel, et al. Physiologic load-bearing characteristics of autografts, allografts, and polymer-based scaffolds in a critical sized segmental defect of long bone: an experimental study. Int J Nanomedicine. 2013;1637.
216. Chung EJ, Sugimoto M, Koh JL, Ameer GA. Low-Pressure Foaming: A Novel Method for the Fabrication of Porous Scaffolds for Tissue Engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2012;18(2):113-21.
217. Nie L, Chen D, Suo J, Zou P, Feng S, Yang Q, et al. Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012;100:169-76.
218. Lv Q, Deng M, Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Nano-ceramic Composite Scaffolds for Bioreactor-based Bone Engineering: Clin Orthop. 2013;471(8):2422-33.
219. Ramier J, Grande D, Bouderlique T, Stoilova O, Manolova N, Rashkov I, et al. From design of bio-based biocomposite electrospun scaffolds to osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. J Mater Sci Mater Med. 2014;25(6):1563-75.
220. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. J Cranio-Maxillofac Surg. 2012;40(1):2-7.
221. Fu K, Xu Q, Czernuszka J, Triffitt JT, Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. Biomed Mater. 2013;8(6):065007.
222. Tohamy KM, Mabrouk M, Soliman IE, Beherei HH, Aboelnasr MA. Novel alginate/hydroxyethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffold for bone regeneration: In vitro cell viability and proliferation of human mesenchymal stem cells. Int J Biol Macromol. 2018;112:448-60.
223. Liu Z, Yin X, Ye Q, He W, Ge M, Zhou X, et al. Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold. J Biomater Appl. 2016;31(1):121-31.
224. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. J Biomed Mater Res. 2004;71A(1):108-17.
225. Wahl D, Czernuszka J. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. Eur Cell Mater. 2006;11:43-56.
226. Wang RZ, Cui FZ, Lu HB, Wen HB, Ma CL, Li HD. Synthesis of nanophase hydroxyapatite/collagen composite. J Mater Sci Lett. 1995;14(7):490-2.
227. Serre CM, Papilla M, Chavassieux P, Boivin G. In v3.ro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. 1993;14(2):10.
228. Yamauchi K. Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. Biomaterials. 2004;25(24):5481-9.
229. Lin H-R, Yeh Y-J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, andin vitro studies. J Biomed Mater Res. 2004;71B(1):52-65.
230. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. J Controlled Release. 2000;64(1-3):91-102.
231. Lu MZ, Lan HL, Wang FF, Chang SJ, Wang YJ. Cell Encapsulation with Alginate and-

Phenoxycinnamylidene-Acetylated Poly(Allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000;70(5):5.
232. Chang PL, Hortelano G, Awrey DE, Tse M. Growth of recombinant fibroblasts in alginate microcapsules. Biotechnol Bioeng. 1994;43(10):925-33.
233. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. Biomaterials. 2001;22(6):511-21.
234. Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. Biomaterials. 1997;18(8):583-90.
235. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials. 1999;20(1):45-53.
236. Yang J, Goto M, Ise H, Cho C-S, Akaike T. Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment. Biomaterials. 2002;23(2):471-9.
237. Hernández-González AC, Téllez-Jurado L, Rodríguez-Lorenzo LM. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. Carbohydr Polym. 2020;229:115514.
238. Bai X, Lü S, Liu H, Cao Z, Ning P, Wang Z, et al. Polysaccharides based injectable hydrogel compositing bio-glass for cranial bone repair. Carbohydr Polym. 2017;175:557-64.
239. Schloßmacher U, Schröder HC, Wang X, Feng Q, Diehl-Seifert B, Neumann S, et al. Alginate/silica composite hydrogel as a potential morphogenetically active scaffold for three-dimensional tissue engineering. RSC Adv. 2013;3(28):11185.
240. Lewandowska-Łańcucka J, Mystek K, Mignon A, Van Vlierberghe S, Łatkiewicz A, Nowakowska M. Alginate- and gelatin-based bioactive photocross-linkable hybrid materials for bone tissue engineering. Carbohydr Polym. 2017;157:1714-22.
241. Qiu M, Chen D, Shen C, Shen J, Zhao H, He Y. Preparation of in situ forming and injectable alginate/mesoporous Sr-containing calcium silicate composite cement for bone repair. RSC Adv. 2017;7(38):23671-9.
242. Lee G-S, Park J-H, Won J-E, Shin US, Kim H-W. Alginate combined calcium phosphate cements: mechanical properties and in vitro rat bone marrow stromal cell responses. J Mater Sci Mater Med. 2011;22(5):1257-68.
243. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, et al. Bone Morphogenesis in Implants of Insoluble Bone Gelatin. Proc Natl Acad Sci. 1973;70(12):3511-5.
244. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ. Novel Regulators of Bone Formation. Science. 1988:242(4885):1528-34.
245. Özkaynak E, Schnegelsberg PNJ, Jin DF, Clifford GM, Warren FD, Oppermann H. Osteogenic Protein-2 a new member of the transforming growth factor -B superfamily expressed early in embryogenesis. J Biol Chem. 1992;267(35):25220-7.
246. Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF-β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Int J Biol Sci. 2012;8(2):272-88.
247. Noel D. Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells. 2004;22(1):74-85.
248. Huang Z, Ren P-G, Ma T, Smith RL, Goodman SB. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. Cytokine. 2010;51(3):305-10.
249. Gu K, Zhang L, Jin T, Rutherford RB. Identification of Potential Modifiers of Runx2/Cbfa1 Activity in C2C12 Cells in Response to Bone Morphogenetic Protein-7. Cells Tissues Organs. 2004;176(1-3):28-40.
250. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DDF, et al. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. J Cell Biochem. 2010;109(2):406-16.
251. Arab Tehrany E, Kahn CJF, Baravian C, Maherani B, Belhaj N, Wang X, et al.

Elaboration and characterization of nanoliposome made of soya; rapeseed and salmon lecithins: Application to cell culture. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012;95:75-81.
252. Bangham AD. Nature. 1961;192:1197-8.
253. Bianchi A, Velot É, Kempf H, Elkhoury K, Sanchez-Gonzalez L, Linder M, et al. Nanoliposomes from Agro-Resources as Promising Delivery Systems for Chondrocytes. Int J Mol Sci. 2020;21(10):3436.
254. McBride SH, Knothe Tate ML. Modulation of Stem Cell Shape and Fate A: The Role of Density and Seeding Protocol on Nucleus Shape and Gene Expression. Tissue Eng Part A. 2008;14(9):1561-72.
255. Venugopal B, Mogha P, Dhawan J, Majumder A. Cell density overrides the effect of substrate stiffness on human mesenchymal stem cells' morphology and proliferation. Biomater Sci. 2018;6(5):1109-19.
256. Zahedi M, Parham A, Dehghani H, Mehrjerdi HK. Equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: optimization of cell density in primary culture. Stem Cell Investig. 2018;5:31-31.
257. Megat Abdul Wahab R, Mohamed Rozali NA, Senafi S, Zainol Abidin IZ, Zainal Ariffin Z, Zainal Ariffin SH. Impact of isolation method on doubling time and the quality of chondrocyte and osteoblast differentiated from murine dental pulp stem cells. PeerJ. 2017;5:e3180.
258. Zhou H, Weir MD, Xu HHK. Effect of Cell Seeding Density on Proliferation and Osteodifferentiation of Umbilical Cord Stem Cells on Calcium Phosphate Cement-Fiber Scaffold. Tissue Eng Part A. 2011;17(21-22):2603-13.
259. Kim K, Dean D, Mikos AG, Fisher JP. Effect of Initial Cell Seeding Density on Early Osteogenic Signal Expression of Rat Bone Marrow Stromal Cells Cultured on Cross-Linked Poly(propylene fumarate) Disks. Biomacromolecules. 2009;10(7):1810-7.
260. Kruyt M, de Bruijn J, Rouwkema J, van Blitterswijk C, Oner C, Verbout A, et al. Analysis of the Dynamics of Bone Formation, Effect of Cell Seeding Density, and Potential of Allogeneic Cells in Cell-Based Bone Tissue Engineering in Goats. Tissue Eng Part A. 2008;14(6):1081-8.
261. Bitar M, Brown RA, Salih V, Kidane AG, Knowles JC, Nazhat SN. Effect of Cell Density on Osteoblastic Differentiation and Matrix Degradation of Biomimetic Dense Collagen Scaffolds. Biomacromolecules. 2008;9(1):129-35.
262. Goldstein AS. Effect of Seeding Osteoprogenitor Cells as Dense Clusters on Cell Growth and Differentiation. Tissue Eng. 2001;7(6):817-27.
263. Almarza AJ, Athanasiou KA. Effects of Initial Cell Seeding Density for the Tissue Engineering of the Temporomandibular Joint Disc. Ann Biomed Eng. 2005;33(7):943-50.
264. Wang L, Sheshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Effect of Initial Seeding Density on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Fibrocartilage Tissue Engineering. Tissue Eng Part A. 2009;15(5):1009-17.
265. Hsieh M-K, Wu C-J, Su X-C, Chen Y-C, Tsai T, Niu C-C, et al. Bone regeneration in Ds-Red pig calvarial defect using allogenic transplantation of EGFP-pMSCs – A comparison of host cells and seeding cells in the scaffold. PLoS One. 2019;14(7):e0215499.
266. Yassin MA, Leknes KN, Pedersen TO, Xing Z, Sun Y, Lie SA, et al. Cell seeding density is a critical determinant for copolymer scaffolds-induced bone regeneration: Copolymer Scaffolds Induced Bone Regeneration. J Biomed Mater Res A. 2015;103(11):3649-58.
267. Wu H, Kang N, Wang Q, Dong P, Lv X, Cao Y, et al. The Dose–Effect Relationship between the Seeding Quantity of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells and in Vivo Tissue-Engineered Bone Yield. Cell Transplant. 2015;24(10):1957-68.
268. Rodas-Junco BA, Villicaña C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. Tissue Eng Regen Med. 2017;14(4):333-47.

269. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambara G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. J Cell Mol Med. 2009;14(6b):1635-44.
270. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, Carrasco MA, Jung H-S. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. J Cell Sci. 2012;125(14):3343-56.
271. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. Cell Tissue Res. 2005;321(3):391-400.
272. Perry BC, Yang F-C. Collection, Cryopreservation, and Characterization of Human Dental Pulp–Derived Mesenchymal Stem Cells for Banking and Clinical Use.Tissue Engineering Part C Methods. 2008;14(2):149-156.
273. Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental Pulp Stem Cell (DPSC) Isolation, Characterization, and Differentiation. Methods Mol Biol. 2014;1210:91-115.
274. Ahmed NE-MB, Aboul-Ezz EHA, Zakhary SY, Badry THE, Ramzy MI. Isolation of Dental Pulp Stem Cells and their In Vitro Differentiation into Odontoblast-like Cells. 2011;9.
275. Takeda-Kawaguchi T, Sugiyama K, Chikusa S, Iida K, Aoki H, Tamaoki N, et al. Derivation of iPSCs after Culture of Human Dental Pulp Cells under Defined Conditions. Kerkis I, éditeur. PLoS ONE. 2014;9(12):e115392.
276. Suchánek J, Soukup T, Ivančaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, et al. Human Dental Pulp Stem Cells – Isolation and Long Term Cultivation. Acta Medica Hradec Kralove Czech Repub. 2007;50(3):195-201.
277. Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, Pytlík R, Corbeil D, Mokrý J. Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Impacted Third Molars Cultured in Low Serum-Containing Medium. Cells Tissues Organs. 2011;193(6):344-65.
278. Ajlan SA, Ashri NY, Aldahmash AM, Alnbaheen MS. Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. BMC Oral Health. 2015;15(1):132.
279. Nikoli N, Krsti A, Trivanovi D, Mojsilovi S, Koci J, Santibanez JF, et al. MESENCHYMAL STEM CELL PROPERTIES OF DENTAL PULP CELLS FROM DECIDUOUS TEETH. Arch Biol Sci. 2011;63(4):933-942.
280. Mochizuki M, Sagara H, Nakahara T. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture. Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):267.
281. Logeart-Avramoglou D, Oudina K, Bourguignon M, Delpierre L, Nicola M-A, Bensidhoum M, et al. In Vitro and In Vivo Bioluminescent Quantification of Viable Stem Cells in Engineered Constructs. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(3):447-58.
282. Deschepper M, Manassero M, Oudina K, Paquet J, Monfoulet L-E, Bensidhoum M, et al. Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells Upon Transplantation. Stem Cells. 2013;31(3):526-35.
283. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan: Mesenchymal stem cells and reduced oxygen tension, C. Fehrer et al. Aging Cell. 2007;6(6):745-57.
284. Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S, Blanco FJ. Effects of Severe Hypoxia on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation Potential. Stem Cells Int. 2013;2013:1-11.
285. Elseberg CL, Leber J, Salzig D, Wallrapp C, Kassem M, Kraume M, et al. Microcarrier-based Expansion Process for hMSCs with High Vitality and Undifferentiated Characteristics. Int J Artif Organs. 2012;35(2):93-107.
286. Li Y-M, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, et al. Effects

of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2007;363(1):209-15.
287. Stolzing A, Bauer E, Scutt A. Suspension Cultures of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Effects of Donor Age and Glucose Level. Stem Cells Dev. 2012;21(14):2718-23.
288. Wang Juncheng, Wang Bin, Li Ying, Wang Dongsheng, E Lingling, Bai Yang, et al. High glucose inhibits osteogenic differentiation through the BMP signaling pathway in bone mesenchymal stem cells in mice. EXCLI J. 2013;12:584-597.
289. Zhang D, Lu H, Chen Z, Wang Y, Lin J, Xu S, et al. High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling. Mol Med Rep. 2017;16(2):1685-90.
290. Liang C, Li H, Tao Y, Zhou X, Li F, Chen G, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. J Transl Med. 2012;10(1):49.
291. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Kimura D, Yamawaki I, Noguchi M, et al. High Glucose Concentrations Suppress the Proliferation of Human Periodontal Ligament Stem Cells and Their Differentiation Into Osteoblasts. J Periodontol. 2016;87(4):e44-51.
292. Seubbuk S, Sritanaudomchai H, Kasetsuwan J, Surarit R. High glucose promotes the osteogenic differentiation capability of human periodontal ligament fibroblasts. Mol Med Rep. 2017;15(5):2788-94.
293. Lin Y-C, Li Y-J, Rui Y-F, Dai G-C, Shi L, Xu H-L, et al. The effects of high glucose on tendon-derived stem cells: implications of the pathogenesis of diabetic tendon disorders. Oncotarget. 2017;8(11):17518-28.
294. Yang P, Shen W, Albert Reece E, Chen X, Yang P. High glucose suppresses embryonic stem cell differentiation into neural lineage cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016;472(2):306-12.
295. Wang Y, Wang Y, Lu Y, Yu J. High Glucose Enhances the Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla via NF-KappaB Signaling Pathway. BioMed Res Int. 2019;2019:1-10.
296. Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Influence of Hypoxia, High Glucose, and Low Serum on the Growth Kinetics of Mesenchymal Stem Cells from Deciduous and Permanent Teeth. Cells Tissues Organs. 2013;198(3):198-208.
297. Salazar-Noratto GE, Luo G, Denoeud C, Padrona M, Moya A, Bensidhoum M, et al. Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. Stem Cells. 2020;38(1):22-33.
298. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(4):285-96.
299. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. BMC Cell Biol. 2011;12(1):12.
300. Werle SB, Chagastelles P, Pranke P, Casagrande L. The effects of hypoxia on in vitro culture of dental-derived stem cells. Arch Oral Biol. 2016;68:13-20.
301. Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified Proliferation of Human Dental Pulp Cells. J Endod. 2009;35(6):818-23.
302. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2010;55(9):648-54.
303. Zhou Y, Fan W, Xiao Y. The Effect of Hypoxia on the Stemness and Differentiation Capacity of PDLC and DPC. BioMed Res Int. 2014;2014:1-7.
304. Alanazi A, Munir H, Alassiri M, Ward LSC, McGettrick HM, Nash GB. Comparative

adhesive and migratory properties of mesenchymal stem cells from different tissues. Biorheology. 2019;56(1):15-30.
305. Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, Phipps MC, Sawyer AA, Culpepper BK, et al. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. Biomaterials. 2009;30(10):1898-909.
306. Lavasani M, Lu A, Thompson SD, Robbins PD, Huard J, Niedernhofer LJ. Isolation of Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells Based on Adhesion Characteristics to Collagen-Coated Surfaces. Methods Mol Biol. 2013;976:53-65.
307. Leong WS, Tay CY, Yu H, Li A, Wu SC, Duc D-H, et al. Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate. Biochem Biophys Res Commun. 2010;401(2):287-92.
308. Liao H-T, Lee M-Y, Tsai W-W, Wang H-C, Lu W-C. Osteogenesis of adipose-derived stem cells on polycaprolactone-B-tricalcium phosphate scaffold fabricated via selective laser sintering and surface coating with collagen type I: PCL-TCP scaffolds fabricated via selective laser sintering. J Tissue Eng Regen Med. 2016;10(10):E337-53.
309. Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S. A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011;414(1):270-6.
310. Mobasseri R, Tian L, Soleimani M, Ramakrishna S, Naderi-Manesh H. Bio-active molecules modified surfaces enhanced mesenchymal stem cell adhesion and proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(1):312-7.
311. Obara C, Takizawa K, Tomiyama K, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Gotoh T, et al. Differentiation and Molecular Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Murine Induced Pluripotent Stem Cells Derived on Gelatin or Collagen. Stem Cells Int. 2016;2016:1-10.
312. Teixeira BN, Aprile P, Mendonça RH, Kelly DJ, Thiré RM da SM. Evaluation of bone marrow stem cell response to PLA scaffolds manufactured by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019;107(1):37-49.
313. Tang J, Saito T. The Role of Nephronectin on Proliferation and Differentiation in Human Dental Pulp Stem Cells. Stem Cells Int. 2017;2017:1-14.
314. Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. Trends Biotechnol. 2009;27(10):562-71.
315. Towler DA. The osteogenic-angiogenic interface: Novel insights into the biology of bone formation and fracture repair. Curr Osteoporos Rep. 2008;6(2):67-71.
316. Smith MK, Peters MC, Richardson TP, Garbern JC, Mooney DJ. Locally Enhanced Angiogenesis Promotes Transplanted Cell Survival. Tissue Eng. 2004;10(1-2):63-71.
317. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2008;26(8):434-41.
318. Rivron N, Liu J, Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk C. Engineering vascularised tissues in vitro. Eur Cell Mater. 2008;15:27-40.
319. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. Plast Reconstr Surg. 2002;109(7):2384-97.
320. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. J Cell Physiol. 2008;214(2):537-44.
321. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. J Theor Biol. 2008;251(1):137-58.

322. Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. J Orthop Res. 2010;28(8):1007-14.
323. Yousefi A-M, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. Stem Cells Int. 2016;2016:1-13.
324. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. J Dent. 2014;42(7):761-8.
325. Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. Cytotherapy. 2016;18(1):13-24.
326. Schira J, Falkenberg H, Hendricks M, Waldera-Lupa DM, Kögler G, Meyer HE, et al. Characterization of Regenerative Phenotype of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from Human Umbilical Cord Blood (hUCB) by Functional Secretome Analysis. Mol Cell Proteomics. 2015;14(10):2630-43.
327. Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. BioMed Res Int. 2014;2014:1-14.
328. Murakami M, Hayashi Y, Iohara K, Osako Y, Hirose Y, Nakashima M. Trophic Effects and Regenerative Potential of Mobilized Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue as Alternative Cell Sources for Pulp/Dentin Regeneration. Cell Transplant. 2015;24(9):1753-65.
329. Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):111.
330. Joo KH, Song JS, Kim S, Lee H-S, Jeon M, Kim S-O, et al. Cytokine Expression of Stem Cells Originating from the Apical Complex and Coronal Pulp of Immature Teeth. J Endod. 2018;44(1):87-92.e1.
331. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. Stem Cells. 2008;26(9):2408-18.
332. Nakayama H, Iohara K, Hayashi Y, Okuwa Y, Kurita K, Nakashima M. Enhanced regeneration potential of mobilized dental pulp stem cells from immature teeth. Oral Dis. 2017;23(5):620-8.
333. Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Tanigawa T, et al. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. Sci Rep. 2015;5(1):16295.
334. Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. Biomaterials. 2013;34(8):1888-97.
335. Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):77.
336. Omi M, Hata M, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Kamiya H, et al. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. J Diabetes Investig. 2016;7(4):485-96.
337. Pivoraitė U, Jarmalavičiūtė A, Tunaitis V, Ramanauskaitė G, Vaitkuvienė A, Kašėta V, et al. Exosomes from Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice. Inflammation. 2015;38(5):1933-41.

338. Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, et al. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. Bone. 2016;83:210-9.
339. Alkharobi H, Alhodhodi A, Hawsawi Y, Alkafaji H, Devine D, El-Gendy R, et al. IGFBP-2 and -3 co-ordinately regulate IGF1 induced matrix mineralisation of differentiating human dental pulp cells. Stem Cell Res. 2016;17(3):517-22.
340. Paschalidis T, Bakopoulou A, Papa P, Leyhausen G, Geurtsen W, Koidis P. Dental pulp stem cells' secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA-induced cytotoxicity. Dent Mater. 2014;30(12):e405-18.
341. Ahmed NE-MB, Murakami M, Hirose Y, Nakashima M. Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cell Secretome for Alzheimer's Disease Treatment: An In Vitro Study. Stem Cells Int. 2016;2016:1-11.
342. Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H, Hattori H, Yamada K, Hibi H, et al. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res. 2015;293:189-97.
343. Fujii H, Matsubara K, Sakai K, Ito M, Ohno K, Ueda M, et al. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. Brain Res. 2015;1613:59-72.
344. Inoue T, Sugiyama M, Hattori H, Wakita H, Wakabayashi T, Ueda M. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. Tissue Eng Part A. 2013;19(1-2):24-9.
345. Yamamoto T, Osako Y, Ito M, Murakami M, Hayashi Y, Horibe H, et al. Trophic Effects of Dental Pulp Stem Cells on Schwann Cells in Peripheral Nerve Regeneration. Cell Transplant. 2016;25(1):183-93.
346. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Paracrine-Mediated Neuroprotection and Neuritogenesis of Axotomised Retinal Ganglion Cells by Human Dental Pulp Stem Cells: Comparison with Human Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Mezey E, éditeur. PLoS ONE. 2014;9(10):e109305.
347. Kumar A, Kumar V, Rattan V, Jha V, Pal A, Bhattacharyya S. Molecular spectrum of secretome regulates the relative hepatogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow and dental tissue. Sci Rep. 2017;7(1):15015.
348. Hirata M, Ishigami M, Matsushita Y, Ito T, Hattori H, Hibi H, et al. Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived From Dental Pulp Stem Cells for Mouse Liver Fibrosis: Dental Pulp Stem Cell Factors for Treating LF. Stem Cells Transl Med. 2016;5(10):1416-24.
349. Wakayama H, Hashimoto N, Matsushita Y, Matsubara K, Yamamoto N, Hasegawa Y, et al. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. Cytotherapy. 2015;17(8):1119-29.
350. Izumoto-Akita T, Tsunekawa S, Yamamoto A, Uenishi E, Ishikawa K, Ogata H, et al. Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic β-cell function. BMJ Open Diabetes Res Care. 2015;3(1):e000128.
351. Ahiko N, Baba Y, Tsuji M, Suzuki S, Kaneko T, Kindaichi J, et al. Investigation of Maxillofacial Morphology and Dental Development in Hemifacial Microsomia. Cleft Palate Craniofac J. 2015;52(2):203-9.
352. Jain V, Kapoor P. Demirjian approach of dental age estimation: abridged for operator ease. J Forensic Dent Sci. 2016;8(3):177.
353. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. Front Physiol. 2015 ;6 :213.

354. Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004;329(1):77-84.
355. Chen K-L, Huang Y-Y, Lung J, Yeh Y-Y, Yuan K. CD44 Is Involved in Mineralization of Dental Pulp Cells. J Endod. 2013;39(3):351-6.
356. Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M, Kikuchi H, Katayama T, Sakagami H. Hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via CD44. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):135.
357. Kaci M, Arab-Tehrany E, Dostert G, Desjardins I, Velot E, Desobry S. Efficiency of emulsifier-free emulsions and emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q10: physico-chemical properties and in vitro evaluation. Colloids Surf B Biointerfaces. 2016;147:142-50.
358. Willemin A-S. Stratégies cellulaires et environnementales pour le développement d'un substitut osseux prévascularisé. [Nancy]: Université de Lorraine; 2018.
359. Kaci M, Belhaffef A, Meziane S, Dostert G, Menu P, Velot É, et al. Nanoemulsions and topical creams for the safe and effective delivery of lipophilic antioxidant coenzyme Q10. Colloids Surf B Biointerfaces. 2018;167:165-75.
360. Keats E, Khan ZA. Unique Responses of Stem Cell-Derived Vascular Endothelial and Mesenchymal Cells to High Levels of Glucose. Mellor H, éditeur. PLoS One. 2012;7(6):e38752.
361. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-Induced Replicative Senescence in Mesenchymal Stem Cells. Rejuvenation Res. 2006;9(1):31-5.
362. Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, Wang Y, Meldrum DR. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol. 2009;296(6):R1735-43.
363. Kim YH, Heo JS, Han HJ. High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways. J Cell Physiol. 2006;209(1):94-102.
364. Yamawaki I, Taguchi Y, Komasa S, Tanaka A, Umeda M. Effects of glucose concentration on osteogenic differentiation of type II diabetes mellitus rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on a nano-scale modified titanium. J Periodontal Res. 2017;52(4):761-71.
365. Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Kokubu E, Wang X, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. Cell Tissue Res. 2010;342(2):221-31.
366. Nakashima K, de Crombrugghe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. Trends Genet. 2003;19(8):458-66.
367. Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. Curr Osteoporos Rep. 2016;14(6):310-9.
368. Hayrapetyan A, Bongio M, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA, van den Beucken JJJP. Effect of Nano-HA/Collagen Composite Hydrogels on Osteogenic Behavior of Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cell Rev Rep. 2016;12(3):352-64.
369. Bhuiyan DB, Middleton JC, Tannenbaum R, Wick TM. Bone regeneration from human mesenchymal stem cells on porous hydroxyapatite-PLGA-collagen bioactive polymer scaffolds. Biomed Mater Eng. 22 2017;28(6):671-85.
370. Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. Stem Cells. 2011;29(6):981-91.
371. Jiménez NT, Carlos Munévar J, González JM, Infante C, Lara SJP. In vitro response of

dental pulp stem cells in 3D scaffolds: A regenerative bone material. Heliyon. 2018;4(9):e00775.
372. Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Fernández-Vázquez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Ovine Mesenchymal Stromal Cells: Morphologic, Phenotypic and Functional Characterization for Osteochondral Tissue Engineering. Nukavarapu S, éditeur. PLoS One. 2017;12(1):e0171231.
373. Chen J, Gao K, Liu S, Wang S, Elango J, Bao B, et al. Fish Collagen Surgical Compress Repairing Characteristics on Wound Healing Process In Vivo. Mar Drugs. 2019;17(1):33.
374. Bouillet L, Sidibé A, Polena H, Mannic T, Deroux A, Stidder B, et al. Instabilité des jonctions endothéliales : biomarqueurs du remodelage vasculaire. Médecine/sciences. 2014;30(6-7):633-5.
375. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. Dev Cell. 2013;26(5):441-54.
376. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. Injury. 2005;36(3):S20-7.
377. Pacini S. Deterministic and stochastic approaches in the clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs). Front Cell Dev Biol. 2014;2:50.
378. Bakopoulou A, Apatzidou D, Aggelidou E, Gousopoulou E, Leyhausen G, Volk J, et al. Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects "stemness" properties. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):247.
379. Qu C, Brohlin M, Kingham PJ, Kelk P. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. Cell Tissue Res. 2020;380(1):93-105.
380. Abdel Moniem EM, EL-Batran MM, Halawa AM, Gomaa DH, Eldeen GN, Aly RM. Optimizing a serum-free/xeno-free culture medium for culturing and promoting the proliferation of human dental pulp stem cells. Stem Cell Investig. 2019;6:15-15.
381. Mochizuki M, Nakahara T. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):25.
382. Chase LG, Yang S, Zachar V, Yang Z, Lakshmipathy U, Bradford J, et al. Development and Characterization of a Clinically Compliant Xeno-Free Culture Medium in Good Manufacturing Practice for Human Multipotent Mesenchymal Stem Cells. STEM CELLS Transl Med. 2012;1(10):750-8.
383. Palamà MEF, Shaw GM, Carluccio S, Reverberi D, Sercia L, Persano L, et al. The Secretome Derived From Mesenchymal Stromal Cells Cultured in a Xeno-Free Medium Promotes Human Cartilage Recovery in vitro. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:90.
384. Sato K, Itoh T, Kato T, Kitamura Y, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Vitro Cell Dev Biol - Anim. 2015;51(5):515-29.
385. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Malignant Transformation during Long-Term Culturing in Serum-Free Medium. Ivanovic Z, éditeur. PLoS One. 2014;9(6):e98565.
386. Wang Y, Wu H, Yang Z, Chi Y, Meng L, Mao A, et al. Human mesenchymal stem cells possess different biological characteristics but do not change their therapeutic potential when cultured in serum free medium. Stem Cell Res Ther. 2014;5(6):132.
387. Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J, Perrier-Groult E, Aubert-Foucher E, et al. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. Stem Cells Int. 2019;2019:1-19.
388. Ducret M, Fabre H, Degoult O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. A standardized

procedure to obtain mesenchymal stem/stromal cells from minimally manipulated dental pulp and Wharton's jelly samples. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2016;53(1):e37.
389. Canceill T, Campana S-C, Blasco-Baque V, Monsarrat P, Kichenbrand C, Joniot S, et al. Les concentrés plaquettaires en chirurgie orale Quand la biologie et les matériaux ne font qu'un. Biomatériaux cliniques. 2020;2-8.
390. Shah R. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2017;(25):64-72.
391. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol. 2009;27(3):158-67.
392. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials. 2016;76:371-87.
393. Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A, et al. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplant. 2007;40(8):785-91.
394. Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Platelet lysate promotes *in vitro* wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. J Cell Mol Med. 2009;13(8b):2030-8.
395. Ruggiu A, Ulivi V, Sanguineti F, Cancedda R, Descalzi F. The effect of Platelet Lysate on osteoblast proliferation associated with a transient increase of the inflammatory response in bone regeneration. Biomaterials. 2013;34(37):9318-30.
396. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. Br J Dermatol. 2008;159(3):537-45.
397. Ranzato E, Balbo V, Boccafoschi F, Mazzucco L, Burlando B. Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate. Cell Biol Int. 2009;33(9):911-7.
398. Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(2):557-64.
399. Abuarqoub D, Awidi A, Abuharfeil N. Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. Arch Oral Biol. 2015;60(10):1545-53.

Résumé

Face à des pertes de substance osseuse de grande étendue dépassant les capacités naturelles de régénération de l'os natif, aucune solution thérapeutique, qu'il s'agisse de l'os autologue ou du l'utilisation de substituts osseux, n'est à ce jour pleinement satisfaisante, en particulier par l'absence de cellularisation du substitut et de sa vascularisation. La création d'un substitut osseux pré vascularisé en ingénierie tissulaire osseuse pourrait dépasser ces limites et autoriser une régénération tissulaire osseuse de qualité, favorisée par une vascularisation du greffon.

Notre projet visait à développer ce substitut osseux pré vascularisé en combinant un biomatériau associant éponge de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en hydroxyapatite (HA) et colonisé par des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD).

La première partie de notre travail a permis de préciser les conditions environnementales pouvant être choisies pour l'utilisation des CSM-PD en ingénierie tissulaire osseuse, telles que la densité d'ensemencement, la teneur en glucose de l'environnement et le choix de nanovecteurs. Nous avons mis en lumière que les CSM-PD n'étaient pas impactées d'une part par des nanoliposomes de lécithine de colza (utilisables pour la vectorisation de molécules bioactives), et d'autre part qu'une faible teneur en glucose pouvait induire une différenciation ostéogénique de façon aussi performante qu'une forte teneur en glucose. La deuxième partie de notre travail a consisté en l'ensemencement des CSM-PD au sein de notre biomatériau innovant associant éponge de collagène et hydrogel d'alginate enrichi en HA. Nous avons observé une potentialisation des capacités de colonisation des biomatériaux et de la différenciation ostéogénique des CSM-PD et mis en évidence la présence de précurseurs de cellules endothéliales-like.

Ces résultats encourageants mettent en lumière le potentiel d'utilisation des CSM-PD combinées à un biomatériau combinant collagène et hydrogel d'alginate enrichi en HA pour l'ingénierie osseuse pré-vascularisée.

Mots clés : ingénierie tissulaire osseuse, cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire, collagène, hydroxyapatite, alginate, hydrogel.

Abstract

Critical-size defects overcome the natural ability of the bone tissue to heal. Currently, all the therapeutics including autologous grafting are facing limitations. The answer could be provided by bone tissue engineering with the creation of a prevascularized bone substitute that could allow both revascularization of the graft and new bone formation.

Our project aimed to develop this prevascularized bone substitute by combining dental pulp stem cells (DPSCs), and collagen matrix enriched with alginate and HA hydrogel.

First, we highlighted the preferred experimental condition for the use of DPSCs in bone tissue engineering. We showed that DPSCs are not affected by lecithin rapeseed nanoliposomes (which can be used for the vectorization of bioactive molecules), and that a low glucose concentration can induce osteogenic differentiation as effectively as a high glucose concentration. Then, we seeded DPSCs in biomaterials composed of collagen matrix with alginate and HA hydrogels and obtained both osteogenic differentiation and endothelial-like cells in our constructs. We also showed that alginate/HA hydrogel had a booster effect on the cellular colonization and differentiation in our biomaterials compared to collagen alone.

These encouraging results highlight the potential of DPSCs combined with a collagen and alginate-HA hydrogel composite construct in prevascularized bone tissue engineering.

Key words: bone tissue engineering, dental pulp stem cells, collagen, hydroxyapatite, alginate, hydrogel.