

CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT DE MEDICAMENT DE THERAPIE INNOVANTE A BASE D'ASCS POUR LA REPARATION DES LESIONS OSSEUSES DE LA FACE CHEZ L'HOMME : COMPARAISON DES ASCS ISOLEES DU CORPS ADIPEUX DE LA BOUCHE ET DU TISSU ADIPEUX SOUS-CUTANE

THESE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

CUVELIER Marie

Née le 22/05/1996 à LAGNY-SUR-MARNE (77)

Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENT :
M. Philippe KEMOUN

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
Mme Isabelle RAYMOND-LETRON
Mme Sophie PALIERNE

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITEES :
Mme Audrey VARIN
Mme Sophie CORONAS-DUPUY

Chargée de Recherche à l'EFS, Institut RESTORE
Ingénieure de Recherche, LabHPEC à l'Ecole Vétérinaire

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*

M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*

Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

REMERCIEMENTS

Au président du jury

A Monsieur le Professeur Philippe KEMOUN

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Odontologie

*Qui me fait l'honneur de présider ce jury.
Mes remerciements les plus sincères.*

A ma directrice de thèse

A Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Histologie- Anatomie Pathologique

*Qui m'a confié ce sujet et fait l'honneur d'encadrer ma thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour
votre accompagnement, votre soutien et votre confiance.*

A l'assesseure de ce jury

A Madame Sophie PALIERNE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Chirurgie

Qui me fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury.

Membres invitées

A Madame Audrey VARIN

Chargée de recherche à l'Etablissement Français du Sang, Institut RESTORE

*Qui a donné vie à ce projet et m'a fait le plaisir d'accepter de siéger dans ce jury.
Veuillez accepter mes remerciements pour votre implication et votre accompagnement
Je vous dois beaucoup.*

A Madame Sophie CORONAS- DUPUY

Ingénieure de Recherche au LabHPEC et Institut RESTORE

*Qui m'a fait l'honneur et le plaisir de m'accompagner en prenant place dans ce jury.
Veuillez trouver ici le témoignage de mon affection et de mon respect.*

J'adresse également de très sincères remerciements,

A Christophe GUISSARD

Assistant ingénieur à l'Institut RESTORE

Pour vos talents et votre endurance durant les chirurgies. Merci pour votre gentillesse.

A Céline BLEAUART

Technicienne du LabHPEC

Pour votre aide précieuse, et sans qui rien n'aurait abouti en temps voulu.

A Samantha MILIA,

Responsable du plateau technique Anexplo de Purpan

A Timothé DURAND-PLAVIS

Ingénieur d'étude à l'INSERM et sur le plateau technique Anexplo de Purpan

A Flora ABELLA

Assistante Ingénieure à l'INSERM et sur le plateau technique Anexplo de Purpan

Pour votre accompagnement, vos conseils, et surtout pour votre bonne humeur !

J'ai eu beaucoup de plaisir à vous côtoyer.

A Margot TERTRAIS

Ingénieure de Recherche à l'Institut RESTORE

Pour cette transmission de compétences express mais efficace sur l'Operetta.

Merci de votre patience et gentillesse.

Enfin, je souhaite exprimer ma profonde gratitude,

A ma maman, pour son soutien sans faille, et à qui je dois tout,

A mon papa, loin de mes yeux, mais ô combien proche de mon cœur,

A ma famille, pour leur soutien et l'affection que l'on se porte.

Table des matières

Table des illustrations	13
Liste des Tableaux	14
Liste des Annexes	14
Liste des abréviations utilisées	15
Introduction	17
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. Biologie de l'os et mécanismes du remodelage osseux	21
A. Structure de l'os	21
1. Structure générale des os plats du crâne	21
2. Matrice extra-cellulaire osseuse	22
3. Composante cellulaire de l'os	23
B. Mécanismes physiologiques du remodelage osseux	26
II. Contexte Clinique des lésions osseuses maxillo-faciales	27
A. Etiologies des lésions osseuses maxillo-faciales	27
1. Les lésions d'origine non néoplasique.....	28
2. Les lésions d'origine néoplasique	29
B. Prise en charge des lésions osseuses maxillo-faciales	29
1. Les Biomatériaux utilisés en réparation osseuse	29
2. L'ingénierie tissulaire.....	31
C. Le développement des médicaments de thérapies innovantes.....	31
1. Définition réglementaire	31
2. Les Cellules Stromales Mésenchymateuses	32
3. L'emploi thérapeutique des cellules stromales mésenchymateuses.....	34
4. Les cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux.....	35
D. Le corps adipeux de la bouche: une source originale d'ASCs	36
1. Localisation et topographie du corps adipeux de la bouche.....	36
2. Fonction	37
3. Utilisation du CAB en clinique	37
4. Cellules stromales mésenchymateuses du CAB	37
III. Etude expérimentale de la reconstruction osseuse <i>in vivo</i> appliquée aux lésions maxillo-faciales.	38
A. Principes généraux des modèles de réparation osseuse <i>in vivo</i>	38
1. Considérations réglementaires et éthiques	38

2.	Critères généraux de choix d'un modèle de lésion osseuse <i>in vivo</i>	38
B.	La lésion de taille critique de la calvaria : un modèle de lésion osseuse maxillo-faciale	39
1.	Définition d'une lésion osseuse de taille critique	39
2.	Cohérence biologique du modèle	39
3.	Espèces animales employées	39
PARTIE II – ETUDE EXPERIMENTALE : COMPARAISON DES CAB-ASCS ET SC-ASCS COMME TRAITEMENT DE LESIONS OSSEUSES DE TAILLE CRITIQUE DE LA CALVARIA CHEZ LA SOURIS.		
.....		43
I.	Matériel et méthode	45
A.	Etude des propriétés de différenciation des différentes population d' ASCs <i>in vitro</i> ..	45
1.	Procédure de prélèvements multi-organes.....	45
2.	Obtention des cellules stromales mésenchymateuses des tissus adipeux.....	46
3.	Culture et différenciation cellulaire des différentes populations d'ASCs	46
4.	Extraction des ARN totaux et rétrotranscription	47
5.	Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel.....	47
6.	Imagerie cellulaire	48
B.	Etude des propriétés ostéoinductives des différentes population d'ASCs <i>in vivo</i>	49
1.	Modèle murin de lésion osseuse de taille critique de la calvaria	49
2.	Etude histologique.....	51
II.	Résultats	54
A.	Capacités de différenciation <i>in vitro</i> des différentes populations d'ASCs.....	54
1.	Différenciation adipocytaire	54
2.	Différenciation Chondroblastique	56
3.	Différenciation Ostéoblastique	57
B.	Etude des capacités d'ostéoinduction des deux populations d'ASCs dans un modèle animal de lésion osseuse de taille critique.....	60
1.	Effet des SC-ASCs et CAB-ASCs sur la reconstruction osseuse à 3 mois post-opératoire	60
2.	Cinétique courte à 7 jours post opératoire	61
3.	Cinétique courte à 14 jours post-opératoire.....	66
III.	Discussion	68
IV.	Conclusion	73
V.	Bibliographie	75
ANNEXES	89

Table des illustrations

FIGURE 1– STRUCTURE GENERALE D’UN OS DE CALVARIA DE SOURIS.	21
FIGURE 2- STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE LA CALVARIA DE SOURIS.	22
FIGURE 3- NIVEAUX D’ORGANISATION STRUCTURELLE DES FIBRES DE COLLAGENE ET DES CRISTAUX D’HYDROXYAPATITE DANS LA MATRICE OSSEUSE	23
FIGURE 4-EXPRESSION SEQUENTIELLE DES GENES DE DIFFERENCIATION OSTEOLASTIQUE.	24
FIGURE 5- STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE LA CALVARIA DE SOURIS SIEGE D’UN REMODELAGE OSSEUX, AVEC APPOSITION D’OSTEOÏDE PAR LES OSTEOLASTES ACTIVES.....	24
FIGURE 6- SEQUENCE DE DIFFERENCIATION DES OSTEOLASTES A PARTIR DE LA LIGNEE MYELOÏDE.....	25
FIGURE 7- RESORPTION OSSEUSE DE LA CALVARIA PAR LES OSTEOLASTES	26
FIGURE 8- FIGURE 8- ORGANIGRAMME RECAPITULATIF DES CAUSES MENANT A DES LESIONS OSSEUSES MAXILLO- FACIALES CHEZ L’HOMME.	28
FIGURE 9- ASPECT MICROSCOPIQUE DES ASCS EN CULTURE	33
FIGURE 10 - SECRETOME ASSOCIE AUX PROPRIETES THERAPEUTIQUES DES MSCs.....	34
FIGURE 11- ANATOMIE DU CORPS ADIPEUX DE LA BOUCHE.	36
FIGURE 12- IMAGE MACROSCOPIQUE DE CORPS ADIPEUX DE LA BOUCHE (CAB) ET DE TISSUS ADIPEUX SOUS- CUTANE (SC-TA) PRELEVES LORS DE PMO.....	46
FIGURE 13- CHRONOGRAMME REPRENANT L’ORGANISATION DES PROCEDURES IN VIVO.....	51
FIGURE 14- SCHEMA DU TRAITEMENT HISTOLOGIQUE DES CALVARIA PRELEVEES.	52
FIGURE 15- HISTOMORPHOMETRIE: MISE EN PLACE DEMASQUE POUR QUANTIFIER LA PRODUCTION OSSEUSE. .	52
FIGURE 16- ASPECT MICROSCOPIQUE DES SC-ASCS ET DES CAB-ASCS EN MILIEU DE DIFFERENCIATION ADIPOGENIQUE	54
FIGURE 17- DIFFERENCIATION ADIPOGENIQUE DES SC-ASCS ET CAB-ASCS.....	55
FIGURE 18- ASPECT MICROSCOPIQUE DES SC-ASCS ET DES CAB-ASCS EN MILIEU DE DIFFERENCIATION CHONDROGENIQUE	56
FIGURE 19- EXPRESSION DES GENES DE DIFFERENCIATION CHONDROBLASTIQUE PAR LES SC-ASCS ET CAB-ASCS.	57
FIGURE 20- ASPECTS MICROSCOPIQUES DES SC-ASCS ET CAB-ASCS EN MILIEU DE DIFFERENCIATION OSTEOGENIQUE	58
FIGURE 21- DIFFERENCIATION OSTEOLASTIQUE DES SC-ASCS ET CAB-ASCS.	59
FIGURE 22- ETUDE HISTOLOGIQUE A 3 MOIS POST OPERATOIRE.	61
FIGURE 23- POSITIONNEMENT DES PARTICULES DU BM DANS LA LESION OSSEUSE A 7 JOURS.	62

FIGURE 24- INDICE DE PROLIFERATION DES SC-ASCs ET CAB-ASCs A 7 JOURS POST-OPERATOIRE.....	63
FIGURE 25- ETUDE HISTOLOGIQUE DE L'INFLUENCE DES TRAITEMENTS SUR L'INFLAMMATION A 7 JOURS POST-OPERATOIRE.	64
FIGURE 26- OSTEOÏDE APPOSEE SUR L'ÉPAISSEUR DE LA CALVARIA A 7 JOURS POST-OPERATOIRE.	66
FIGURE 27- POSITIONNEMENT DES PARTICULES DU BM DANS LA LESION OSSEUSE A 14 JOURS	66
FIGURE 28- PERSISTANCE ET ACTIVITE DE PROLIFERATION DES ASCs SUR LE SITE LESIONNEL A 14 JOURS POST-OPERATOIRE.	67
FIGURE 29- OSTEOÏDE APPOSEE SUR L'ÉPAISSEUR DE LA CALVARIA A 14 JOURS POST-OPERATOIRE.	68
FIGURE 30- MASQUE D'ANALYSE HISTOMORPHOMETRIQUE POUR LA QUANTIFICATION DES CONSTITUANTS TISSULAIRES INTRA-LESIONNELS, PICROSIRIUS-RED ET FAST-GREEN	73

Liste des Tableaux

TABLEAU 1- APERÇU DES MODELES EXPERIMENTAUX DE LESION OSSEUSE CALVARIALE DE TAILLE CRITIQUE UTILISES DANS LA LITTERATURE.....	40
TABLEAU 2-IDENTIFICATION ET CARACTERISTIQUES DES DONNEURS D'ORGANES PRELEVES.....	45
TABLEAU 3- LISTE DES GENES DE DIFFERENCIATION ETUDIES PAR QPCR, ET SEQUENCE DES AMORCES SENS ET ANTI-SENS.....	48
TABLEAU 4- CARACTERISTIQUES DES COLORATIONS HISTOCHIMIQUES ET MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES UTILISES POUR L'ETUDE HISTOLOGIQUE DES ASCs ET DU REMODELAGE OSSEUX.....	53

Liste des Annexes

ANNEXE 1- IMAGERIE PAR TOMODENSITOMETRIE A 4 JOURS ET 44 JOURS POST OPERATOIRE.....	89
ANNEXE 2- PROTOCOLE DE COLORATION HISTOCHIMIQUE A L'HEMALUN-EOSINE.....	92
ANNEXE 3- REFERENCE DE L'ANTICORPS SECONDAIRE COUPLE A LA PEROXYDASE UTILISE EN IMMUNOHISTOCHIMIE	93
ANNEXE 4-- REFERENCE DE L'ANTICORPS PRIMAIRE DIRIGE CONTRE LA VIMENTINE HUMAINE UTILISE EN IMMUNOHISTOCHIMIE	94
ANNEXE 5-- REFERENCE DE L'ANTICORPS PRIMAIRE DIRIGE CONTRE LE KU80 HUMAIN UTILISE EN IMMUNOHISTOCHIMIE	95

Liste des abréviations utilisées

ASCs = Cellules Stromales mésenchymateuses dérivées du tissu Adipeux

BH = Biohybride

BM = Biomatériau

CAB = Corps adipeux de la bouche

CAB-ASCs = ASCs dérivées du CAB

FSV = Fraction Stromale Vasculaire

H- β -TCP = Hydroxyapatite- β -Tricalcium-Phosphate

H&E = Hémalun-Eosine

IHC = Immunohistochimie

LP = Lysat plaquettaire

Mb = Membrane de collagène

MO = Moelle osseuse

MO-MSCs = MSCs dérivées de la moelle osseuse

MSCs = Cellules Stromales Mésenchymateuses

MTI = Médicament de Thérapie Innovante

ND = Non différencié

PMO = Prélèvements Multi-Organes

SC = Tissu adipeux Sous-cutané

SC-ASCs = ASCs dérivées du tissu adipeux sous-cutané

SVF= Sérum de veau fœtal

TA = tissu adipeux

TDM = Tomodensitométrie

Introduction

Les lésions des os maxillaires, mandibulaires et de la face sont des pathologies aujourd'hui très fréquemment rencontrées en médecine humaine. Elles sont consécutives à des accidents, des chirurgies, des processus tumoraux ou encore à la prise de certains traitements. En effet la prise en charge de certaines pathologies ostéolytiques et néoplasiques nécessite l'emploi de molécules anti-résorptives comme les bisphosphonates (Marx, 2003; Hewitt et Farah, 2007; Najm *et al.*, 2008; Gavaldà et Bagan, 2016) qui peuvent favoriser les ostéonécroses des mâchoires. Ces lésions induisent une perte de volume osseux, qui se complique souvent de processus inflammatoires et qui péjorent les chances de guérison (Lesclous *et al.*, 2009). Ces atteintes osseuses peuvent *in fine* significativement réduire la qualité de vie des patients, en créant des communications bucco-sinuses, et en limitant la fonction masticatoire. A cela peuvent s'ajouter des gênes concernant la communication orale, ainsi que des enjeux d'ordre esthétique, qui influent directement sur la vie sociale des patients.

La prise en charge des lésions osseuses fait à ce jour intervenir différentes techniques de reconstruction, telles que la greffe d'os autologue ou de substituts osseux, associées ou non à des facteurs de croissance comme les Bone Morphogenic Protein (BMP) qui stimulent la production osseuse (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018), permettant une ostéo-conduction en 3D. Depuis plusieurs années, des « thérapies innovantes » basées sur l'utilisation de Cellules Stromales Mésoenchymateuses (MSCs) ont été développées dans le domaine de la reconstruction osseuse en général, et à la reconstruction maxillo-faciale en particulier, afin d'offrir une alternative efficace à la greffe osseuse autologue (Bajestan *et al.*, 2017; Varshney *et al.*, 2020).

Nous présenterons dans une première partie une étude bibliographique traitant des enjeux cliniques liés à la présence de lésions osseuses maxillo-faciales, ainsi que les nouveaux Médicaments de Thérapie Innovante développés pour leur prise en charge.

Dans une deuxième partie, nous exposerons le travail expérimental réalisé, ayant pour objet l'étude comparée des propriétés ostéogéniques de cellules stromales mésoenchymateuses dérivées du corps adipeux de la bouche ou du tissu adipeux sous-cutané, dans un contexte de lésion osseuse de taille critique chez la souris.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Biologie de l'os et mécanismes du remodelage osseux

A. Structure de l'os

Le squelette correspond à l'architecture rigide du corps. Il se compose d'os qui peuvent être regroupés en deux catégories. On retrouve en effet des os longs, tels que le fémur ou l'humérus et les os plats, comme l'os de la scapula, de l'ilium, les os du crâne et de la mandibule. Nous nous intéresserons principalement aux os plats du crâne, aussi nommés os de la calvaria, dans la suite de ce travail.

Le squelette étant en permanence soumis à de nombreuses contraintes mécaniques, la structure des os est fondamentale pour permettre sa résistance et sa solidité aux événements de compression, de traction, d'étirement.

L'os est un tissu conjonctif spécialisé, composé d'une matrice extra-cellulaire riche en constituants organiques et non organiques, ainsi que de composés cellulaires.

1. Structure générale des os plats du crâne

L'ossification primaire des os plats se fait par un mécanisme endo-membraneux ou endo-conjonctif, au cours duquel les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes au sein d'une trame fibreuse. Ces cellules vont synthétiser la matrice osseuse sur laquelle une ossification secondaire aura lieu, avec la minéralisation et le réarrangement de l'os compact en lamelles parallèles.

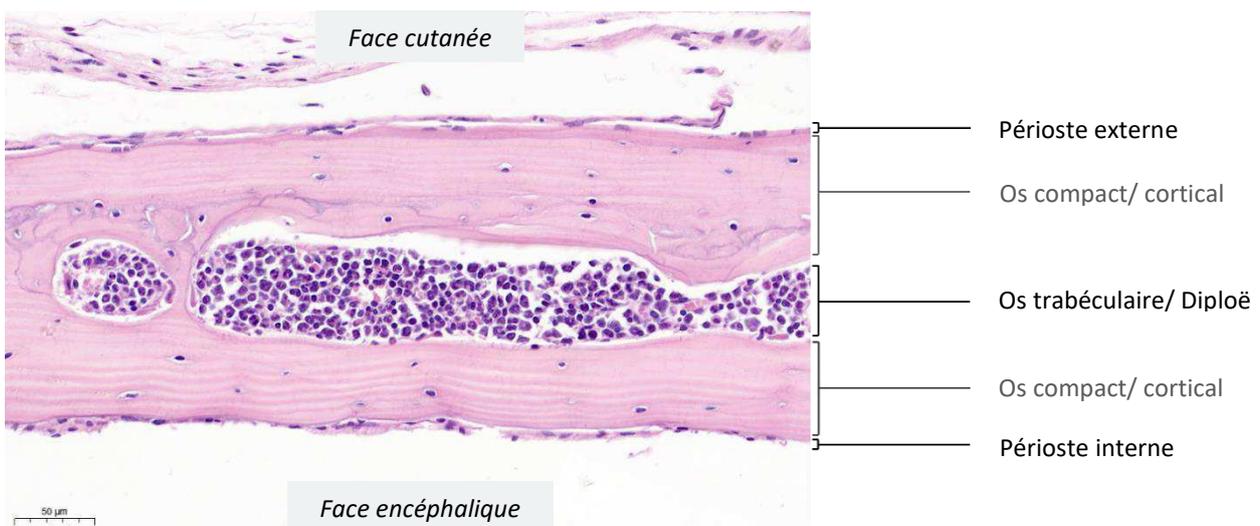


Figure 1– Structure générale d'un os de calvaria de souris.

(Source : photographie personnelle, LabHPEC).

La structure finale des os plats du crâne comprend de la couche la plus externe à la plus interne : le périoste externe, qui est un tissu conjonctif hébergeant les cellules ostéoprogénitrices, puis une couche d'os dit lamellaire aussi appelé os compact. On retrouve au cœur de l'os une région trabéculaire ou Diploë d'aspect spongieux et qui contient la moelle osseuse, puis une nouvelle couche d'os lamellaire. Enfin un périoste en contact étroit avec la dure mère constitue la couche la plus profonde (Figure 1) (Bacha et Bacha, 2012).

2. Matrice extra-cellulaire osseuse

La matrice extra-cellulaire osseuse comprend une fraction organique, composée en majorité de collagène de type I (90%) (Moreira *et al.*, 2000), ainsi que de protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine, les sialoprotéines osseuses ou les phosphoprotéines, qui participent au processus de minéralisation osseuse en fixant les ions calcium (Cremers *et al.*, 2008). Au sein de l'os compact mature et sain, le collagène s'organise sous forme de lamelles parallèles et régulières, étroitement liées, permettant la résistance mécanique de l'os lors de contraintes d'étirement (Figure 2).

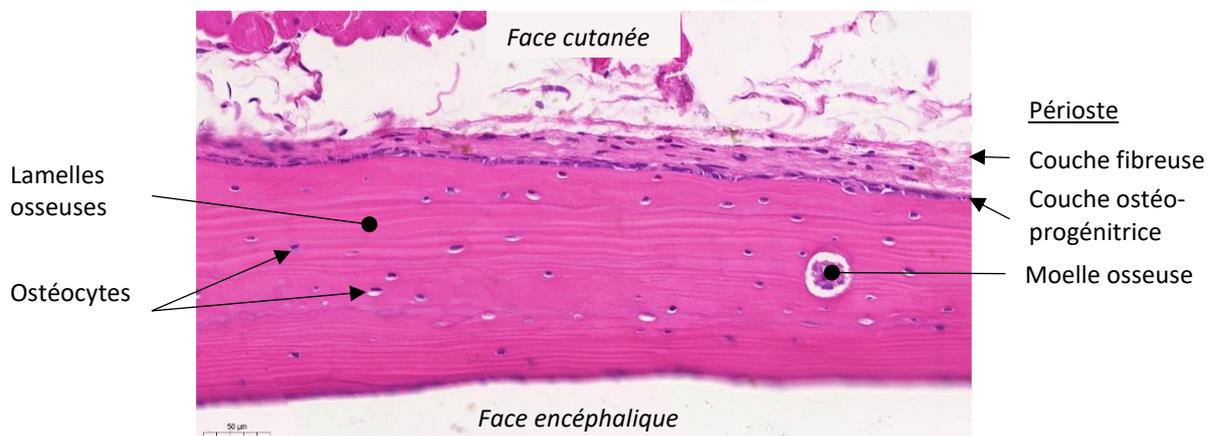


Figure 2- Structure histologique de la calvaria de souris.

(Source : photographie personnelle, LabHPEC).

L'os comprend également une fraction matricielle minérale, constituée en majeure partie de phosphates de calcium (Ca^{2+} et PO_4^{3-}) sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), qui s'associent entre et autour des fibres de collagène, et confèrent à l'os sa solidité et sa résistance à la compression (Figure 3) (Cui *et al.*, 2007).

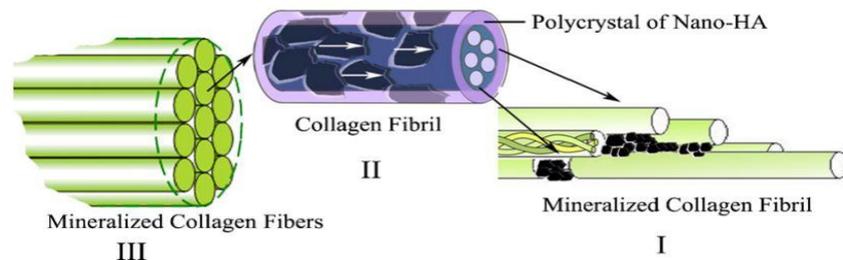


Figure 3- Niveaux d'organisation structurelle des fibres de collagène et des cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice osseuse. HA : Hydroxyapatite.

(Source : Cui, F. *et al.*, 2007).

3. Composante cellulaire de l'os

Plusieurs cellules spécialisées sont retrouvées dans la matrice osseuse ou en surface de l'os :

- Les ostéoblastes, hébergés dans la couche interne du périoste, qui ont pour fonction majoritaire de synthétiser la matrice osseuse riche en collagène, appelée ostéoïde. Les ostéoblastes sont des ostéoprogéniteurs dérivés des cellules stromales mésenchymateuses, et activés sous l'action de facteurs de croissance tels que les Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7). Ces derniers orientent la différenciation des progéniteurs en induisant l'expression du facteur de transcription Cbfa1, aussi nommé Runx2 (Ducy, 2000; J. B. Lian *et al.*, 2004; Marie, 2001) (Figure 4).

Les ostéoblastes présentent une organisation épithélioïde, et deviennent cubiques suite à leur activation. Ils synthétisent alors de l'ostéoïde riche en collagène, et vont également réguler sa minéralisation, notamment grâce à la synthèse de phosphatase alcaline (Figure 5) (Kierszenbaum, 2006).

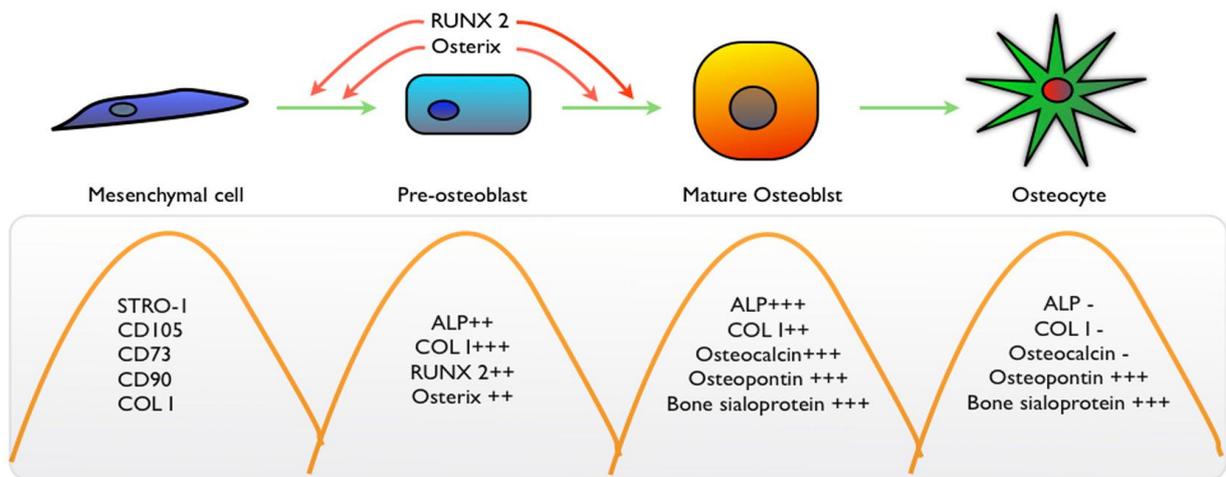


Figure 4-Expression séquentielle des gènes de différenciation ostéoblastique.

La différenciation ostéoblastique est initiée par les facteurs de transcription Runx2 et Ostérix, depuis le stade de cellules stromale mésenchymateuse jusqu'au stade de différenciation le plus avancé : l'ostéocyte. Les gènes de différenciation sont exprimés de manière séquentielle.

(Source : Miron, RJ.et al., 2012).

- Les ostéocytes sont des ostéoblastes piégés dans la matrice osseuse néoformée (Figure 2 et Figure 5). Ils sont ramifiés et reliés entre eux par des jonctions communicantes, et perçoivent leurs nutriments ainsi que des messagers chimiques via les réseaux vasculaires de leur environnement proches (jusqu'à 100 μm). Leur fonction est de maintenir l'intégrité de la matrice osseuse (Kierszenbaum, 2006).

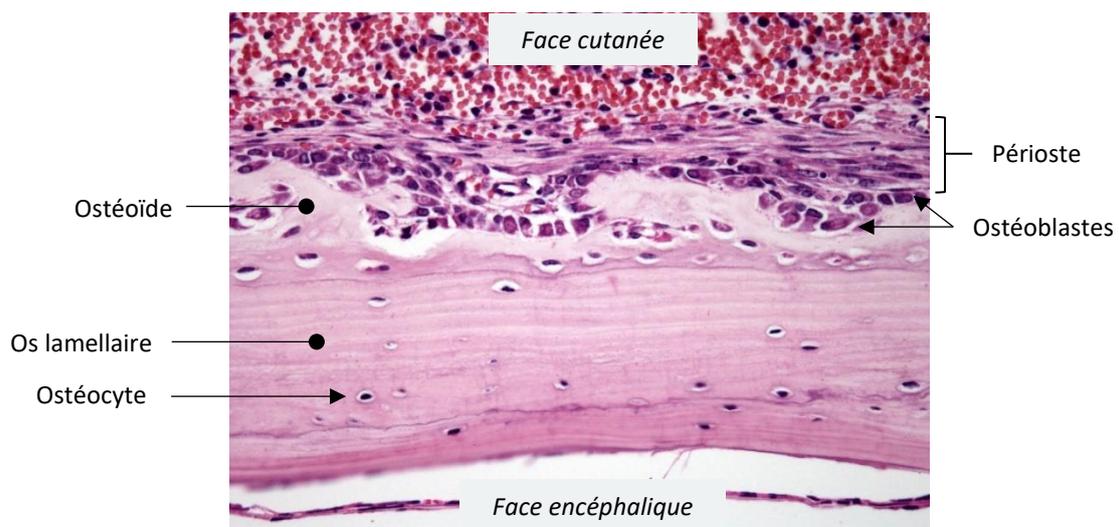


Figure 5- Structure histologique de la calvaria de souris siège d'un remodelage osseux, avec apposition d'ostéoïde par les ostéoblastes activés HE, x100.

(Source : photographie personnelle, LabHPEC).

- Les ostéoclastes, qui sont les cellules responsables de la résorption osseuse, dérivent de la lignée myéloïde. Ils proviennent de la différenciation de monocytes ou de macrophages en précurseurs d'ostéoclastes sous l'action du M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor). Ce dernier induit l'expression du récepteur RANK à la surface des précurseurs otéoclastiques : ils sont alors réceptifs à la présence des ligands de RANK (RANKL) qui induisent la conversion des précurseurs d'ostéoclastes en ostéoclastes actifs (Figure 6) (Boyle *et al.*, 2003).

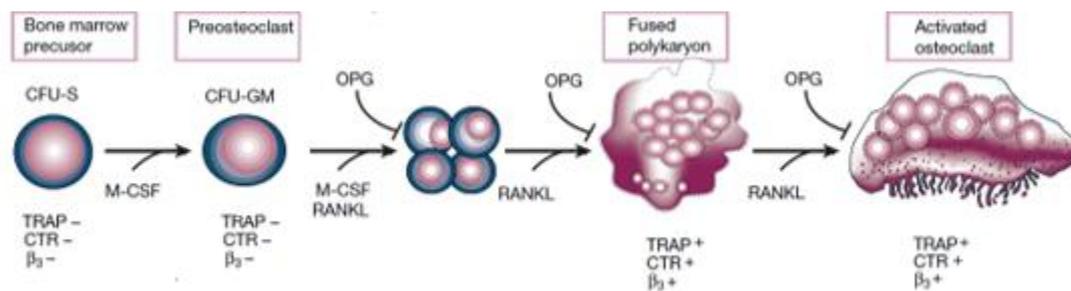


Figure 6- Séquence de différenciation des ostéoclastes à partir de la lignée myéloïde.

β_3 : Intégrine β_3 ; CFU-GM : Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage; CTR : Récepteur à la Calcitonine; M-CSF: Macrophage- Stimulation Factor ; OPG : Ostéoprotégérine ; RANK : Receptor Activator of NF- κ B, RANKL: Ligand du récepteur RANK ; TRAP : Enzyme Tartrate Resistant Acide-Phosphatase.

(Source : modifié depuis Boyle, W.J. *et al.*, 2003).

La cytokine RANKL appartient à la famille des Tumor Necrosis Factor (TNF), produites par les ostéoblastes et les lymphocytes T (Takayanagi, 2007), notamment sous l'action de l'hormone parathyroïdienne, de la Vitamine D (1,25-dihydroxyvitamin D), des corticostéroïdes ou encore de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6) (Boyle *et al.*, 2003). Une fois activés, les ostéoclastes induisent la résorption osseuse par dissolution acide des composés calciques, grâce à l'action d'enzymes protéolytiques telles que la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP), la cathepsine K ou la métalloprotéase 9 (Figure 6 et Figure 7) (Kierszenbaum, 2006).

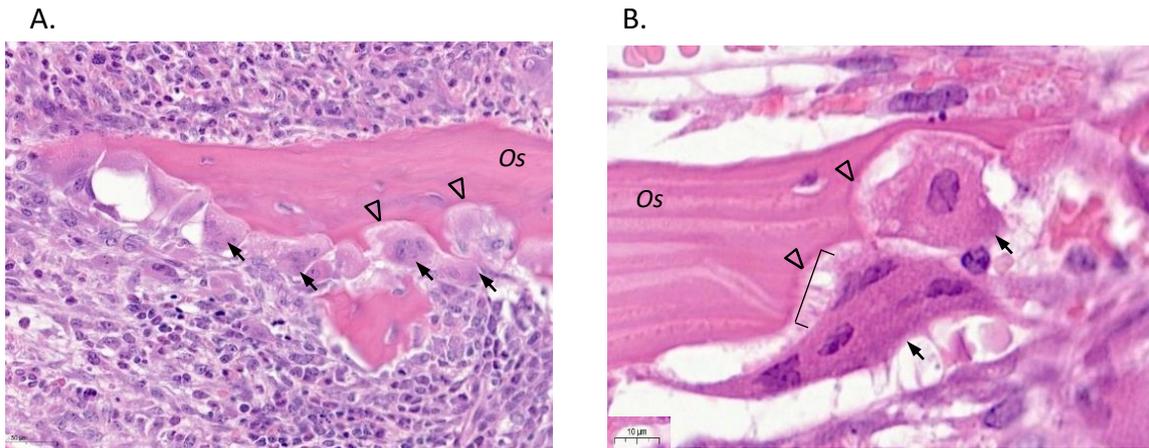


Figure 7- Résorption osseuse de la calvaria par les ostéoclastes dans un contexte inflammatoire, HE.

A. Ostéoclastes activés (\blackrightarrow), réalisant la résorption de l'os de la calvaria. **B.** Morphologie des ostéoclastes, présentant un aspect plurinucléé, et une organisation polarisée par la présence d'une bordure en brosse au contact de la matrice osseuse ([]). **A et B.** On visualise les lacunes de Howship (Δ), sièges de la dissolution de l'os.
(Source : photographies personnelles, LabHPEC)

B. Mécanismes physiologiques du remodelage osseux

Le squelette subit un remodelage permanent, qui permet son renouvellement régulier. Ce remodelage est progressif, puisqu'on estime que 30% du squelette est renouvelé chaque année. Il correspond à l'action conjointe de résorption par les ostéoclastes, et d'ostéoproduction par les ostéoblastes. La phase de résorption est la plus précoce et la plus rapide, et dure environ 3 jours. S'ensuit une apposition d'os néoformé, plus longue, se déroulant sur plusieurs mois (environ 3 mois). Chez un individu sain, ces deux processus se compensent complètement, et permettent le maintien du volume et de la densité osseuse.

Ce remodelage peut ainsi être initié au travers de différents évènements :

- La régulation du métabolisme phosphocalcique : elle implique l'action d'hormones thyroïdiennes telles que la PTH qui accroît la résorption osseuse, et l'ostéocalcine qui augmente le stockage osseux du calcium et donc favorise l'ostéoproduction. L'hormone stéroïdienne Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamine D) favorise le turnover osseux en induisant la synthèse d'ostéocalcine et de RANKL par les ostéoblastes, et donc le dépôt de calcium dans la matrice osseuse, et l'activation des ostéoclastes.

- La stimulation mécanique de l'os : les contraintes de compression/ tension, sont également un facteur majeur de la régulation du remodelage osseux. Ces contraintes mécaniques sont perçues et transmises au sein des réseaux d'ostéocytes, et stimulent la

production de médiateurs tels que l'ostéopontine, qui régulent le recrutement de cellules stromales mésenchymateuses, et induisent l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes (Uda *et al.*, 2017). L'augmentation des charges est généralement associée à une stimulation des ostéoblastes, tandis qu'une réduction des contraintes appliquées à l'os agit en faveur de sa résorption.

Les médiateurs associés à l'activation des ostéoblastes regroupent de nombreux facteurs de croissance tels que les BMPs, TGF- β , IGF-I et II, PDGF. L'activation des ostéoclastes quant à elle est stimulée par des facteurs de croissance (TNF, PDGF, M-CSF) et des cytokines (IL-1, IL-6, PGE₂) (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006).

Dans certains contextes cliniques, l'intégrité osseuse est compromise, ce qui peut s'accompagner de la perte d'équilibre entre production et résorption osseuse, de manière locale, ou systémique. Cela peut être à l'origine de diverses pathologies, et nous nous intéresserons plus particulièrement aux pathologies osseuses appliquées aux régions maxillo-faciales dans la suite de ce travail.

II. Contexte Clinique des lésions osseuses maxillo-faciales

A. Etiologies des lésions osseuses maxillo-faciales

Les atteintes de la région maxillo-faciale sont des pathologies très fréquentes, aux étiologies variées. Elles intéressent aussi bien les tissus mous que la charpente osseuse. Leurs conséquences peuvent être d'abord fonctionnelles, puisque la fonction masticatoire et la communication orale découlent directement de l'intégrité des structures de la sphère buccale et péri-buccale. Mais les conséquences sont également esthétiques et sociales, puisque la modification des reliefs et volumes faciaux peut conduire à un changement de perception du patient vis-à-vis de sa propre image, ou par son entourage familial et professionnel.

On peut regrouper les lésions des tissus osseux en deux grandes catégories : les lésions d'origine non néoplasique et les lésions d'origine néoplasique (Figure 8).

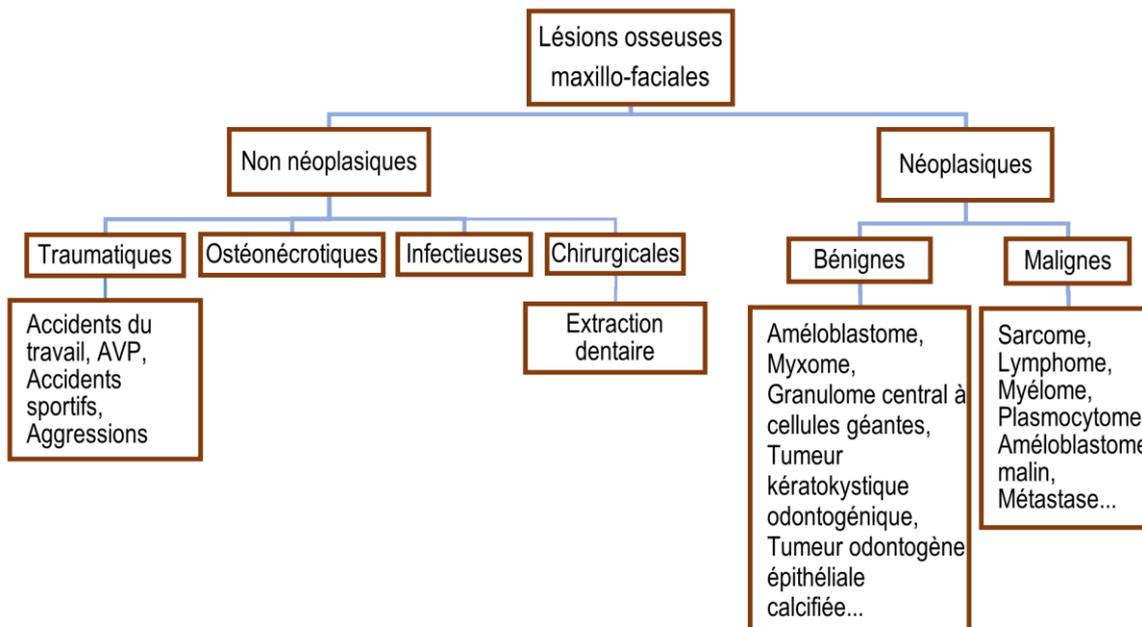


Figure 8- Figure 8- Organigramme récapitulatif des causes menant à des lésions osseuses maxillo-faciales chez l'homme.

(Source : Inspiré de Horrion, J. et al., 2019 ; Herve, V. et al., 2018)

1. Les lésions d'origine non néoplasique

Les lésions osseuses maxillo-faciales non néoplasiques ont de nombreuses origines. On retrouve d'abord les événements traumatiques, conduisant à des fractures mandibulaires, faciales ou nasales. La cause traumatique est prédominante chez des sujets masculins, suite à des accidents de la voie publique (AVP), des agressions de la voie publique, accident du travail ou suite à la pratique sportive. Les femmes seraient plutôt concernées par des contextes d'AVP ou encore d'accidents domestiques. L'âge de la majorité des individus touchés par les lésions maxillo-faciales est compris entre 10 et 30 ans (Herve, 2018). Les chirurgies dentaires, dont les extractions dentaires multiples, induisent aussi des pertes de substance osseuse parfois importante.

Les processus infectieux induisent également des lésions osseuses, notamment des ostéomyélites, ou encore des phénomènes ostéo-nécrotiques (Horrion et Milicevic, 2019).

Les ostéonécroses sont aussi rencontrées suite à des traitements de radiothérapie ou à base de molécules anti-résorptives et anti-angiogéniques comme les bisphosphonates (Marx, 2003; Hewitt et Farah, 2007; Najm et al., 2008; Gavalda et Bagan, 2016). Ces derniers sont employés pour lutter contre la résorption osseuse liée à une pathologie primaire atteignant l'os, de

nature néoplasique (myélome multiple, métastases osseuses de tumeur mammaire...) ou non (ostéoporose, maladie de Paget). Les conséquences pathologiques de ces traitements sont souvent mises en évidence de manière fortuite lors de consultations ou chirurgies dentaires (Horrión et Milicevic, 2019).

2. Les lésions d'origine néoplasique

Les processus néoplasiques sont à l'origine de modifications de l'architecture osseuse, d'autant plus que leur prise en charge implique une résection chirurgicale. De nombreuses tumeurs induisent une ostéolyse marquée (améloblastome, granulome à cellules géantes, fibrome améloblastique, fibrome odontogénique, dysplasies cémento-osseuses...), ou des tuméfactions locales (améloblastome, sarcome, cémentoblastome bénin, dysplasie cémento-osseuse, hémangiome osseux...). Dans la plupart des cas, ces pathologies sont mises en évidence chez des individus d'âge compris entre 30 et 50 ans (Faure *et al.*, 2020).

B. Prise en charge des lésions osseuses maxillo-faciales

La prise en charge de traumatismes osseux, et a fortiori localisés en région maxillo-faciale, implique une succession de procédures permettant de réduire les fractures, et recréer les volumes et reliefs du visage. On peut ainsi employer des dispositifs prothétiques, des biomatériaux, voire faire appel à l'ingénierie tissulaire qui permettront de supporter la réhabilitation osseuse.

1. Les Biomatériaux utilisés en réparation osseuse

Les biomatériaux sont définis d'après le consensus de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux établi en 1986, comme étant des matériaux non vivants et élaborés dans le but d'interagir avec des systèmes biologiques (Williams et Zhang, 2019). La finalité de leur emploi peut être de remplir une fonction thérapeutique, notamment par substitution ou soutien à des organes ou tissus, mais également de participer à la réalisation d'une opération diagnostique.

Ces matériaux doivent satisfaire à plusieurs exigences, la première étant la biocompatibilité, afin de réduire les réactions inflammatoires et allergiques chez le receveur. Concernant l'application des biomatériaux à un contexte de réparation osseuse, s'ajoutent la nécessité d'utiliser un matériau qui permette une ostéo-conduction, une ostéo-induction, et qui

présente des propriétés de stérilité, porosité, résorbabilité, malléabilité et résistance aux contraintes mécaniques qui soient adaptées au contexte d'utilisation clinique (Offner, 2017). On pourrait séparer les biomatériaux en deux grandes familles, selon qu'ils soient de nature synthétique ou naturelle.

a) Les biomatériaux synthétiques

De nombreux matériaux synthétiques ont été employés depuis plusieurs décennies. Les métaux ont été parmi les premiers employés, et sont composés d'argent, d'acier inoxydable, de Titane, ou encore d'alliages de chrome-cobalt. On retrouve également l'emploi de céramiques de phosphates ou sulfates de calcium, et de bio-verres. Enfin, des matériaux polymères tels que le polyéthylène, le chlorure de polyvinyle sont aussi fréquemment utilisés.

b) Les biomatériaux naturels

Concernant les matériaux d'origine naturelle, il est d'usage de faire appel à des greffes osseuses. L'autogreffe, par un greffon prélevé sur le patient lui-même, est l'une des techniques de référence dans la prise en charge de la réparation osseuse. Les allogreffes issues de prélèvement *post mortem* et conservés dans des banques d'os, et enfin les xéno-greffes provenant d'une autre espèce animale (bovine ou porcine) sont d'autres biomatériaux disponibles (Dimitriou *et al.*, 2011; Offner, 2017). Les sites de prélèvement les plus employés comprennent la crête iliaque, les côtes, le menton, la mandibule. Contrairement aux allogreffes et xéno-greffes, les auto-greffes permettent de s'affranchir des contraintes liées à la compatibilité donneur-receveur et de bénéficier des cellules progénitrices et facteurs présents dans les greffons. Néanmoins, la procédure de prélèvement crée un site chirurgical supplémentaire pour le patient, ce qui constitue une source de comorbidités en raison de la douleur et du risque septique.

Les greffes osseuses offrent l'avantage de présenter une architecture optimale pour la conduction osseuse, ainsi que des propriétés ostéoinductives et ostéogéniques intrinsèques du fait de la persistance de facteurs de croissance et de cellules ostéo-progénitrices (Dimitriou *et al.*, 2011). Cependant, dans le cadre de lésion osseuses étendues, le volume de greffe disponible est souvent insuffisant. Il est alors nécessaire de mettre au point des matériaux disponibles en quantité, et capables de soutenir efficacement de tels contextes lésionnels.

On emploie aussi très fréquemment des substituts dérivés de produits biologiques, comme des matrices osseuses décellularisées, du collagène ou de l'hydroxyapatite biologique.

2. L'ingénierie tissulaire

Les thérapies visant la réparation tissulaire ont gagné en complexité, avec pour objectif de recréer des tissus entiers, afin de « restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus » (Langer et Vacanti, 1993). L'ingénierie tissulaire osseuse s'applique ainsi à associer un support ou biomatériau (os déminéralisé, hydroxyapatite, β -TCP, éponges de collagène...), des cellules (cellules stromales mésenchymateuses, cellules souches pluripotentes induites...) et des facteurs de croissance (BMPs, IGF...), afin d'élaborer des structures biologiquement actives ayant des propriétés physiques proches de celles des tissus cibles. L'assemblage et la maturation de ces éléments peut être faite au chevet du patient ou encore après une période d'incubation *in vitro* ou *in vivo* (Catros *et al.*, 2010; Wei et Dai, 2021).

Dans le cas de la réparation osseuse maxillo-faciale, on cherche à obtenir des matériaux aux propriétés de résistance mécanique compatibles avec la localisation péri-orale, et offrant une revascularisation efficace (Catros *et al.*, 2010).

L'ingénierie tissulaire et ses applications appartiennent en réalité à la plus large famille des médicaments de thérapies innovantes, qui offrent aujourd'hui de nombreuses perspectives pour la prévention ou le traitement de multiples pathologies.

C. **Le développement des médicaments de thérapies innovantes**

1. Définition réglementaire

D'après l'article 2 du Règlement (CE) N°1394/2007 du Parlement Européen et du Conseil du 13 Novembre 2007 et la Directive 2001/83/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain, 2001, les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) sont des médicaments élaborés à partir de matériel biologique. Ils ont pour fonction de traiter certaines maladies, et prévenir ou restaurer la fonction de tissus ou organes. Ils regroupent quatre sous-catégories de médicaments :

- **Les médicaments de thérapie génique** : contenant un acide nucléique recombinant afin d'ajouter ou supprimer, remplacer, réparer ou réguler l'expression d'une séquence génétique, et dont les effets sont permis par cet acide nucléique ou par le produit de son expression.

- **Les médicaments de thérapie cellulaire somatiques** : ils contiennent des cellules ou tissus possédant des propriétés curatives/ préventives voire diagnostiques après avoir « fait l'objet d'une manipulation substantielle pour en modifier les caractéristiques biologiques, fonctions physiologiques ou propriétés structurelles » ou ne doivent pas être « destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur ».
- **Les médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire** : élaborés à partir de cellules ou tissus viables ou non, soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, fonctionnelles ou structurelles permettant la régénération, la réparation ou le remplacement des tissus ciblés, sans être destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur.
- **Les médicaments combinés de thérapie innovante** : qui se composent d'au moins un dispositif médical ou dispositif médical implantable actif, ainsi que de cellules ou tissus viables, ou non viables tels que ceux cités précédemment, conservant des propriétés bénéfiques en addition du dispositif médical utilisé.

D'après Hanna et al, les médicaments de thérapie génique ou d'ingénierie cellulaire/ tissulaire représentent chacun environ 22% des essais cliniques publiés entre 1999 et 2015 dans le monde. Le développement de médicaments de thérapie cellulaire somatiques représente quant à lui plus de la moitié des essais cliniques sur cette période (Hanna *et al.*, 2016).

Les pathologies ciblées sont majoritairement des cancers (25%). Les pathologies de l'appareil musculosquelettique quant à elles se placent en quatrième position des pathologies ciblées par ces thérapies (10%), dont plus de la moitié concernant des pathologies osseuses.

Les médicaments de thérapie cellulaire somatique suscitent donc un intérêt croissant dans le paysage des thérapies innovantes. Elles comprennent l'emploi de cellules souches, qui peuvent être pluri- ou multipotentes, comme les cellules stromales mésenchymateuses (Kolios et Moodley, 2013).

2. Les Cellules Stromales Mésenchymateuses

Les Cellules Stromales Mésenchymateuses (MSCs) sont des cellules multipotentes, présentes dans de nombreux tissus. Elles participent au maintien de l'homéostasie tissulaire, mais également à la régénération des tissus ayant subi des dommages (Caplan et Dennis, 2006).

Elles ont d'abord été mises en évidence dans la moelle osseuse, et décrites pour la première fois par Friedenstein dans les années 70, en tant que cellules possédant une morphologie « fibroblast-like », et correspondant à une source de progéniteurs différente de la lignée hématopoïétique (Figure 9) (Friedenstein *et al.*, 1974; Owen et Friedenstein, 1988).

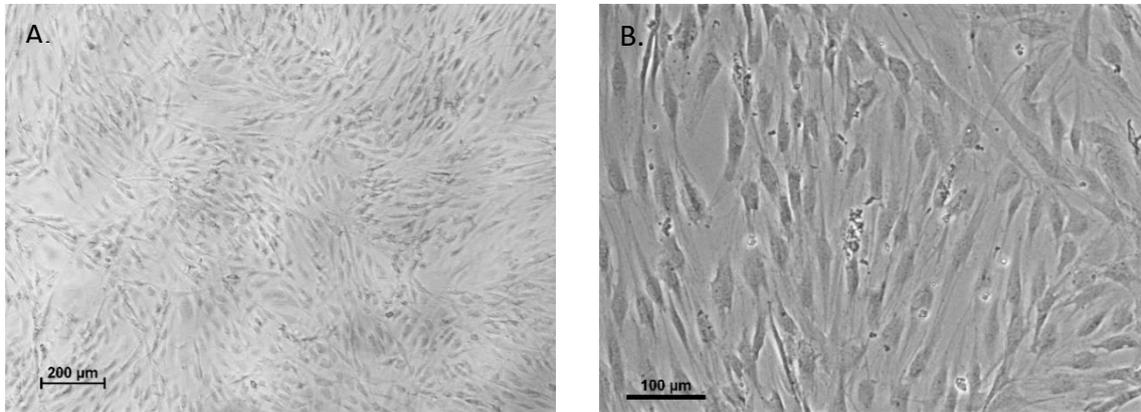


Figure 9- Aspect microscopique des ASCs en culture: les cellules adoptent une morphologie de type fibroblast-like, fuselée et avec de longs prolongements cytoplasmiques. **A.** CAB-ASCs, x4 ; **B.** SC-ASCs, x10.

(Source : photographies personnelles, RESTORE).

Depuis, les MSCs ont été isolées à partir de nombreux tissus (Meirelles *et al.*, 2006), comme le tissu adipeux (Paduano *et al.*, 2017; Zuk *et al.*, 2002), le placenta, la pulpe dentaire (Rikitake *et al.*, 2021; Shi et Gronthos, 2003), le parodonte (Fageeh, 2021), le derme (Vaculik *et al.*, 2012), et les ligaments. Dans l'objectif d'homogénéiser la caractérisation des MSCs étudiées dans la littérature, l'International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) a déterminé les critères dits « minimaux » permettant de définir ces cellules (Dominici *et al.*, 2006): elles possèdent des propriétés d'adhérence aux supports plastiques, n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a) et endothéliaux (CD31), ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (HLA II), ce qui en fait des cellules peu immunogènes. Elles expriment aussi à leur surface d'autres récepteurs non spécifiques tels que le CD73 ou le CD90. Les MSCs peuvent également se différencier dans les lignées mésodermiques adipocytaire, chondroblastique et ostéoblastique lorsqu'elles sont placées dans des milieux de culture adaptés (Naji *et al.*, 2019). Cette dernière propriété constitue l'un de leurs intérêts dans le cadre de thérapies innovantes et de la médecine régénérative.

Leur utilisation a pour objectif principal de stimuler les mécanismes physiologiques permettant la régénération tissulaire. Ces effets sont permis notamment par une action paracrine des MSCs, largement reconnue dans la littérature. De nombreux facteurs de

croissance et cytokines à action pléiotrope sont produits par les MSCs (Figure 10) : ils permettent de stimuler l'angiogenèse (Kinnaird *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2018; M. Lian *et al.*, 2021), d'augmenter la survie cellulaire, et de promouvoir l'immunomodulation (Eggenhofer et Hoogduijn, 2012; Saeedi *et al.*, 2019). Certains facteurs induisent le recrutement et la différenciation cellulaire, comme des ostéoprogéniteurs et leur différenciation en ostéoblastes et ostéocytes, ce qui permet le soutien de la régénération osseuse (Benda et Weyand, 2013; Linero et Chaparro, 2014; M. Lian *et al.*, 2021).

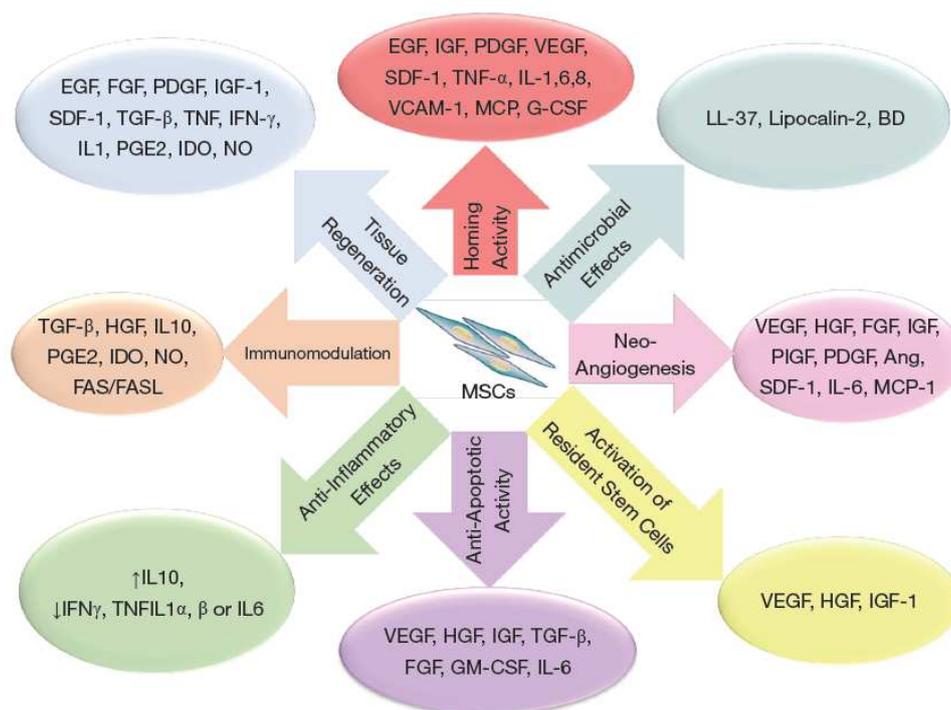


Figure 10 - Sécrétome associé aux propriétés thérapeutiques des MSCs.

Les MSCs sécrètent de nombreux facteurs à action pléiotrope, stimulant les mécanismes associés à la régénération cellulaire et tissulaire.

(Source : Saeedi. P *et al.*, 2019)

3. L'emploi thérapeutique des cellules stromales mésenchymateuses

Les MSCs sont aujourd'hui largement étudiées pour leurs aptitudes à supporter la régénération tissulaire et notamment la réparation osseuse, mais aussi pour leurs propriétés immunomodulatrices. Les domaines ciblés par leur emploi sont vastes, mais incluent dans la majorité des cas la prise en charge des pathologies à médiation immunitaire (auto-immunes, inflammations sévères, rejets de greffes) (English *et al.*, 2010; Willekens *et al.*, 2021), dégénératives (cirrhoses hépatiques, diabète, fibroses hépatiques) (Hickson *et al.*, 2021;

Sávio-Silva *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2012), et orthopédiques (fractures, atteintes tendino-ligamentaires) (Hogan *et al.*, 2011; Stanovici *et al.*, 2016; Naji *et al.*, 2019).

Les MSCs les plus employées à ce jour sont celles dérivées de la moelle osseuse (BM-MSCs). En 2019, elles étaient employées dans 40% des essais cliniques de thérapies cellulaires en cours (Naji *et al.*, 2019). Elles constituent environ 0,00001% à 0,01% de la fraction cellulaire de la moelle osseuse, et se différencient dans les lignées adipocytaire, chondroblastique et ostéoblastique (Pittenger, 1999; Wexler *et al.*, 2003). Cependant, le prélèvement de moelle osseuse constitue une source de comorbidité supplémentaire pour les patients, et la quantité de moelle osseuse disponible reste limitée. Plus récemment, un intérêt croissant s'est porté sur le tissu adipeux, qui s'est révélé être une source plus riche en MSCs et beaucoup plus facile d'accès.

4. Les cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux

Le tissu adipeux est reconnu depuis de nombreuses années comme une source de MSCs, que l'on nomme « Adipose-derived Stromal Cells » (ASCs). Les ASCs sont extraites le plus souvent à partir de tissu adipeux sous cutané prélevé lors de liposuccions. La large distribution du tissu adipeux sous-cutané en fait un tissu facile d'accès, et dont le prélèvement est associé à moins de comorbidités que celui de la moelle osseuse.

Les ASCs, comme toutes MSCs, ont également la capacité de se différencier dans les trois lignées mésodermiques classiques (adipocytes, ostéoblastes, chondroblastes), et pourraient également se différencier en cardiomyocytes, myocytes, hépatocytes (Rada *et al.*, 2009) et seraient un support de l'angiogenèse (Planat-Benard *et al.*, 2004). Elles seraient moins fortement orientées dans la lignée ostéoblastique que les MO-MSCs, et auraient un meilleur potentiel de différenciation dans la lignée adipocytaire (Baptista, 2020).

Plusieurs études expérimentales ont déjà montré leur efficacité dans le cadre de la reconstruction osseuse faciale chez l'animal (rat, souris, chien) (Gaur et Agnihotri, 2021; T. Liu *et al.*, 2021), et des essais cliniques sont en cours de réalisation afin d'étudier leur efficacité en clinique chez l'homme (Paduano *et al.*, 2017). L'utilisation des ASCs comme thérapie pour la reconstruction osseuse permettrait de s'affranchir des contraintes liées au prélèvement de la moelle osseuse (Griffin *et al.*, 2014).

D. Le corps adipeux de la bouche: une source originale d'ASCs

Bien que le tissu adipeux sous-cutané soit une source d'ASCs de choix dans le cadre de thérapies cellulaires, son application en chirurgie maxillo-faciale implique néanmoins d'induire un site opératoire supplémentaire de prélèvement.

Depuis de nombreuses années, le tissu adipeux localisé au niveau de la face est employé en chirurgie orale. Il s'agit du corps adipeux de la bouche (CAB) ou boule de Bichat. De récentes études s'intéressent aux propriétés de ce tissu, avec l'hypothèse qu'il pourrait être une autre source d'ASCs, utilisables en clinique pour la reconstruction osseuse maxillo-faciale.

1. Localisation et topographie du corps adipeux de la bouche

Le corps adipeux de la bouche est un tissu de nature adipeuse, d'un volume équivalent à 10 mL, et localisé dans l'espace buccal chez l'Homme (Tostevin et Ellis, 1995).

Il est enserré du fascia bucco-pharyngé et bucco-temporal, et participe à la formation de la syssarcome manducatrice en association avec les muscles temporaux, masséter et ptérygoidien latéral, dont il permet le coulissement. Il se compose d'un corps, qui est la portion la plus volumineuse de ce tissu, ainsi que de nombreux prolongements : le prolongement orbitaire, temporal superficiel, temporal profond, sphéno-palatinal, interptérygoidien, mandibulaire et le prolongement buccal (Dumont *et al.*, 2007). Le CAB est également un tissu richement vascularisé, à partir de l'artère buccale, qui correspond à une ramification de l'artère maxillaire interne (Figure 11) (Tostevin et Ellis, 1995).

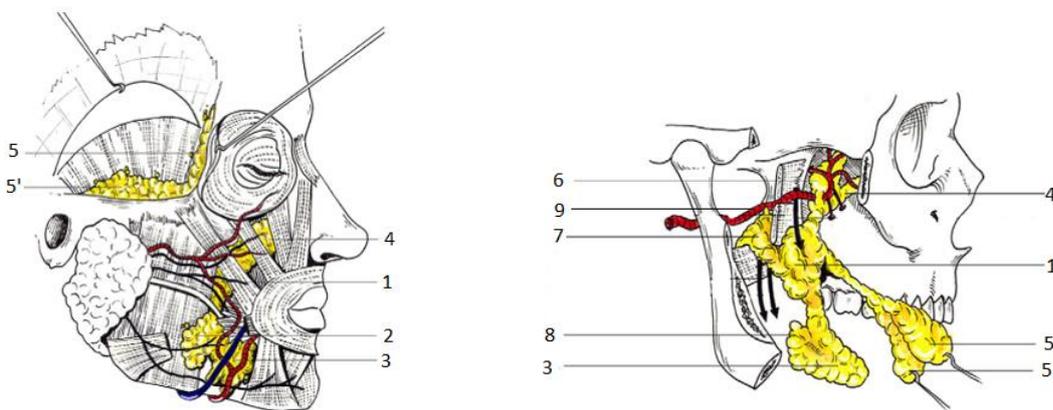


Figure 11- Anatomie du corps adipeux de la bouche.

1. Corps, 2. Prolongement masséterin, 3. Prolongement buccal, 4. Prolongement orbitaire, 5 et 5'. Prolongements temporaux superficiels et profonds, 6. Prolongement sphéno-palatinal, 7. Prolongement interptérygoidien, 8. Prolongement mandibulaire, 9. Artère maxillaire interne.

(Source : Modifié d'après les figures de Dumont.T et al., 2007)

2. Fonction

Bien que la fonction exacte du corps adipeux de la bouche n'ait pas encore été élucidée, certains auteurs considèrent que le CAB serait uniquement un tissu de remplissage, mais il semble qu'il puisse néanmoins jouer un rôle dans la fonction d'alimentation chez le nourrisson, en facilitant la succion.

3. Utilisation du CAB en clinique

Le CAB est un tissu bien connu en chirurgie orale. L'une de ses premières utilisations en chirurgie est réalisée en 1977 par Egyedi sur 3 patients pour la fermeture de la communication oro-nasale induite par une résection tumorale du palais dur (Egyedi, 1977).

Depuis, son emploi s'est largement démocratisé, pour le traitement des défauts divers, induits par des maxillectomies (Vuillemin *et al.*, 1988), des résections tumorales ou énucléations kystiques (Martín-Granizo *et al.*, 1997), pour la fermeture de communications oro-sinusale ou de fistules (Martín-Granizo *et al.*, 1997; Rathod *et al.*, 2021), ou encore pour réaliser le recouvrement de récessions gingivales (El Haddad *et al.*, 2008).

4. Cellules stromales mésenchymateuses du CAB

Bien que le CAB soit largement employé en chirurgie orale sous sa forme tissulaire, peu de travaux se sont intéressés aux propriétés des cellules qu'il contient.

De récentes études ont montré que comme tout tissu adipeux, le CAB contient également des ASCs (CAB-ASCs). Ces CAB-ASCs peuvent se différencier dans les lignées adipocytaire, chondroblastique et ostéoblastique (Farré-Guasch *et al.*, 2010). Broccaioli et al ont montré que les CAB-ASCs et les SC-ASCs issues de deux mêmes donneurs ont des capacités de différenciation dans la lignée adipocytaire identiques, et que les CAB-ASCs seraient plus orientées vers la lignée ostéoblastique (Broccaioli *et al.*, 2013). De plus, des études cliniques récentes montrent que l'utilisation de CAB-ASCs autologues favorise la réparation osseuse chez l'homme dans des contextes de lésions maxillaires et mandibulaires importantes, suite à des extractions dentaires ou énucléations kystiques (Khojasteh et Sadeghi, 2016; Khojasteh *et al.*, 2019; Meshram *et al.*, 2019).

Enfin, contrairement au TA du SC qui dérive du mésoderme embryonnaire, le CAB dérive de la crête neurale comme les autres tissus de la face (Billon et Dani, 2012), ce qui pourrait expliquer son efficacité dans le traitement des pathologies osseuses de la face, et suggère qu'il

pourrait être une source d'ASCs plus adaptées à des applications de reconstruction osseuses faciales.

III. Etude expérimentale de la reconstruction osseuse *in vivo* appliquée aux lésions maxillo-faciales.

A. Principes généraux des modèles de réparation osseuse *in vivo*

1. Considérations réglementaires et éthiques

La mise au point d'un modèle d'étude *in vivo* doit répondre à certains critères préalables. Les règles élémentaires de bonnes pratiques expérimentales et de bien-être animal sont les premières considérations à prendre en compte, en accord avec la réglementation Européenne (*Directive (CE) 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, J.O.U.E, L 276/33 du 20.10.2010, s. d.*). Les procédures doivent avoir fait l'objet de validation préalable devant un comité d'éthique. Les animaux employés doivent être disponibles, faciles à héberger et aisément manipulables par un personnel formé, pour permettre un suivi pré et post-opératoire satisfaisant (Li *et al.*, 2015).

En accord avec les recommandations de l'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging l'espèce choisie doit d'abord présenter une physiologie et une physiopathologie proche de celle de l'homme.

2. Critères généraux de choix d'un modèle de lésion osseuse *in vivo*

Afin de déterminer l'efficacité d'un protocole de réparation osseuse, il est nécessaire d'employer des modèles expérimentaux *in vivo*. Ces modèles permettent également de caractériser la biocompatibilité, les propriétés mécaniques et de résorption des matériaux employés pour promouvoir la fermeture du défaut osseux. Cela participe par la suite à la validation de leur emploi chez l'homme.

Comme évoqué précédemment, il est primordial que chez l'espèce animale choisie, la structure et la biologie de l'os subissant la lésion corresponde à celle des os ciblés dans l'application clinique finale humaine.

Le site lésionnel doit aussi être suffisamment stable, présenter un risque réduit de fractures secondaires, et inclure l'os cortical et spongieux. Enfin l'évolution de la lésion doit pouvoir être évaluée, grâce des méthodes invasives (chirurgicales, histologique) ou non (imagerie

tomodensitométrie...) (Bosch *et al.*, 1998). Les modèles employés aujourd'hui sont en grande majorité des modèles lésionnels dits de taille critique, ou « critical size defects » (CSD).

B. La lésion de taille critique de la calvaria : un modèle de lésion osseuse maxillo-faciale

1. Définition d'une lésion osseuse de taille critique

Une lésion osseuse de taille critique se définit comme la plus petite lésion ne pouvant donner lieu à une guérison complète et spontanée de l'os du vivant de l'animal, et sans ajout de matériel exogène (Schmitz et Hollinger, 1986).

De manière pratique, la taille de la lésion osseuse choisie pour la procédure expérimentale ne doit donc pas être inférieure à la taille dite « critique », définie pour l'espèce animale employée.

2. Cohérence biologique du modèle

L'os de la calvaria présente de nombreuses similarités avec celle des os de la face. Ces os possèdent une origine embryonnaire neurectodermique, et se sont formés grâce à un processus d'ossification endo-membraneuse. La structure de l'os de la calvaria est proche de celle des os de la face et des os alvéolaires.

Enfin, la calvaria est un os facile d'accès par des procédures chirurgicales simples, qui autorise peu de mobilité osseuse en post-opératoire, ce qui réduit les risques de fracture secondaire. Enfin, il est possible d'envisager un suivi non invasif tomodensitométrique de la taille de la lésion au cours du temps.

3. Espèces animales employées

Plusieurs espèces différentes peuvent être envisagées pour étudier la réparation osseuse d'une lésion calvariale (Schmitz et Hollinger, 1986; Y. Li *et al.*, 2015; Shanbhag *et al.*, 2017). La grande majorité des études utilisent des petits mammifères, comme les rongeurs (rat, souris), ou encore des lagomorphes (lapins). Ils ont pour avantage une facilité de contention et de manipulation, ainsi que de permettre l'optimisation des surfaces d'hébergement.

Des mammifères de plus grande taille comme les carnivores (chien) ou artiodactyles (porc) sont parfois employés, bien qu'ils soient plutôt utilisés dans des modèles de lésion de l'os alvéolaire mandibulaire. Ces derniers requièrent des surfaces d'hébergement plus conséquentes, ce qui est un inconvénient notable, et leur manipulation peut s'avérer plus

complexe et technique (Tableau 1). Enfin, les considérations éthiques liées au statut d'animal domestique du chien sont également un critère pris en compte lors du choix de l'espèce.

Tableau 1- Aperçu des modèles expérimentaux de lésion osseuse calvariale de taille critique utilisés dans la littérature.

Ordre	Espèce	Tailles des CSD de la calvaria	Avantages	Inconvénients
Rodentia	Souris	4 mm ^{[1], [2], [3], [4]} 5 mm ^[5] 6-8mm ^[6]	Manipulation aisée, petite taille, facilité d'hébergement, durée de vie compatible avec le suivi post-opératoire ^[14]	Taille de la zone opératoire restreinte et chirurgie délicate
	Rat	5 mm ^{[7], [8]} 8 mm ^[9]		
Lagomorpha	Lapin	5 mm ^[10] 15 mm ^[11]	Manipulation aisée, petite taille, facilité d'hébergement, durée de vie compatible avec le suivi post-opératoire ^[14]	
Carnivora	Chien	20 mm ^[12]	Anatomie et biologie osseuse comparable à l'homme	Animaux de grande taille, hébergement contraignant, statut d'animal domestique
Artiodactyla	Porc	10mm ^[13]	Anatomie, biologie osseuse et taux de remodelage similaires comparable à l'homme ^{[14], [15]}	Os dense, animaux de grande taille, parfois bruyants, manipulation et hébergement contraignants, agressivité possible ^[14]

[1] Ye et al., 2011, **[2]** Kim et al., 2010, **[3]** W. Li et al., 2018, **[4]** Má et al., 2021, **[5]** Rikitake et al., 2021, **[6]** Fan et al., 2021, **[7]** Johari et al., 2016, **[8]** Torquato et al., 2021, **[9]** Yoon et al., 2007, **[10]** Y. Liu et al., 2020, **[11]** G. Li et al., 2014, **[12]** Choi et al., 2016, **[13]** Wehrhan et al., 2012, **[14]** Y. Li et al., 2015, **[15]** Shanbhag et al., 2017.

**PARTIE II – ETUDE EXPERIMENTALE :
COMPARAISON DES CAB-ASCS ET SC-ASCS
COMME TRAITEMENT DE LESIONS OSSEUSES DE
TAILLE CRITIQUE DE LA CALVARIA CHEZ LA SOURIS**

L'objectif de notre projet est de comparer le potentiel ostéogénique *in vitro* et *in vivo* des CAB-ASCs et des SC-ASCs isolées à partir de tissu obtenus lors de prélèvement multi-organes (PMO) chez un même donneur. Pour cela, nous avons évalué leurs capacités de différenciations *in vitro* dans les 3 voies de différenciations mésodermiques. Puis nous avons comparé les capacités intrinsèques des SC-ASCs et CAB-ASCs à améliorer la reconstruction osseuse après 3 mois dans un modèle de lésion osseuse de taille critique chez la souris. Ce modèle, élaboré au laboratoire pour ce projet répond à la problématique d'absence de cicatrisation spontanée d'une lésion siégeant sur un os plat du crâne (Bosch *et al.*, 1998). Enfin nous avons évalué l'intérêt de l'association des ASCs à un biomatériau, dans la potentialisation de leur efficacité (Choi *et al.*, 2014).

I. Matériel et méthode

A. Etude des propriétés de différenciation des différentes populations d'ASCs *in vitro*

1. Procédure de prélèvements multi-organes

Le TA-SC et le CAB de 4 patients sont prélevés au cours de procédures de Prélèvement Multi-Organes (Tableau 2; Figure 12). Les procédures de prélèvement sont approuvées par l'Agence de la Biomédecine sous le protocole n° PFS19-011.

Tableau 2-Identification et caractéristiques des donneurs d'organes prélevés

N° Prélèvement	Sexe	Âge	BMI	Cause du décès
060820 P	M	59	25,6	Vasculaire
130920 P	F	54	26	Vasculaire
030221 P	F	58	27,5	Vasculaire
290321 P	F	44	20,8	Traumatique

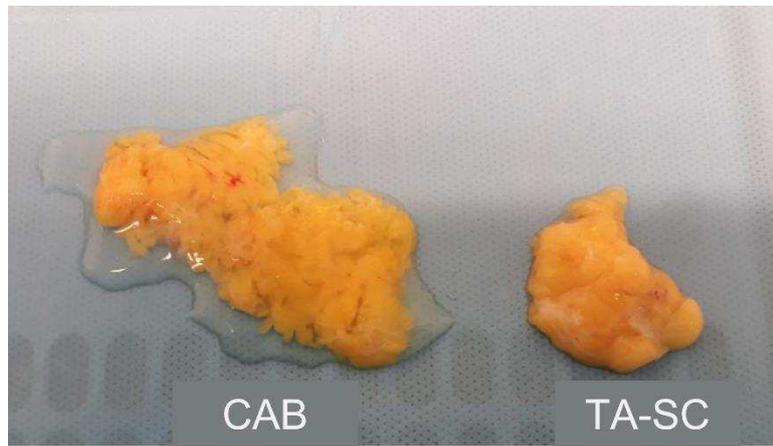


Figure 12- Image macroscopique de corps adipeux de la bouche (CAB) et de tissu adipeux sous-cutané (SC-TA) prélevés lors de PMO.

(Source : photographie de VARIN Audrey, RESTORE)

2. Obtention des cellules stromales mésenchymateuses des tissus adipeux

Les ASCs sont obtenues après digestion des différents tissus adipeux à la collagénase NB4 (Coger). Après 45 min, la digestion est arrêtée par l'ajout d' α -MEM (GIBCO) + 10% SVF (Gibco) + 1% ASP (Amphotéricine, Streptomycine, Pénicilline ; Thermofisher) + 1% de L-Glutamine (L-Glu ; Gibco), puis la fraction stromale vasculaire (FSV) obtenue est filtrée sur un tamis de 100 μ m (Milipore), centrifugée et reprise dans du milieu α -MEM 2% lysat plaquettaire (PLP ; Cook medical), 1% ASP et mis en culture à 4000 cellules/ cm². Après une semaine de culture, les cellules sont détachées à l'aide d'une solution 0,05% trypsine-EDTA (Gibco) et mises en culture à une concentration de 2000 cellules/cm² (cellules au passage P0). Les ASCs en P0 sont mise en culture pendant 1 semaine puis sont détachées et utilisées pour les différentes expériences (cellules au passage P1).

3. Culture et différenciation cellulaire des différentes populations d'ASCs

Différenciation adipocytaire : Les CAB-ASCs et les SC-ASC sontensemencées à 30.10³ cellules/cm² soit en milieu contrôle (ND : α -MEM, 2% PLP, 1% ASP) ou dans le milieu de différenciation adipogénique composé de α -MEM, 10% SVF + 1% ASP + 0,5mM Isobutyl-méthylxanthine + 60 μ M Indométhacine + 1 μ M Dexaméthasone. La différenciation est arrêtée après 7, 14 et 19 jours.

Différenciation chondroblastique : les CAB-ASCs et les SC-ASC (250 000 cellules) sont ensemencées sous forme d'une goutte à une concentration de 20 millions de cellules/mL dans le milieu contrôle ou dans le milieu de différenciation chondrogénique composé de α -MEM + 0,1mM Dexaméthasone + 1mM Sodium Pyruvate + 0,17mM Acide ascorbique-2-Phosphates + 0,35mM L-Proline + ITS+1X (Insuline-transferrine-sodium sélénite, linoléique-BSA ; Sigma) + 0,01 μ g/mL de TGF β 3 (RnD Systems). La différenciation est arrêtée après 14 jours de culture.

Différenciation ostéoblastique : Les CAB-ASCs et les SC-ASC sont ensemencées à 30.10³ cellules/cm² soit en milieu contrôle ou dans le milieu de différenciation ostéogénique composé de α -MEM + 0,8% PLP + 1% L-Glu + 1% ASP + 50 μ M Acide ascorbique + 50ng/mL de BMP7 ajouté lors des changements de milieux. La différenciation est arrêtée après 7, 14 et 21 jours.

4. Extraction des ARN totaux et rétrotranscription

Après chaque cinétique de différenciation, les ARNs totaux des ASCs sont extraits avec le kit « Quick RNA-Microprep » (Zymo Research) selon les indications du fabricant, et la quantité d'ARNs est déterminée par spectrophotométrie sur le NanoDropTM 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Les ARNs obtenus sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit « High Capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystem) selon les indications du fournisseur.

5. Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel

L'engagement des ASCs dans les différentes voies de différenciation est déterminé par l'analyse de l'expression de gènes spécifiques de chaque voie par qPCR en temps réel sur le thermocycleur CFX96 (Bio-rad) avec le mix « SsoFast EvaGreen Supermixes » (Biorad). La séquence des amorces de chaque gène spécifique et des gènes de références utilisés (Eurogentec) est détaillée dans le Tableau 3. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 2min à 98°C (dénaturation), puis 40 cycles contenant les étapes suivantes : 10s à 98°C (déshybridation) et 10s à 60°C (hybridation des amorces et amplifications). Le cycle d'amplification est suivi par la dénaturation progressive des produits d'amplification (courbes de fusion) par un passage de 65°C à 95°C en 5s. L'expression relative des gènes est analysée à l'aide du logiciel CFX ManagerTM (Biorad), par la méthode des $-2^{\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 3- Liste des gènes de différenciation étudiés par qPCR, et séquence des amorces sens et anti-sens

Gène	Sens	Anti-sens
Ostéoblastique:		
<i>nsun5</i> (ménage)	AGA-CCA-GTC-ACT-TGG-CTG-CTC-T	AGC-CAG-TTC-ACA-GCA-AGA-GAC-G
<i>osx</i>	CTC-CTG-CGA-CTG-CCC-TAA-T	GCC-TTG-CCA-TAC-ACC-TTG-C
<i>bsp</i>	GGG-CAG-TAG-TGA-CTC-ATC-CGA-AG	CTC-CAT-AGC-CCA-GTG-TTG-TAG-CAG
<i>pthr1</i>	ACA-TCT-GCG-TCC-ACA-TCA-GG	CCG-TTC-ACG-AGT-CTC-ATT-GGT-G
<i>dlx5</i>	GCC-ATT-CAC-CAT-TCT-CAC-CTC	TAC-CCA-GCC-AAA-GCT-TAT-GCC
<i>Runx2</i>	CAC-TGG-CGG-TGC-AAC-AAG-AC	GGC-CCA-CAA-ATC-TCA-GAT-CGT-T
Adipogénique:		
<i>ppia</i> (ménage)	GCC-GAG-GAA-AAC-CGT-GTA-CTA-T	TCT-TTG-GGA-CCT-TGT-CTG-CAA
<i>ppary2</i>	CCA-CGG-AGC-TGA-TCC-AA	GAT-ACA-CTG-TCT-GCA-AAC-ATA-TCA-C
<i>leptine</i>	CCA-AAA-CCC-TCA-TCA-AGA-CAA-TT	AGT-CCA-AAC-CGC-TGT-CTT-TCT-G
<i>ap2</i>	CCA TGC CAG CCA CTT TCC T	AGT-GAA-AAC-TTT-GAT-GAT-TAT-A
<i>lpl</i>	GGT-CGA-AGC-ATT-GGA-ATC-CAG	TAG-GGC-ATC-TGA-GAA-CGA-GTC
Chondroblastique:		
<i>timm17b</i> (ménage)	GGA-ACT-CTA-TCA-CCA-GTG-GAG-C	AGG-ATG-CCA-ACG-CCC-TCA-ATG-A
<i>col2a1</i>	CTG-CAA-AAT-AAA-ATC-TCG-GTG-TTC-T	GGG-CAT-TTG-ACT-CAC-ACC-AGT
<i>col10a1</i>	GGG-CAG-AGG-AAG-CTT-CAG-AAA-G	CAG-ATG-GAT-TCT-GCG-TGC-TG
<i>sox9</i>	CAA-GAC-GCT-GGG-CAA-GCT-CT	GGC-CCA-CAA-ATC-TCA-GAT-CGT-T
<p><i>nsun5</i>: NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 5; <i>osx</i>: Osterix; <i>bsp</i>: Bone Sialoprotein; <i>pthr1</i>: Parathyroid Hormone Receptor 1; <i>dlx5</i>: Distal Less Homeobox 5; <i>runx2</i>: Runt-related transcription factor; <i>ppia</i>: Peptidyl prolyl isomerase A; <i>ppary2</i>: peroxisome proliferator-activated receptors γ2; <i>ap2</i>: Adipocyte protein 2; <i>lpl</i>: Lipoprotein lipase; <i>timm17b</i>: Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 17 Homolog B; <i>col2a1</i>: Collagen II-α1, <i>col10a1</i>: Collagen X-α1; <i>sox9</i>: SRY-box transcription factor 9.</p>		

6. Imagerie cellulaire

La différenciation adipogénique à 19 jours des SC-ASCs et CAB-ASCs est évaluée par le marquage des lipides neutres des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. Pour cela les ASCs différenciées ou non sont fixées en Formol 10% puis incubées avec une solution de Bodipy couplée à la fluorescéine (Molecular Probes) permettant le marquage des gouttelettes lipidiques, et une solution de DAPI marquant les noyaux. L'intensité de fluorescence émise par le Bodipy dans le cytoplasme des cellules est analysée sur un système d'imagerie à haut débit (Operetta, PerkinElmer).

La différenciation ostéogénique à 21 jours des SC-ASCs et CAB-ASCs est évaluée en mesurant la localisation nucléaire du facteur de transcription Osterix. Pour cela, les ASCs différenciées ou non sont fixées en Formol 10%, puis incubées dans une solution de PBS contenant 2% de NHS (Newborn Horse Serum, Thermofisher scientific) et 0.2% triton-X100, permettant la saturation des sites de fixation aspécifiques et la perméabilisation des membranes. Les

cellules sont ensuite marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Ostérix (Rabbit anti-human SP7, Invitrogen). Après lavage, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488 (Alexa Fluore 488-Donkey anti-rabbit IgG, Life Technologies). Puis les noyaux sont marqués au DAPI. La localisation nucléaire d'Ostérix est ensuite déterminée grâce à un système d'imagerie à haut débit (Operetta, PerkinElmer) et au système d'analyse Harmony (PerkinElmer).

B. Etude des propriétés ostéoinductives des différentes populations d'ASCs *in vivo*

1. Modèle murin de lésion osseuse de taille critique de la calvaria

a) Procédure chirurgicale

Cette étude a obtenu l'avis favorable du comité d'éthique Pyrénées-Méditerranée et du Ministère de l'éducation nationale et de la recherche (référence dossier : #22559-201910211633553). Après analgésie à la buprénorphine (0,1mg/kg) en injection intra-péritonéale, des souris mâles C57BL/6J de 8 à 10 semaines (Janvier labs) sont anesthésiés par inhalation de 2% d'isoflurane en chambre à induction et maintenus endormis au masque pendant l'intervention. La profondeur de la narcose est évaluée par l'absence de réponse à la stimulation des extrémités. Après rasage des poils et asepsie, la peau du crâne est incisée longitudinalement en regard de l'os pariétal droit. Le périoste de l'os pariétal droit est retiré, et un défaut osseux carré de 4 mm de côté est créé sous irrigation saline stérile à l'aide d'une fraise Dremel[®] et d'un Piezotome[®] afin de préserver la dure mère. Les différents types d'implants sont ensuite positionnés dans la lésion en présence ou en absence d'une membrane de collagène (Mb ; Collprotect[®]). Après suture de la plaie cutanée, les animaux sont réveillés sur tapis chauffant et sous surveillance. L'analgésie (buprénorphine, 0,1mg/kg en injection intra-péritonéale) est maintenue pendant 3 jours post-opératoire. Les animaux sont sacrifiés à différents temps post-opératoire par dislocation cervicale. Afin d'étudier la réparation osseuse dans son environnement tissulaire complet, la tête des souris, séparée de leur mandibule, est prélevée et fixée en Formol 10% durant 10 jours.

b) Préparation des biomatériaux

Les biohybrides (BH) sont préparés à partir de lysat plaquettaire (LP) humain pur (MACOPHARMA®) filtré à 100µm. Les SC-ASCs et CAB-ASCs en P1 sont détachées grâce à une solution de trypsine, puis 500 000 cellules sont incluses dans une solution de LP et le mélange est laissé à coaguler pendant 1h à 37°C en présence de chlorure de calcium et d'acide tranexamique (EXACYL, Sanofi) . Pour certaines conditions expérimentales, 2,5 mg de H-β-TCP (BM ; CERAFORM®) sont ajoutés à ce mélange.

c) Design expérimental

Pour l'étude des capacités ostéoinductives intrinsèques des différentes populations d'ASCs *in vivo* à 3 mois, 15 souris de 8 semaines ont été réparties aléatoirement en 5 groupes expérimentaux :

- BH seul (n= 3),
- Membrane seule (n=3),
- BH+ Membrane (n=2),
- BH-CAB-ASCs+ Membrane (n=3),
- BH-SC-ASCs+ Membrane (n=3).

Un second protocole d'étude des capacités ostéoinductives des ASCs en association à un BM a été réalisé. Pour cela, 54 souris de 10 semaines sont réparties entre trois cinétiques d'étude (n=18), et recevant aléatoirement 6 traitements :

- BH+ BM (n=3),
- BH+ BM+ CAB-ASCs (n=3),
- BH+ BM+ SC-ASCs (n=3),
- BH+ BM+ Membrane (n=3),
- BH+ BM +CAB-ASCs+ Membrane (n=3),
- BH+ BM+ SC-ASCs+ Membrane (n=3)

Un groupe d'animaux (n=18) est sacrifié à 7 jours, 14 jours et 3 mois post-opératoire. Les animaux sacrifiés à 3 mois ne seront pas exploités dans le présent travail.

L'organisation temporelle générale des procédures réalisées *in vivo* est représenté sur le chronogramme de la (Figure 13).

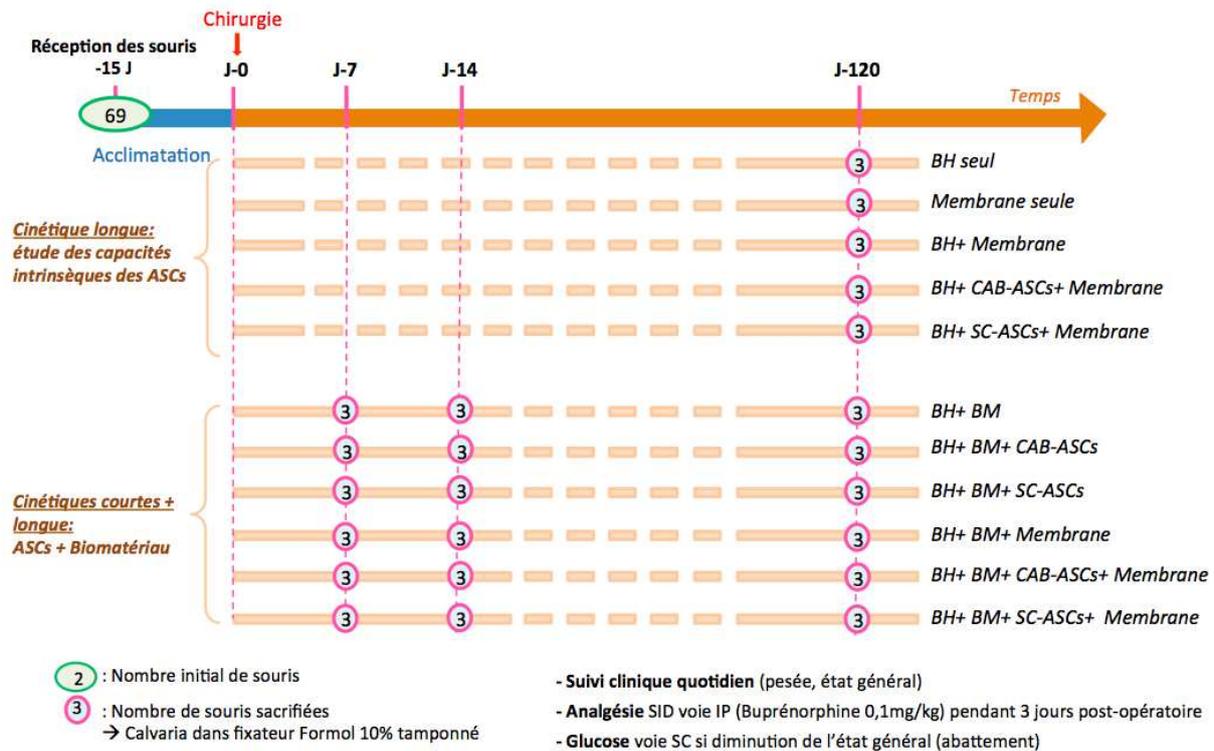


Figure 13- Chronogramme reprenant l'organisation des procédures in vivo

Dans un premier temps, les capacités ostéoinductrices des ASCs a été étudié au cours d'une cinétique longue de 120 jours. Dans un deuxième temps, l'effet de l'association des ASCs à un biomatériau de H- β -TCP a été étudié durant des cinétiques courtes et longue de 7 jours, 14 jours et 3 mois.

2. Etude histologique

Après fixation, les têtes sont décalcifiées 11 à 12 jours dans une solution d'EDTA 10% à 37°C, puis recoupées en 3 sections frontales dans la lésion osseuse d'après un protocole standardisé (Figure 14). Les échantillons sont ensuite déshydratés 15h en bains successifs d'alcool absolu, d'alcool à 95° et de toluène, puis imprégnés et inclus en paraffine. Des sections de 3 μ m sont réalisées au microtome (Microm, HM 330).

Les sections sont colorées à l'hémalum- éosine pour évaluer la localisation de la membrane et des biomatériaux par rapport au défaut osseux et l'inflammation (quantité de cellules immunitaires, de cellules géantes, d'ostéoclastes ; score de 1 à 4). La taille du défaut osseux, et l'épaisseur de la calvaria sont mesurés avec le logiciel NIS-Element-D (Nikon).

De plus, certaines lames sont colorées avec une solution de Picosirius red- Fast green (Tableau 4), puis numérisées (Scanner Pannoramics 250, 3D Histech).

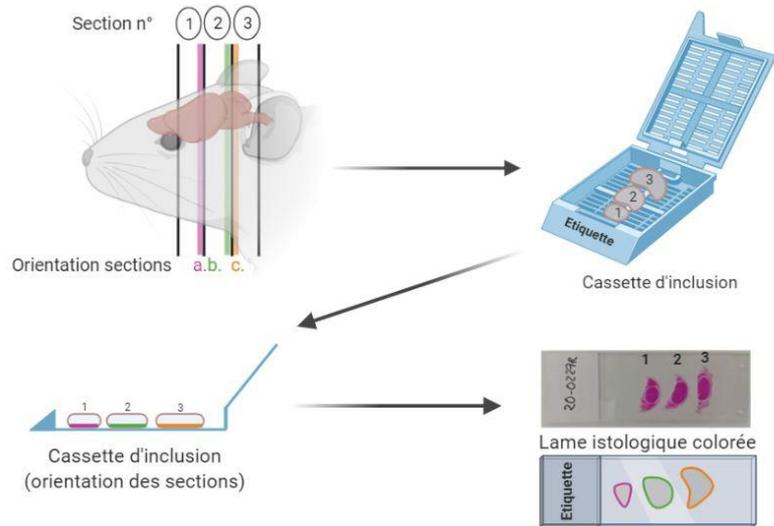


Figure 14- Schéma du traitement histologique des calvaria prélevées.

Les calvaria fixées et décalcifiées sont recoupées et orientées dans les casses histologiques d'après un protocole standardisé.

(Source : personnelle, réalisé avec Biorender)

La proportion et la localisation des fibres de collagène et des formations osseuses précoces (sécrétion d'ostéoïde) autour de la lésion sont analysées à l'aide du module HistoQuant du logiciel 3D Histech (Figure 15. B).

Enfin, l'identification des ASCs humaines dans les tissus murins se fait à l'aide de marqueurs spécifiques. Pour visualiser l'intégration des ASCs humaines dans les tissus murins, un marquage immunohistochimique (IHC) de la Vimentine humaine est réalisé.

Le dénombrement des ASCs humaines totales ou en prolifération est réalisé par le marquage IHC respectivement du Ku80 (antigène nucléaire spécifique des cellules humaine) ou du Ki67 (marquage nucléaire des cellules humaines en cycle) (Tableau 4).

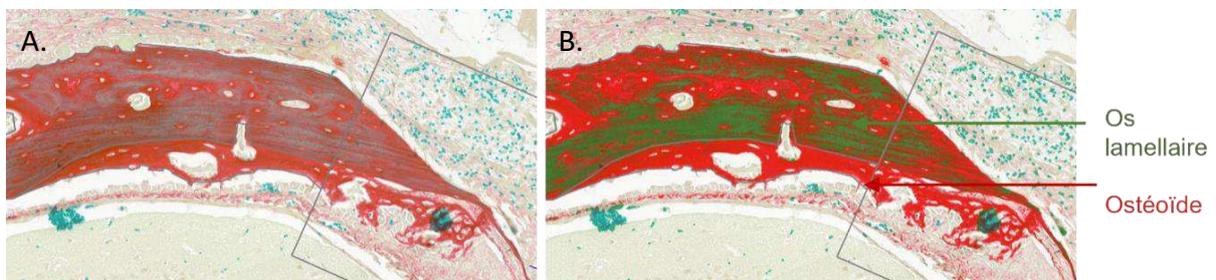


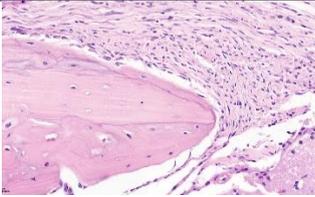
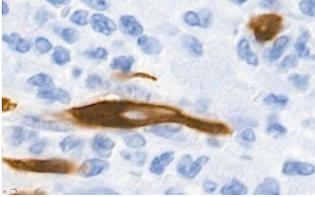
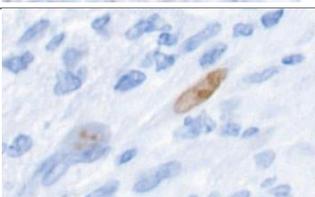
Figure 15- Histomorphométrie: mise en place de masque pour quantifier la production osseuse.

A. La coloration des coupes histologiques par le Picosirius red permet de mettre en évidence l'ostéoïde (en rouge), et l'os lamellaire par une contre-coloré par le Fast green (en vert), **B.** Aspect du masque mis au point pour la quantification histomorphométrique de la surface d'ostéoïde apposée sur l'épaisseur de la calvaria : les régions en rouge sont définies comme de l'ostéoïde, et les régions en vert comme l'os lamellaire.

(Source : personnelle, masque élaboré avec le module HistoQuant du logiciel 3D Histech)

Un index de prolifération est ensuite calculé par le ratio des cellules en prolifération (Ki67 +) et des cellules totales (Ku80 +) dénombrées avec le module NuclearQuant (3D Histech) sur les lames numérisées.

Tableau 4- Caractéristiques des colorations histochimiques et marquages immunohistochimiques utilisés pour l'étude histologique des ASCs et du remodelage osseux.

Coloration/ Marquage	Aspect	Intérêt	Utilisation
Hémalun-Eosine		Coloration de routine : Noyaux : bleu Cytoplasmes, matrice extra-cellulaire : nuances de rose	Appréciation morphologique et topographique des structures tissulaires et cellulaires
Picosirius red- Fast green		Coloration spéciale : Collagène/ ostéoïde : rouge Os lamellaire/ autres tissus : vert	Quantification des éléments cellulaires, ostéoïde, os lamellaire et fibres de collagène
Vimentine humaine		Immunohistochimie : Reconnaissance spécifique de la vimentine humaine	Détection des ASCs humaines par leur marquage cytoplasmique, caractérisation du devenir des cellules dans les tissus murins
Ku80		Immunohistochimie : Reconnaissance spécifique de la protéine nucléaire Ku80 humaine	Détection et dénombrement des ASCs humaines
Ki67		Immunohistochimie : Reconnaissance spécifique de la protéine nucléaire Ki67 humaine produite lors du cycle cellulaire (phases G1, S, G2 et M)	Dénombrement des ASCs humaines en prolifération (indice de prolifération)

II. Résultats

A. Capacités de différenciation *in vitro* des différentes populations d'ASCs.

1. Différenciation adipocytaire

Après 19 jours de culture en milieu de différenciation adipogénique, les SC-ASCs et CAB-ASCs montrent une accumulation marquée de lipides cytoplasmiques sous forme de gouttelettes, par rapport au contrôle ND (Figure 16; Figure 17.A).

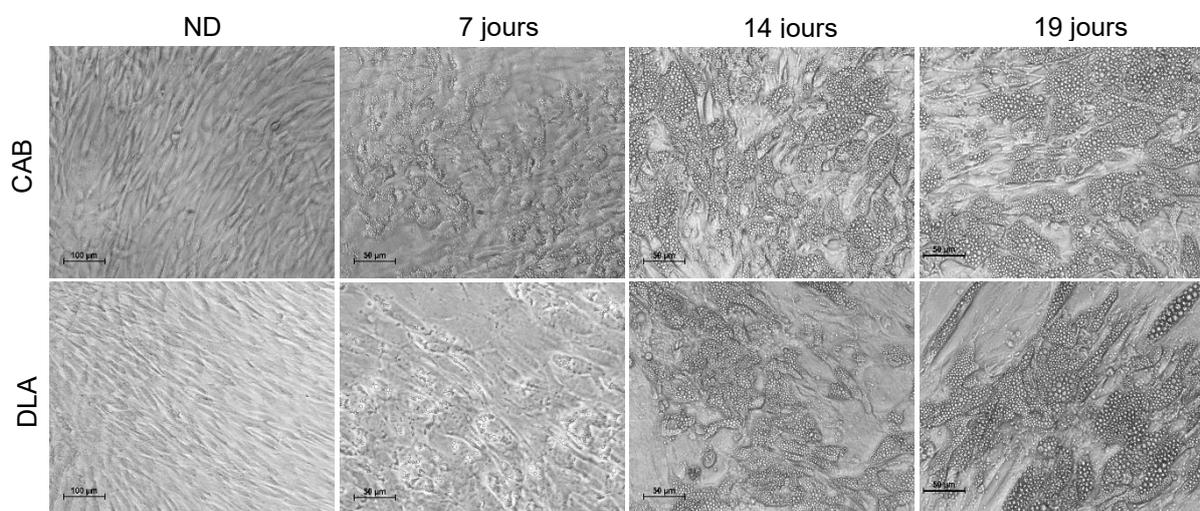


Figure 16- Aspect microscopique des SC-ASCs et des CAB-ASCs en milieu de différenciation adipogénique, x10.

(Source : Photographies personnelles, RESTORE)

L'intensité du dépôt lipidique est quantifiée par la mesure de la fluorescence émise par les lipides cytoplasmiques marqués au Bodipy. On observe une augmentation du signal cytoplasmique dans les SC-ASCs et dans les CAB-ASCs par rapport aux cellules ND (SC-ASCs : **ND**= $177,3 \pm 74,1$ UA, **19j**= $650,6 \pm 223,3$ UA ; CAB-ASCs : **ND**= $151 \pm 81,5$ UA, **19j**= $766 \pm 202,1$ UA), indiquant que les deux types cellulaires peuvent se différencier dans la lignée adipocytaire. L'intensité de fluorescence semble supérieure chez les CAB-ASCs par rapport aux SC-ASCs, bien que cette différence ne soit pas significative (Figure 17.B).

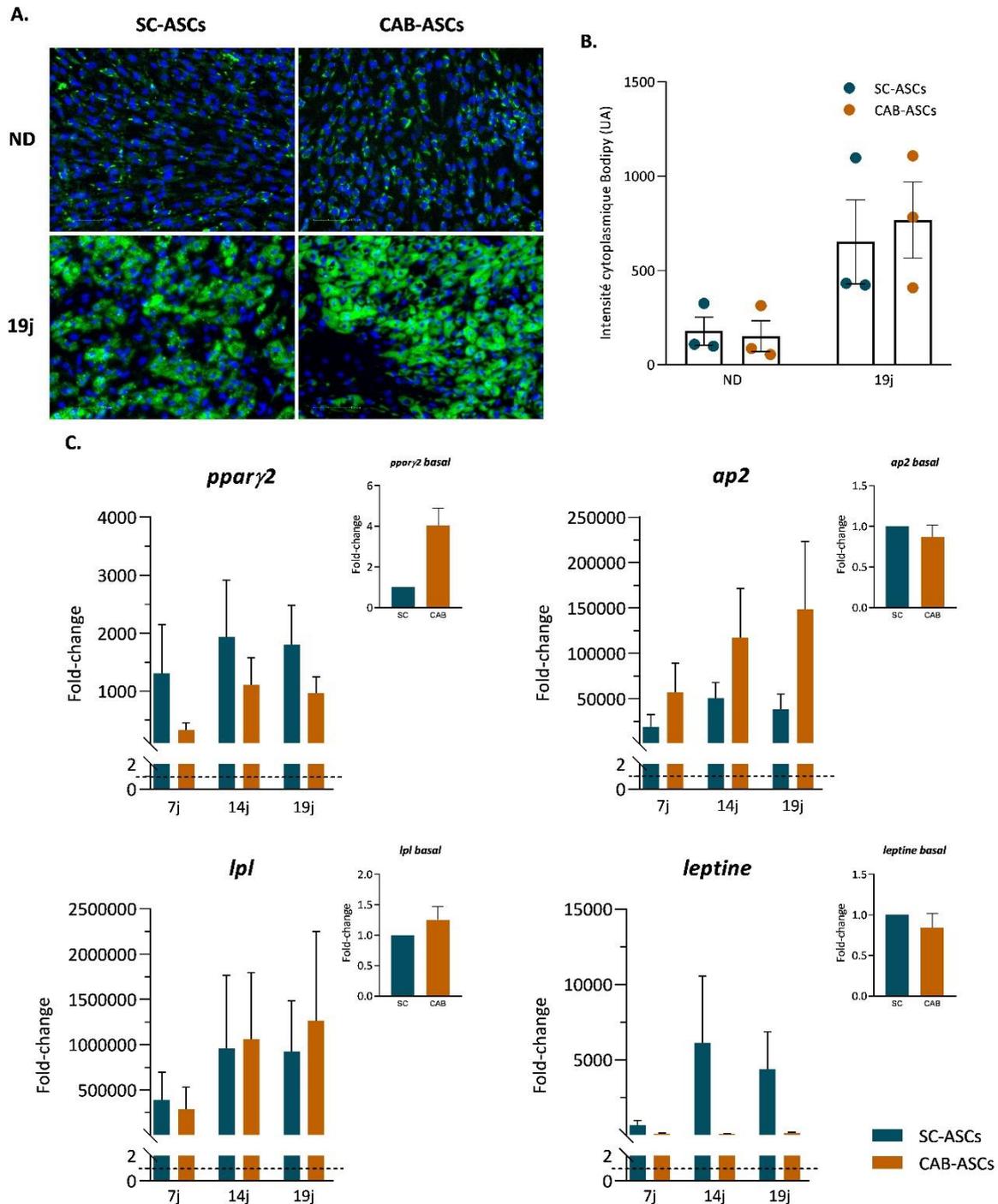


Figure 17- Différenciation adipogénique des SC-ASCs et CAB-ASCs.

A. Microscopie à fluorescence des SC-ASCs et CAB-ASCs non différenciées (ND) ou après 19 jours de différenciation en milieu adipogénique. Les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques sont marquées au Bodipy (vert) et les noyaux au DAPI (bleu).

B. Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne dans le cytoplasme par marquage des lipides au Bodipy (moyenne intensité \pm SEM ; n=3) **C.** Profils d'expression des gènes de différenciation adipogénique par les SC-ASCs et CAB-ASCs au cours du temps. L'expression des gènes de différenciation est quantifiée par qPCR dans les SC-ASCs et CAB-ASCs après 7 jours, 14 jours et 19 jours de différenciation. Les résultats représentent la différence d'expression moyenne des gènes par rapport aux cellules ND représentées par la ligne pointillée (fold change \pm SEM ; n=4).

L'analyse de l'expression des gènes liés à la différenciation adipocytaire montre que les deux populations d'ASCs sont capables de s'engager dans cette voie. Cependant à l'état basal, les CAB-ASCs semblent plus engagées dans la voie adipocytaire (Fold change (FC) ; $FC_{CAB-ASCs} = 4,03 \pm 0,9$) que les SC-ASCs, avec une expression plus importante de *ppar-γ*, facteur de transcription essentiel à l'engagement dans cette voie (Figure 17.C). Après 19 jours, on constate que l'induction d'*ap2*, gène exprimé précocement lors de la différenciation, est supérieure dans les CAB-ASCs (SC-ASCs : $FC = 38727 \pm 16558$; CAB-ASCs : $FC = 148805 \pm 74685$). De façon surprenante, l'expression de la leptine, gène exprimé tardivement dans la différenciation est induite de façon plus importante dans les SC-ASCs (SC-ASCs : $FC = 4373 \pm 2477$; CAB-ASCs : $FC = 132 \pm 64$) alors que l'observation microscopique des cellules montre une accumulation supérieure de lipides cytoplasmiques.

2. Différenciation Chondroblastique

Après 14 jours de culture en milieu chondrogénique ou contrôle (Figure 18), l'expression des gènes reliés à la différenciation chondroblastique est quantifiée par qPCR.

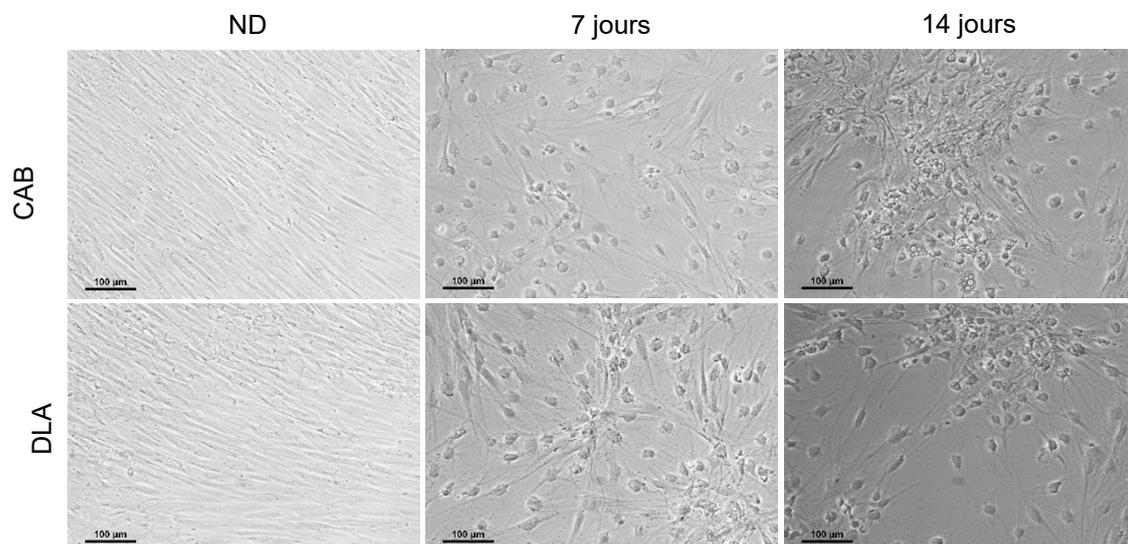


Figure 18- Aspect microscopique des SC-ASCs et des CAB-ASCs en milieu de différenciation chondrogénique, x10.

(Source : Photographies personnelles, RESTORE)

A l'état basal, les CAB-ASCs expriment presque deux fois plus le facteur de transcription Sox9 ($FC_{CAB-ASCs} = 1,7 \pm 0,7$) par rapport aux SC-ASCs. Inversement, les SC-ASCs expriment plus les gènes Col10A1 et Col2A1 qui ne sont pas du tout exprimés par les CAB-ASCs. Après 14 jours de différenciation les SC-ASCs expriment beaucoup plus l'ensemble des gènes caractéristiques de la différenciation chondrogénique que les CAB-ASCs, ce qui montre que les SC-ASCs ont une capacité de différenciation chondroblastique plus importante que les CAB-ASCs (Figure 19).

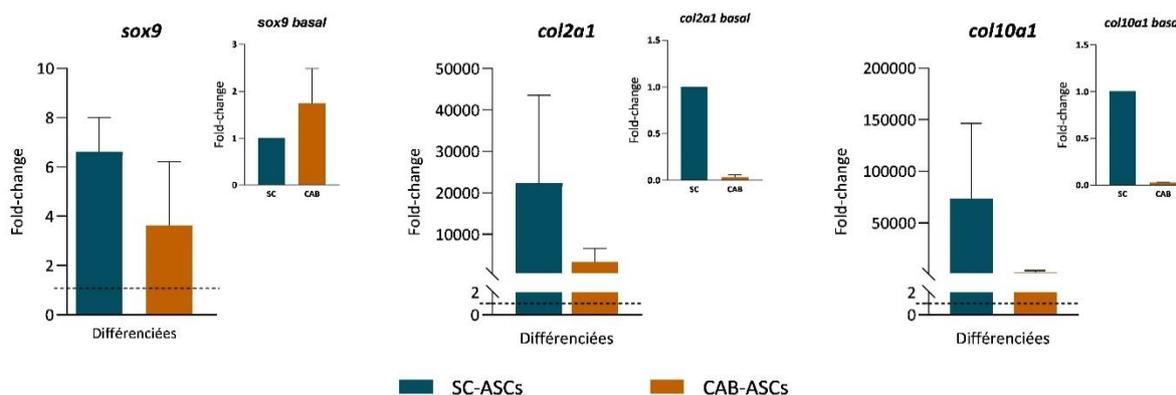


Figure 19- Expression des gènes de différenciation chondroblastique par les SC-ASCs et CAB-ASCs.

Profils d'expression des gènes de différenciation chondrogéniques par les SC-ASCs et CAB-ASCs au cours du temps. L'expression des gènes de différenciation est quantifiée par qPCR dans les SC-ASCs et CAB-ASCs après 14 jours de différenciation. Les résultats représentent la différence d'expression moyenne par rapport aux cellules ND (fold change \pm SEM ; n=3).

3. Différenciation Ostéoblastique

La différenciation ostéoblastique a tout d'abord été déterminée après 21 jours de culture (Figure 20) par l'évaluation en microscopie de la localisation nucléaire du facteur de transcription Ostérix (Figure 21. A).

Après 21 jours de culture en milieu ostéogénique ou contrôle, la fluorescence liée à l'Ostérix nucléaire est quantifiée (Figure 21. B). On observe une augmentation du signal nucléaire, un peu plus marquée dans les CAB-ASCs que dans les SC-ASCs, par rapport aux cellules non différenciées (SC-ASCs: **ND**= 177,3 \pm 74,1 UA, **21j**= 651 \pm 223,3 UA; CAB-ASCs: **ND**= 151,1 \pm 82 UA, **21j**= 766 \pm 202,1 UA). Après différenciation, l'intensité de la fluorescence nucléaire d'Ostérix dans les CAB-ASCs est supérieure à la fluorescence nucléaire dans les SC-ASCs, bien que cette différence ne soit pas significative.

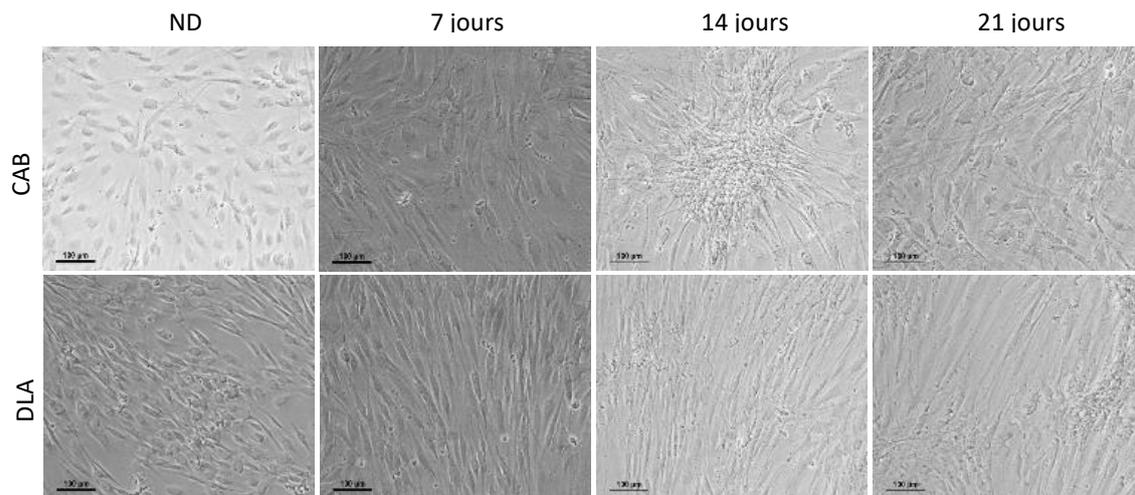


Figure 20- Aspects microscopiques des SC-ASCs et CAB-ASCs en milieu de différenciation ostéogénique, x10.

(Source : Photographies personnelles, RESTORE)

L'analyse de l'expression basale des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique montre que les SC-ASCs expriment plus le facteur de transcription *runx2*, gène le plus précocement exprimé lors de la différenciation ostéoblastique, par rapport aux CAB-ASCs ($FC_{CAB-ASCs} = 0,34 \pm 0,06$), ainsi que le gènes tardif *pthr1* ($FC_{CAB-ASCs} = 0,25 \pm 0,18$), alors que les CAB-ASCs expriment d'avantage le facteur de transcription *ostérix* ($FC_{CAB-ASCs} = 7,3 \pm 5,6$) ainsi que les gènes précoces *dlx5* ($FC_{CAB-ASCs} = 22,5 \pm 16,2$) et *bsp* ($FC_{CAB-ASCs} = 3,8 \pm 3,1$). Aux différents temps de différenciation, on constate une augmentation de l'expression des gènes d'intérêt dans les deux types cellulaires, indiquant qu'ils sont tous les deux capables d'entrer en différenciation ostéoblastique.

L'induction des gènes *dlx5* et *bsp* est beaucoup plus faible dans les CAB-ASCs que dans les SC-ASCs, cependant l'induction du gène tardif *pthr1* est nettement plus marquée dans les CAB-ASCs par rapport aux SC-ASCs (Figure 21. C). Il semblerait donc que les CAB-ASCs aient une capacité de différenciation ostéoblastique inférieure à celle des SC-ASC en culture.

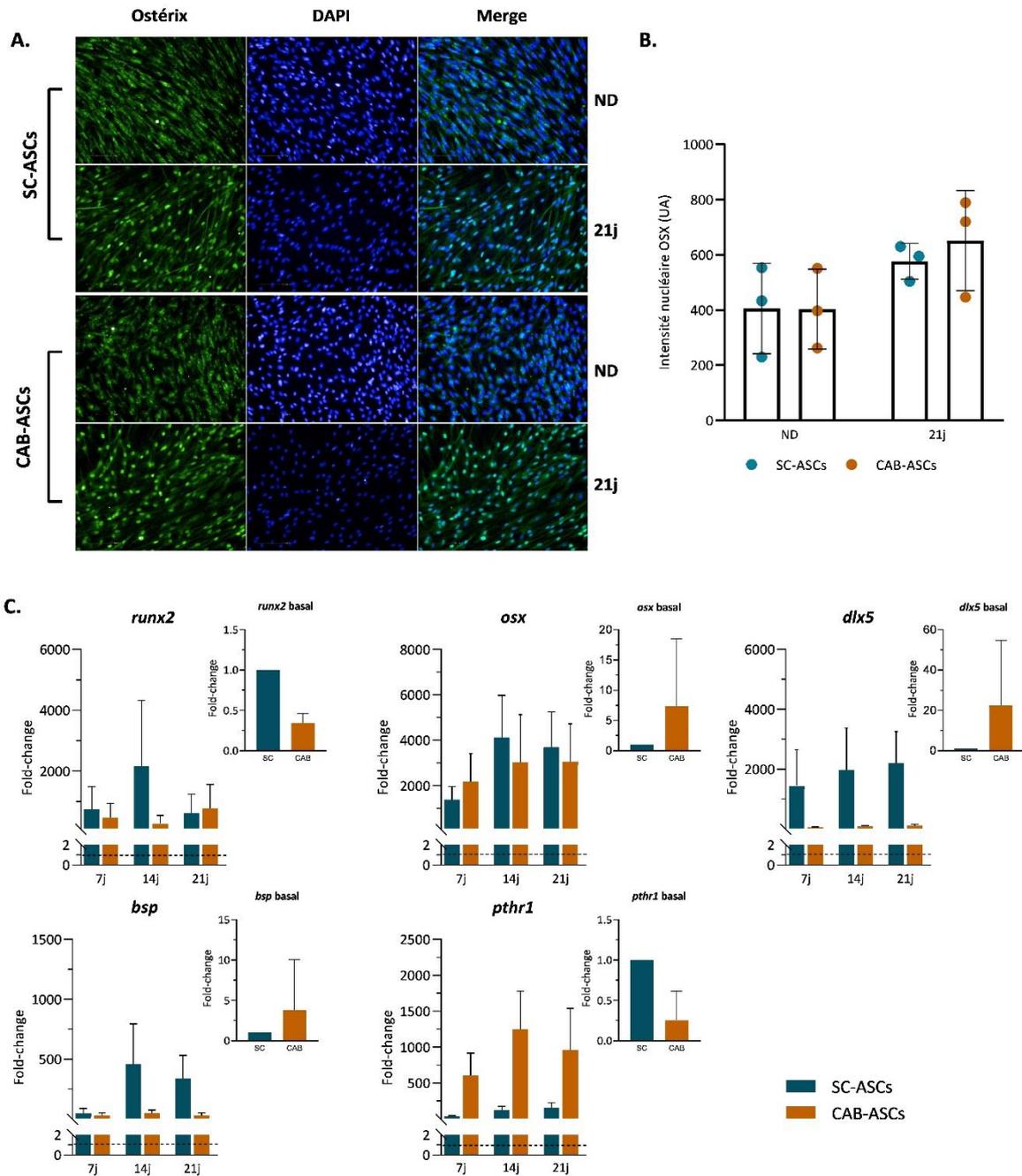


Figure 21- Différenciation ostéoblastique des SC-ASCs et CAB-ASCs.

A. Microscopie à fluorescence des SC-ASCs et CAB-ASCs non différenciées (ND) ou après 21 jours de différenciation ostéogénique. Le facteur de transcription Ostérix est marqué à l'Alexa 488 (vert) et les noyaux au DAPI (bleu). **B.** Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne dans les noyaux par marquage de l'Ostérix à l'Alexa 488 (moyenne intensité \pm SEM ; $n=3$). **C.** Profils d'expression des gènes de différenciation ostéoblastique au cours du temps par les SC-ASCs et les CAB-ASCs. L'expression des gènes est quantifiée par qPCR à 7 jours, 14 jours et 21 jours de différenciation. Les résultats représentent la différence d'expression moyenne des gènes par rapport aux cellules ND, symbolisées par la ligne pointillée (fold-change \pm SEM ; $n=4$).

B. Etude des capacités d'ostéoinduction des deux populations d'ASCs dans un modèle animal de lésion osseuse de taille critique

1. Effet des SC-ASCs et CAB-ASCs sur la reconstruction osseuse à 3 mois post-opératoire

L'influence des SC-ASCs et CAB-ASCs sur la réparation osseuse est étudiée dans un premier temps au cours d'une cinétique longue. Afin d'évaluer l'effet thérapeutique des ASCs à 3 mois, les souris sont sacrifiées et les calvaria conservées pour l'étude histologique du défaut osseux (Figure 22.A).

Sur les coupes de tissus, les remaniements de l'os sont observés en épaisseur de la calvaria par l'apposition d'os néoformé (Figure 22.C), pour les traitements avec la Mb ($265,6 \pm 25,7 \mu\text{m}$), avec le BH+ Mb ($267,2 \pm 51,7 \mu\text{m}$) par rapport aux souris non traitées ($250,2 \pm 17,1 \mu\text{m}$), et de manière plus prononcée avec le traitement BH-CAB-ASCs+ Mb ($313,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$).

L'apposition d'os néoformé est minoritaire dans le défaut osseux (Figure 22.D). Un tissu conjonctif fibreux grêle composé de fibroblastes et de collagène tapisse et sépare la zone du défaut osseux de l'encéphale sous-jacent, et des plans sous-cutanés sus-jacents (Figure 22.B), suggérant que le processus de réparation osseux est peu engagé dans le comblement du défaut.

Sans être statistiquement significatives, les mesures de taille du défaut osseux à 3 mois montrent des tendances d'évolution. Les animaux traités par la Mb seule ne présentent pas de réduction du défaut osseux par rapport aux souris non traitées (Mb: $2325 \pm 319 \mu\text{m}$; Chir seule: $1895 \pm 465 \mu\text{m}$) (Figure 22.F). Le traitement des animaux avec le BH+ Mb permet une légère fermeture de la lésion (BH+ Mb : $1508 \pm 399 \mu\text{m}$). La largeur du défaut osseux chez les souris recevant des ASCs reste supérieure à celle du contrôle négatif, et le comblement est plus important chez les souris BH+CAB-ASCs + Mb ($2826 \pm 54,4 \mu\text{m}$) que chez les souris BH+SC-ASCs+ Mb ($2054 \pm 324 \mu\text{m}$) (Figure 22.F).

Enfin, le marquage IHC de la Vimentine humaine est négatif pour l'ensemble des animaux recevant des ASCs, suggérant que ces cellules ne persistent pas sur le lieu d'implantation à long terme. De plus on constate un contexte inflammatoire minime chez tous les animaux, avec la persistance de cellules géantes macrophagiques multi-nucléées autour des résidus de BH ou d'esquilles osseuses (Figure 22.E), à l'exception d'un animal ayant reçu la Mb seule et présentant une complication d'abcès encapsulé, rompu le jour du sacrifice.

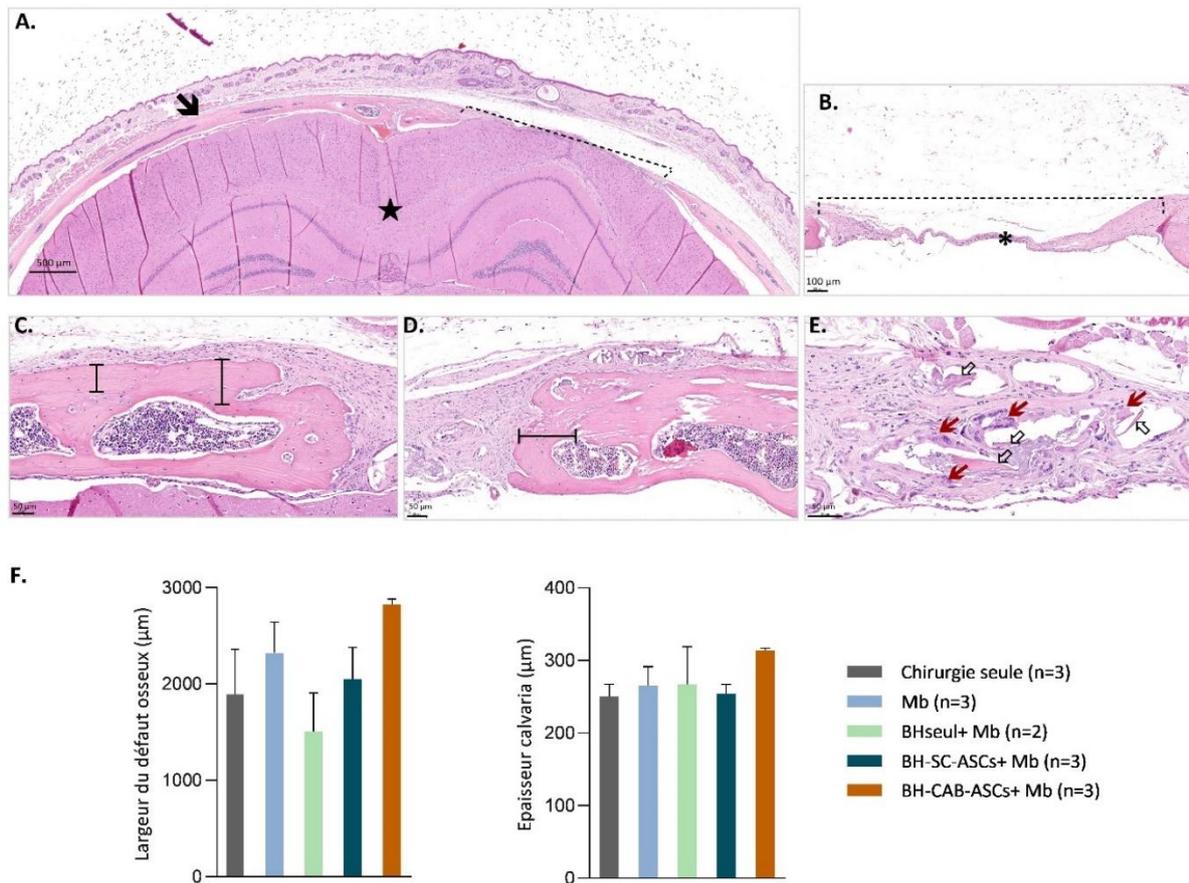


Figure 22- Etude histologique à 3 mois post opératoire.

A. Topographie des éléments histologiques observés : encéphale (★), os de la calvaria (→), peau (→), défaut osseux (.....), **B.** Défaut osseux comblé par une lame fibreuse (★) après 3 mois chez une souris ayant reçu la Mb seule, **C.** Berges du défaut osseux présentant une apposition en épaisseur d'os néoformé (I), identifiable par l'aspect amorphe de la matrice osseuse, **D.** Berges du défaut osseux présentant une apposition d'os néoformé en direction de la lésion osseuse (I), **E.** Persistance d'esquilles osseuses (⇒) dans la lame fibreuse comblant le défaut osseux, bordées de cellules géantes (→), **F.** Largeurs et épaisseurs moyennes du défaut osseux et de la calvaria, mesurées en périphérie du défaut osseux (taille en µm ± SEM).

2. Cinétique courte à 7 jours post opératoire

Nos résultats à 3 mois semblent montrer que les ASCs seules ne sont pas capable d'induire une reconstruction osseuse. Nous avons donc voulu déterminer si leur association à un BM ostéo-conducteur tel que le H-β-TCP pouvait favoriser cette reconstruction osseuse. Nous avons donc réalisé une série d'expériences au cours desquelles les animaux sont traités avec les différentes populations d'ASCs associées ou non à des BM. Nous avons d'abord voulu déterminer l'effet des deux populations d'ASCs sur les événements tissulaires en phases précoces de la reconstruction osseuses après 7 jours et 14 jours. L'expérience permettant d'évaluer le rôle des ASCs sur la fermeture de la lésion osseuse à 30 jours est en cours et sera analysée ultérieurement.

a) Positionnement des Biomatériaux :

Après 7 jours, les BM semblent correctement positionnés dans le défaut osseux chez 30% des animaux, et placés en regard mais en dehors de la lésion chez 25% des animaux, et hors de la lésion chez 45% des animaux (Figure 23).



Figure 23- Positionnement des particules du BM dans la lésion osseuse à 7 jours.

Illustration des observations histologiques chez des animaux présentant un BM correctement placé dans la lésion (A.), ou regard de la lésion (B.) ou bien complètement en dehors du site lésionnel (C.).

A. BH+BM+SC-ASCs, B. BH+BM+CAB-ASCs, C. BH+BM+CAB-ASCs. --- : bords de la lésion osseuse, O : BM.

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

b) Devenir des populations d'ASCs

Grâce au marquage de la Vimentine humaine, on peut visualiser les ASCs implantées chez 90% des animaux. Les ASCs présentent une forme allongée (Figure 24. B), signe de leur intégration aux tissus environnants. Néanmoins celles-ci sont majoritairement localisées en périphérie et dans les pores des BM, leur migration dans les tissus reste donc limitée.

Un index de prolifération (IP) des ASCs après implantation *in vivo* est calculé par le nombre d'ASCs humaines en prolifération (Ki67+) sur le nombre d'ASCs humaines totales (Ku80+) (Figure 24. B). Après 7 jours d'implantation, l'index de prolifération des SC-ASCs et CAB-ASCs est compris de 0 à 22% (Figure 24. A).

Les SC-ASCs présentent une activité de prolifération deux fois plus importante que celle des CAB-ASCs aussi bien en absence (SC-ASCs : $12,3 \pm 5,5\%$; CAB-ASCs : $8,1 \pm 2,4\%$) qu'en présence de la membrane de collagène (SC-ASCs : $9,6 \pm 6,1\%$; CAB-ASCs : $4 \pm 2,6\%$). Cependant ces résultats sont peu significatifs du fait des écarts-types larges obtenus. Un plus grand nombre d'animaux permettrait de réduire ces écarts-types.

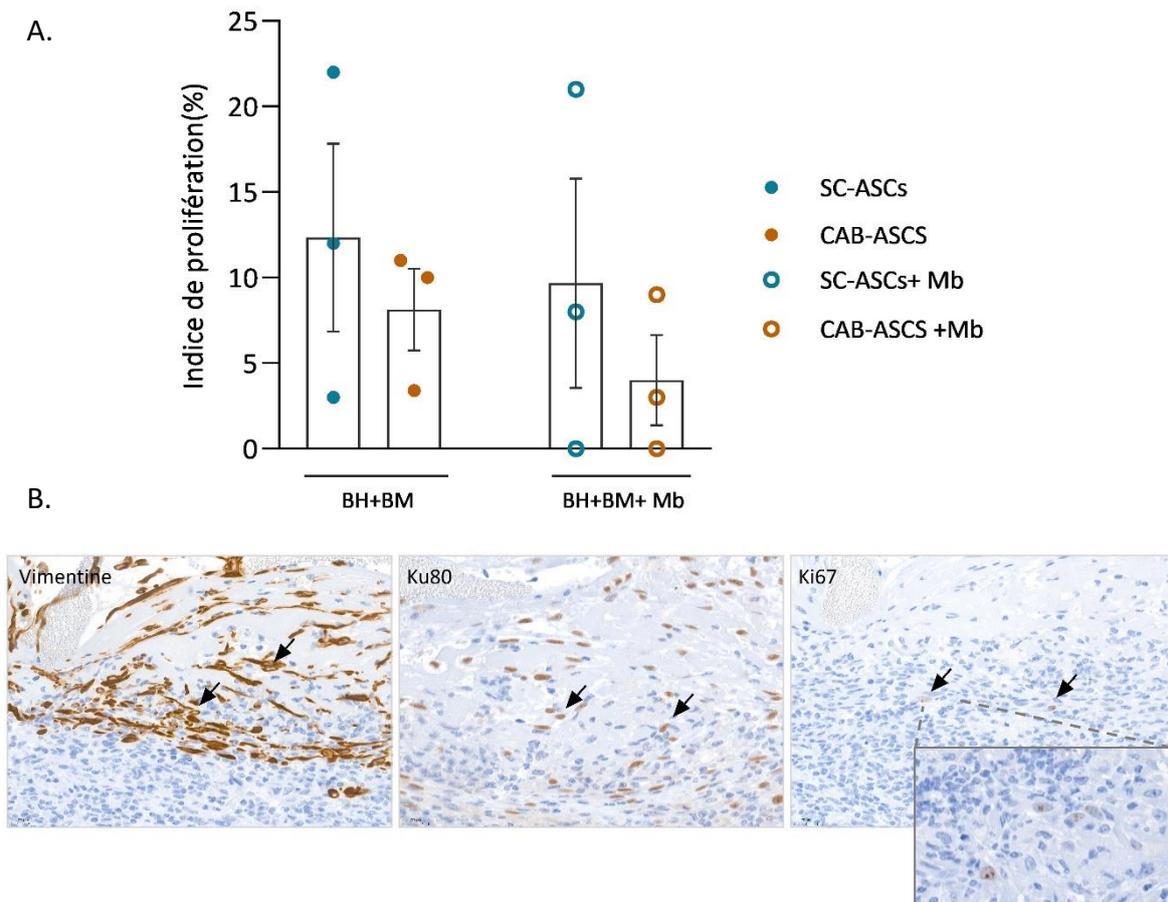


Figure 24- Indice de prolifération des SC-ASCs et CAB-ASCs à 7 jours post-opératoire

A. L'indice de prolifération des ASCs est établi en faisant le rapport du nombre de cellules Ki67 positives sur le nombre de cellules Ku80 positives ($\% \pm \text{SEM}$; $n=3$). **B.** Marquages immuno- histo- chimiques des ASCs apportées dans la lésion osseuse : le marquage de la Vimentine humaine montre l'intégration tissulaire des ASCs et leur morphologie mésenchymateuse avec un cytoplasme rubané. Le marquage du Ku80 permet de visualiser la totalité des noyaux humains. Les ASCs possédant une activité de prolifération sont marquées au Ki67.

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

c) Influence des traitements sur l'inflammation

La procédure chirurgicale et la présence des matériaux implantés dans la lésion génèrent un contexte inflammatoire sévère. L'intensité de l'inflammation et les profils inflammatoires sont évalués de manière relative aux évènements observés dans la condition BH+ BM seuls, par un scoring de sévérité de 1 (peu sévère) à 4 (très sévère).

L'inflammation tissulaire s'accroît avec l'ajout de matériel exogène dans les zones opératoires (Figure 25. A). Elle est modérée chez les souris BH+BM (Figure 25. B.a), avec des cellules inflammatoires en quantité moyenne localisées au contact des BM (Figure 25. B.c) et la présence majoritaire de fibroblastes (Figure 25.B.b). L'inflammation est sévère chez les souris

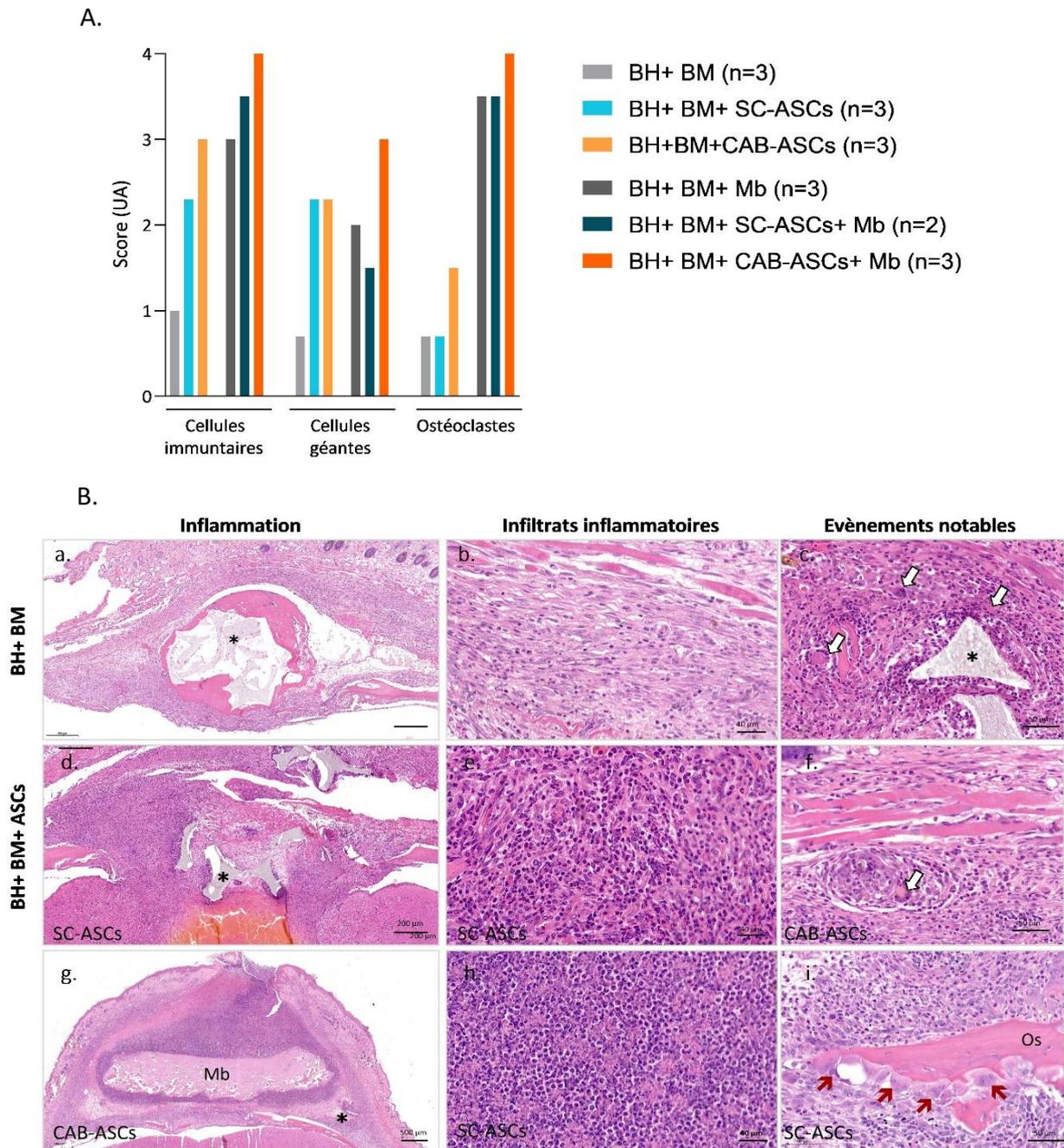


Figure 25- Etude histologique de l'influence des traitements sur l'inflammation à 7 jours post-opératoire.

Evaluation histopathologique des événements tissulaires sur le site opératoire : **A.** Histogramme de répartition des scores de grading selon les conditions expérimentales. **B.** illustration des événements évalués de grade 1 (a.b.) grade 2-3 (d.e.) et grade 3-4 (g.h.), la quantité de cellules géantes (\Rightarrow) et d'ostéoclastes (\blacktriangleright) dans les zones opératoires. *****: Biomatériaux de H- β -TCP.

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

recevant en plus les ASCs (Figure 25.B.d), avec un infiltrat granulocytaire important et dense (Figure 25. B.e), au contact des BM et des BH-ASCs et qui s'étend dans les tissus périphériques. Il est associé à de nombreux granulomes et cellules géantes, qui se concentrent autour des poils, des esquilles osseuses et du BM (Figure 25. B.f). L'intensité de l'inflammation est plus sévère chez les souris recevant la Mb (Figure 25..B. g), avec des infiltrats granulocytaires très denses (Figure 25.B.h), associés à la constitution d'une coque fibreuse et d'un abcès localisé autour de la Mb chez 9 animaux (Figure 25.C.g). On remarque aussi que la présence de la Mb est associée à une activation importante des ostéoclastes (Figure 25.B.i).

Ces observations suggèrent que l'ajout des ASCs dans la zone opératoire augmente le phénomène inflammatoire local, et il semblerait que cela soit d'autant plus important en présence des CAB-ASCs que des SC-ASCs. De plus, la présence de la Mb semble également stimuler la production et l'action des ostéoclastes, et donc la résorption de l'os à proximité du défaut osseux.

d) Effets des traitements sur les remaniements osseux précoces à 7 jours

On s'intéresse à l'apposition d'ostéoïde, premières néoformations osseuses riches en collagène non minéralisé, en épaisseur de l'os ainsi que dans l'espace du défaut osseux. L'intensité des remaniements osseux précoces est évaluée par rapport à la condition BH+BM seuls, grâce à une coloration au Picrosirius red-Fast green.

Dans toutes les conditions, on observe l'activation d'ostéoblastes au contact des calvariae, sur les faces internes et externes, et sécrétant de la matrice osseuse, ainsi que la présence d'ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse. Ces cellules indiquent donc la présence de remodelage osseux. On observe que sur les berges du défaut osseux, l'apposition moyenne d'ostéoïde en épaisseur de l'os est plus importante en présence des CAB-ASCs (CAB-ASCs: $16\ 356 \pm 1\ 129\ \mu\text{m}^2$) qu'en présence des SC-ASCs ou du BH+BM seuls (SC-ASCs: $13\ 194 \pm 2\ 252\ \mu\text{m}^2$; BH+BM : $13\ 147 \pm 2\ 709\ \mu\text{m}^2$). Ce dépôt est également plus épais chez les souris recevant en plus la membrane de collagène, seule ou avec les CAB-ASCs (Mb seule : $19\ 292 \pm 7\ 521\ \mu\text{m}^2$; CAB-ASCs+ Mb : $23\ 296 \pm 5\ 661\ \mu\text{m}^2$). En revanche chez les souris recevant la Mb et les SC-ASCs (SC-ASCs+ Mb : $15\ 712 \pm 531\ \mu\text{m}^2$), le dépôt d'ostéoïde est proche de celui observé chez les souris sans Mb (Figure 26).

Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure avec certitude sur l'influence définitive du type d'ASCs et de la présence de la Mb de collagène sur l'efficacité de la

reconstruction osseuse, mais il semblerait que la présence des CAB-ASCs et de la Mb soient les conditions qui stimulent le plus la production d'ostéoïde par les ostéoblastes à 7 jours.

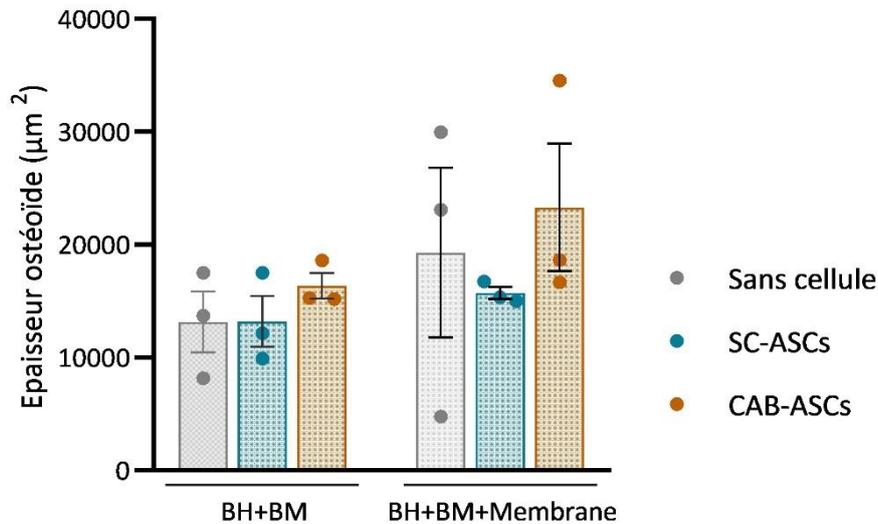


Figure 26- Ostéoïde apposée sur l'épaisseur de la calvaria à 7 jours post-opératoire.

La surface d'ostéoïde apposée en épaisseur de la calvaria dans la région péri-lésionnelle est quantifiée sur des coupes histologiques colorées au Picosirius red- Fast green, à l'aide du module HistoQuant du logiciel de 3DHistech ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$; $n=3$).

3. Cinétique courte à 14 jours post-opératoire

a) *Positionnement des biomatériaux*

Après 14 jours, les BM semblent correctement positionnés dans le défaut osseux chez 77% des animaux au total (Figure 27. A-B). A l'inverse, 23% des animaux présentent un BM localisé



Figure 27- Positionnement des particules du BM dans la lésion osseuse à 14 jours

Illustration des observations histologiques chez des animaux présentant un BM correctement placé dans la lésion (A.), ou regard de la lésion (B.) ou bien complètement en dehors du site lésionnel (C.).

A. BH+ BM+ Mb, B. BH+ BM+ SC-ASCs+ Mb, C. BH+ BM+ CAB-ASCs. - - - : bords de la lésion osseuse, O : BM.

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

en dehors de la lésion osseuse (Figure 27. C). On peut donc dire qu'une majorité des BM implantés a conservé un placement satisfaisant vis-à-vis des défauts osseux.

b) Devenir des populations d'ASCs

A 14 jours post-opératoire, les marquages immunohistochimiques de la Vimentine humaine ou du Ku80, sont positifs chez 100 % des animaux, ce qui indique que les ASCs ont persisté sur le lieu de la lésion. Néanmoins, aucune cellule n'a été retrouvée positive après marquage du Ki67, ce qui indique que les ASCs ne conservent pas ou peu leur activité de prolifération après 14 jours d'implantation *in vivo* (Figure 28).

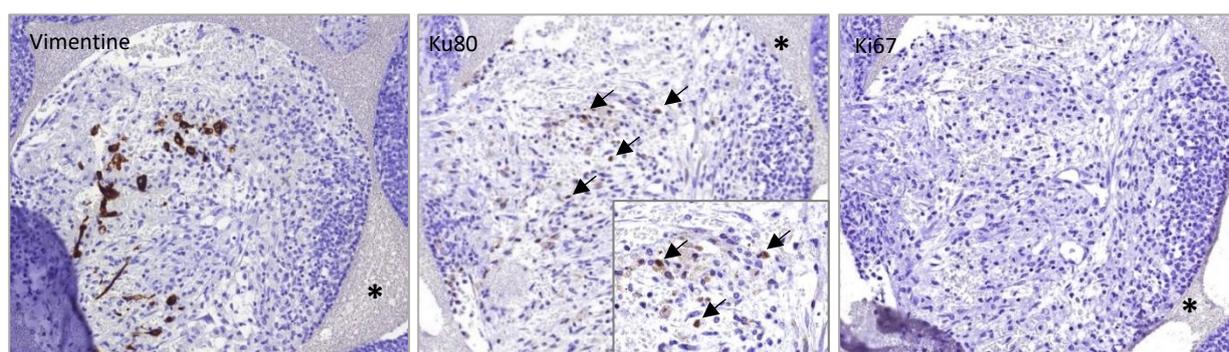


Figure 28- Persistance et activité de prolifération des ASCs sur le site lésionnel à 14 jours post-opératoire.

Marquages immunohistochimiques des ASCs apportées dans la lésion osseuse : le marquage positif de la Vimentine humaine et du Ku80 (→) montre la persistance des ASCs dans la lésion, plus précisément à l'intérieur du BM (). Le marquage des ASCs par le Ki67 est négatif chez tous les animaux, signe d'une absence de prolifération des ASCs visibles sur les coupes histologiques.*

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

c) Effets des traitements sur les remaniements osseux précoces à 14 jours.

On constate que l'épaisseur d'ostéoïde mesurée sur les berges de la lésion à 14 jours post-opératoire est presque deux fois plus importante en présence des ASCs (SC-ASCs: $40288 \pm 9456 \mu\text{m}^2$; CAB-ASCs: $38687 \pm 5898 \mu\text{m}^2$) que dans la condition sans cellules (BH+ BM : $17908 \pm 1875 \mu\text{m}^2$).

L'apposition d'ostéoïde semble également augmentée en présence de la membrane de collagène, qu'elle soit apportée seule (BH+ BM+ Mb : $59358 \pm 38945 \mu\text{m}^2$) ou conjointement aux cellules. L'épaisseur d'ostéoïde mesurée en présence des CAB-ASCs est supérieure à celle mesurée en présence des SC-ASCs (BH+BM+Mb+CAB-ASCs : $69707 \pm 34751 \mu\text{m}^2$; BH+BM+Mb+SC-ASCs : $49034 \pm 8069 \mu\text{m}^2$) (Figure 29).

Ces résultats montrent que l'utilisation des ASCs dans la lésion est associée à une production d'ostéoïde plus importante sur les berges du défaut osseux, et d'autant plus en présence de la membrane de collagène.

On ne distingue cependant pas de différence significative associée au type d'ASCs employées sur la production d'ostéoïde à 14 jours post-opératoire.

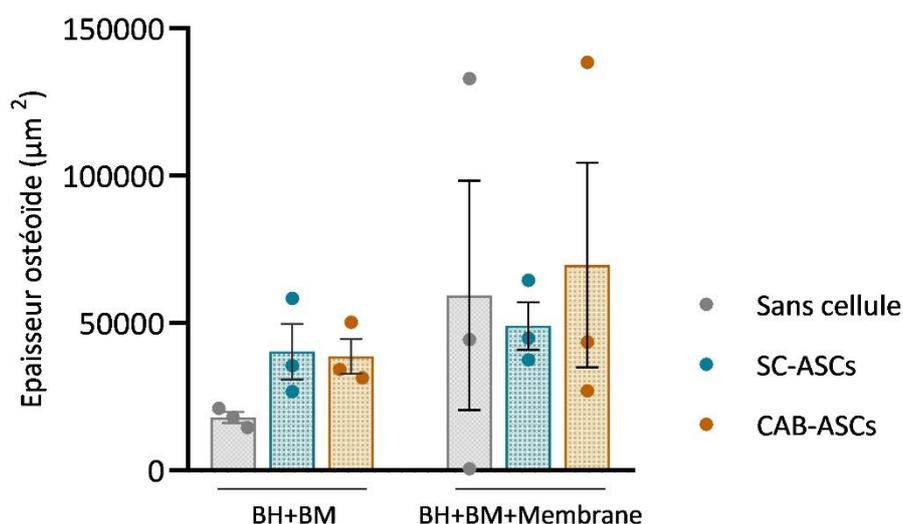


Figure 29- Ostéoïde apposée sur l'épaisseur de la calvaria à 14 jours post-opératoire.

La surface d'ostéoïde apposée en épaisseur de la calvaria dans la région péri-lésionnelle est quantifiée sur des coupes histologiques colorées au Picosirius red- Fast green, à l'aide du module Histo-Quant du logiciel de 3DHistech ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$; $n=3$).

III. Discussion

L'une des originalités de ce travail réside dans l'utilisation et la comparaison de tissus adipeux de natures différentes, prélevés chez le même donneur. L'obtention des SC-ASCs et CAB-ASCs de ces tissus nous a permis d'étudier *in vitro* les capacités spécifiques de chaque type d'ASCs en s'affranchissant des variations liées au donneur.

L'étude menée *in vitro* a confirmé, en accord avec la bibliographie, que les SC-ASCs et les CAB-ASCs ont la capacité de se différencier dans les lignées adipocytaire, chondroblastique et ostéoblastique (Kern *et al.*, 2006). Cependant, les SC-ASCs présentent une capacité de différenciation dans ces lignées bien supérieure à celle des CAB-ASCs. Ces résultats ne sont pas en accord avec la littérature, puisque Broccaioli *et al.* en 2013 ont conclu à une plus forte différenciation ostéoblastique *in vitro* des CAB-ASCs par rapport aux SC-ASCs de mêmes donneurs. Néanmoins la différence d'approche entre notre travail et celui de Broccaioli,

pourrait expliquer la divergence de nos conclusions. En effet, Broccaioli a quantifié l'activité de la phosphatase alcaline et le dépôt de collagène par les cellules en différenciation ostéoblastique, tandis que nous avons utilisé une approche moléculaire pour quantifier l'expression des autres gènes de différenciation ostéoblastique.

Les images en microscopie de la différenciation adipocytaire montrent que l'ensemble des CAB-ASCs observées sont différenciées, avec une accumulation de très nombreuses et volumineuses gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. Cela est confirmé par l'analyse de la présence de Bodipy dans les cellules en microscopie à haut débit (Figure 17 A. et B.).

De manière surprenante, l'expression des gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire est considérablement plus importante chez les SC-ASCs que chez les CAB-ASCs. Cette différence est nette pour l'expression du gène de la leptine, marqueur tardif de la différenciation adipocytaire qui n'est quasiment pas induit dans nos CAB-ASCs (Figure 17.C). Ceci nous laisse supposer que les CAB-ASCs sont différentes des SC-ASCs et que le métabolisme lipidique pourrait être la différence centrale entre ces deux types d'ASCs. Cette différence de métabolisme lipidique a déjà été montrée entre les adipocytes du TA-SC et les adipocytes isolés de la MO d'un même patient (Attané *et al.*, 2020). Une étude plus poussée des gènes impliqués dans cette différenciation et dans le métabolisme des lipides nous permettra de préciser ce point. Aucune publication n'a à ce jour montré de différence entre la morphologie et le contenu des vacuoles lipidiques de ces deux types d'ASCs. Dans notre étude, après 21 jours de différenciation adipogénique, le grand nombre et la très forte proximité des gouttelettes produites rend difficile la localisation et la délimitation précise de ces dernières. Nous souhaiterions donc améliorer la quantification des dépôts de lipides, par la mesure du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques en microscopie à fluorescence sur des temps précoces, comme dans l'étude de Ouchi *et al.* (2020) , afin de mettre en évidence de manière plus significative des différences entre les SC-ASCs et CAB-ASCs.

Le modèle murin de lésion osseuse de taille critique utilisé a été importé et mis au point récemment au laboratoire. Les données obtenues lors de ce travail montrent qu'il est nécessaire d'optimiser cette procédure expérimentale, pour améliorer la qualité des résultats *in vivo*, et d'augmenter le nombre d'animaux dans chaque condition expérimentale afin de réduire les écarts-types de nos résultats.

Dans la majorité des études publiées utilisant le modèle de lésion de taille critique de la calvaria, la lésion osseuse est de forme ronde, réalisée avec un trépan, et plutôt chez le rat. Chez la souris ces procédures chirurgicales sont minutieuses du fait de la petite taille du crâne

et de la finesse de l'os, et les essais préliminaires sur notre modèle nous ont conduit à écarter l'utilisation de trépan, qui induisait trop de dommages tissulaires, notamment sur l'encéphale. Le défaut osseux que nous avons employé ici est donc de forme carrée, et réalisé « à la main », ce qui constitue une source de variabilité inter-individuelle. Cela se traduit notamment lors du traitement histologique des calvariae, puisque la première étape de recoupe, bien que standardisée (Figure 14), n'est pas parfaitement répétable entre chaque animaux. L'évaluation histologique de la fermeture du défaut osseux reste donc partielle, d'autant plus que les mesures présentées dans ce travail n'ont été réalisées que sur une ou deux recoupes histologiques des échantillons, il sera donc nécessaire de réaliser des recoupes histologiques en série pour quantifier en « 3D » la taille de la lésion aux différentes cinétiques.

Néanmoins la mise en place en parallèle des acquisitions d'images tomodensitométriques des lésions osseuses chez nos souris a pour objectif d'évaluer la taille initiale de chaque lésion pour tous les animaux, et de suivre de manière longitudinale sa fermeture. Cela constitue donc l'une des solutions apportées permettant de compenser la variabilité issue de la procédure chirurgicale et de l'appréciation en 2D permise par l'histologie.

Les éléments apportés dans les défauts osseux, que ce soient les particules de H- β -TCP ou la membrane de collagène, sont de taille importante en comparaison de la lésion. Cela peut être à l'origine de dommages tissulaires supplémentaires dans la région opératoire, avec des réactions granulomateuses voire suppurées, parfois sévères chez certains animaux. Cela peut également nuire au maintien des particules dans le défaut osseux. Il serait donc nécessaire de choisir un biomatériau de H- β -TCP dont les particules soient plus petites.

La première phase de notre étude à 3 mois post-opératoire a permis de faire évoluer le modèle par l'ajout du BM, et des données d'imagerie par tomodensitométrie réalisées en parallèle de ce travail et obtenues à 1,5 mois (Annexe 1) suggèrent que l'effet ostéo-conducteur est plus important dans l'expérience avec le BM que dans notre première étude à 3 mois.

Les résultats obtenus à 7 jours et 14 jours post-opératoire donnent de premières informations sur le modèle et sur l'influence des ASCs *in vivo*, qui seront approfondies avec une cinétique d'étude à 3 mois traitée ultérieurement. Le marquage de la Vimentine humaine nous montre que les ASCs persistent sur le lieu d'implantation, au moins jusqu'à 14 jours. Elles adoptent une morphologie allongée, caractéristique de cellules mésenchymateuses adhérentes à leur environnement, et qui s'intègrent donc aux tissus receveurs.

Les ASCs présentent à 7 jours des taux de prolifération compris entre 4% et 22%, cohérents avec ceux obtenus dans des études antérieures utilisant également des ASCs *in vivo* intégrées

au même BH (données du laboratoire). Cependant cette activité de prolifération semble s'estomper au fil du temps, puisqu'elle n'a pas pu être mise en évidence après 14 jours.

Les SC-ASCs et les CAB-ASCs résistent donc bien à l'implantation *in vivo* malgré la présence d'un contexte inflammatoire marqué. La présence des ASCs est également associée à une production plus importante d'ostéoïde en périphérie du défaut osseux, ce qui est clairement visible après 14 jours (Figure 29). Cela nous permet donc d'envisager un effet bénéfique des CAB-ASCs et SC-ASCs sur l'induction du remodelage osseux, bien que nos résultats ne permettent pas de conclure sur une différence significative entre les deux types d'ASCs.

L'ajout de la Membrane de collagène est concomitant à une forte production d'ostéoïde en épaisseur de l'os et dans le défaut osseux, ainsi qu'à la présence d'ostéoclastes en quantité plus importante qu'avec les autres traitements. La Membrane pourrait ainsi stimuler le remodelage osseux, aussi bien concernant la phase de résorption par les ostéoclastes que d'ostéoproduction par les ostéoblastes. Cela pourrait s'expliquer de deux manières. Les pré-ostéoclastes étant des cellules de la lignée myéloïde (Harada et Rodan, 2003; Takayanagi, 2007), leur activation est médiée par l'action de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF...). Le contexte de forte inflammation observé avec la Membrane (Figure 25 C.g-h), pourrait donc exacerber l'activation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes actifs, et donc leur action résorptive. On sait aussi que les contraintes mécaniques exercées sur l'os favorisent son remodelage par les ostéoclastes et les ostéoblastes (Moreira *et al.*, 2000). La contrainte mécanique liée à l'ajout de la Membrane, pourrait stimuler la production d'ostéoïde et d'ostéoclastes chez les animaux.

L'étude *in vivo* est en contradiction avec les résultats de l'étude *in vitro* sur la différenciation ostéoblastique. L'effet des CAB-ASCs pourrait donc être médié par la sécrétion de facteurs solubles, plutôt que par leur aptitude à se différencier en ostéoblastes. En effet, de nombreuses études ont déjà mis en évidence l'effet bénéfique des MSCs via une activité paracrine (Eggenhofer et Hoogduijn, 2012; Linero et Chaparro, 2014; Liang *et al.*, 2016; Naji *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019).

Enfin, nos résultats montrent aussi que la présence de la Membrane semble réduire la prolifération des ASCs. Cela a aussi été observé dans des cinétiques ultérieures de 24h et 72h post opératoire (données non montrées), et pourrait être dû au fort contexte inflammatoire. Notre modèle animal possède cependant des limites. En effet, les particules du BM ne conservent pas leur place au sein du défaut osseux chez 50% des souris, ce qui est confirmé par imagerie tomodensitométrique à 4 et 45 jours post opératoire (Annexe 1 A à D). Cela ne

nous permet donc pas de déterminer si la présence du BM peut servir de support aux ASCs et favoriser leur persistance et leur action dans la lésion osseuse. Cependant les produits de dégradation du H- β -TCP des particules de BM créent un environnement propice à la stimulation du remodelage osseux, même si ces dernières ne sont pas parfaitement logées dans le défaut osseux. L'analyse de ces animaux reste toutefois intéressante car elle nous permet d'évaluer l'action possible des ASCs à distance de la lésion, par la production de facteurs solubles.

En plus de l'élaboration du modèle *in vivo*, les techniques de colorations et d'analyses histomorphométriques sur lames virtuelles n'étaient à ce jour pas toutes utilisées en routine au laboratoire, et nécessitent par essence de nombreuses mises au point tout au long de ce travail, notamment pour la conception et la validation des masques appliqués aux lames histologiques numérisées. Les méthodes de coloration histochimiques classiques nous ont permis de caractériser qualitativement les phénomènes inflammatoires ainsi que l'action des cellules actrices du remodelage osseux (les ostéoblastes et ostéoclastes). Il est important de souligner que nous avons également souhaité mettre en place des analyses histomorphométriques, ce qui nous a permis une approche quantitative, faiblement biaisée et plus répétable dans le traitement des échantillons histologiques. Cela nécessite néanmoins un protocole de coloration des échantillons standardisé, pour obtenir des teintes et nuances de coloration constantes. De fortes variabilités de couleur ont parfois été obtenues, ce qui peut interférer avec l'application des masques d'analyse histomorphométrique.

L'histomorphométrie a été utilisée pour quantifier la surface des néoformations osseuses en épaisseur de l'os avec la coloration au Picrosirius red- Fast-green. Une autre méthode d'analyse est envisagée afin de quantifier l'ostéoïde produite à l'intérieur de la lésion : des premiers essais ont été élaborés, avec la mesure des quantités d'ostéoïde, de cellules, et de fibres de collagène présentes dans le défaut osseux (Figure 30), mais demandent encore un travail de mise au point pour être adaptés à nos objectifs de quantification.

Enfin, la qualité de la reconstruction osseuse et tissulaire étant dépendante de la revascularisation du site lésionnel, nous pourrions envisager de réaliser des marquages immunohistochimiques spécifiques des vaisseaux sanguins (CD31), afin de localiser et de quantifier par histomorphométrie l'angiogenèse survenant en présence des différents types d'ASCs dans le site opératoire.

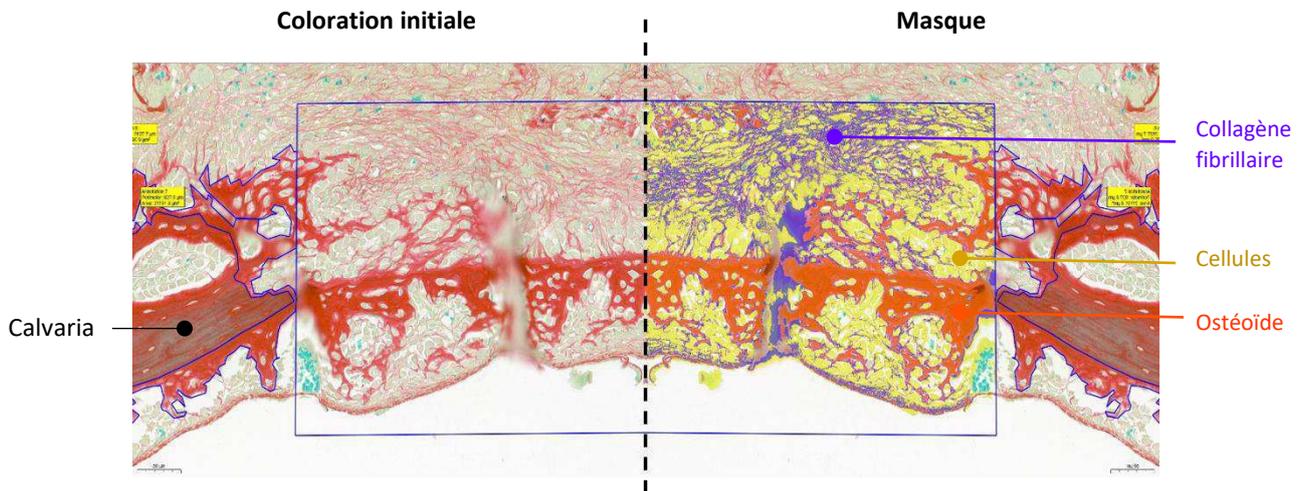


Figure 30- Masque d'analyse histomorphométrique pour la quantification des constituants tissulaires intra-lésionnels, Picosiriusred - Fast-Green, x40.

Le masque histomorphométrique permet d'attribuer une couleur à différents constituants tissulaires : rouge : ostéoïde, jaune : cellules, bleu : collagène fibrillaire. Cadre : Lésion osseuse.

(Source : Photographies personnelles, LabHPEC)

IV. Conclusion

Grâce à l'étude des SC-ASCs et CAB-ASCs isolées à partir de tissus adipeux prélevés de mêmes donneurs, nous avons pu confirmer que ces deux types d'ASCs peuvent s'engager dans les voies de différenciation adipogénique, ostéoblastique et chondroblastique. Bien que les SC-ASCs semblent avoir un potentiel de différenciation osseuse supérieur à celui des CAB-ASCs *in vitro*, il semble intéressant de poursuivre l'étude de leur application *in vivo*. Il sera également nécessaire de poursuivre ce travail afin d'augmenter l'effectif de donneurs étudiés, et d'approfondir la caractérisation des CAB-ASCs après différenciation adipocytaire.

Enfin, notre première étude *in vivo* a montré que les ASCs ne favorisent pas la reconstruction osseuse seules, mais qu'elles semblent plus à même de favoriser l'ostéoproduction lorsqu'elles sont associées à un BM. Les observations histologiques suggèrent ainsi que les CAB-ASCs permettraient un dépôt d'os néoformé plus important que les SC-ASCs, et pourraient donc mieux supporter la reconstruction osseuse.

Ces résultats ouvrent la voie à l'analyse d'un plus grand nombre d'animaux et à d'autres cinétiques d'étude pour évaluer l'efficacité de la reconstruction osseuse permise par les CAB-ASCs, et à une meilleure connaissance du modèle animal utilisé.

En plus de pouvoir justifier les qualités du CAB dans son utilisation actuelle en chirurgie orale, la poursuite de l'étude des CAB-ASCs permettra d'apporter des éléments de compréhension

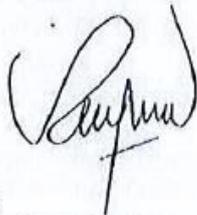
supplémentaires de la biologie du CAB, dans l'optique de développer *in fine* des thérapies cellulaires innovantes pour l'homme.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CUVE LIER Marie** intitulée « **CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT DE MEDICAMENT DE THERAPIE INNOVANTE A BASE D'ASCS POUR LA REPARATION DES LESIONS OSSEUSES DE LA FACE CHEZ L'HOMME : COMPARAISON DES ASCS ISOLEES DU CORPS ADIPEUX DE LA BOUCHE ET DU TISSU ADIPEUX SOUS-CUTANE** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 04/11/2021
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Isabelle RAYMOND-LETRON



Vu :
Le Président du jury
Professeur Philippe KEMOUN



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO



Mme CUVELIER Marie
a été admis(e) sur concours en : 2016
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 06/07/2020
a validé son année d'approfondissement le: 15/07/2021
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Université
de Toulouse

Bibliographie

- Attané, C., Estève, D., Chaoui, K., Iacovoni, J. S., Corre, J., Moutahir, M., Valet, P., Schiltz, O., Reina, N. et Muller, C. (2020). Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism. *Cell Reports*, 30(4), 949-958.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.089>
- Bacha, W. J. et Bacha, L. M. (2012). *Color atlas of veterinary histology* (3. ed). Wiley-Blackwell.
- Bajestan, M. N., Rajan, A., Edwards, S. P., Aronovich, S., Cevidane, L. H. S., Polymeri, A., Travan, S. et Kaigler, D. (2017). Stem cell therapy for reconstruction of alveolar cleft and trauma defects in adults: A randomized controlled, clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19(5), 793-801. <https://doi.org/10.1111/cid.12506>
- Baptista, L. S. (2020). Adipose stromal/stem cells in regenerative medicine: Potentials and limitations. *World Journal of Stem Cells*, 12(1), 1-7. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i1.1>
- Benda, C. et Weyand, B. (dir.). (2013). *Mesenchymal stem cells: basics and clinical application*. 1: Birgit Weyand ...With contributions by Christina Benda. Springer.
- Billon, N. et Dani, C. (2012). Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(1), 55-66. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9242-x>
- Bosch, C., Melsen, B. et Vargervik, K. (1998). Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials: *Journal of Craniofacial Surgery*, 9(4), 310-316. <https://doi.org/10.1097/00001665-199807000-00004>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. et Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L. M., Arrigoni, E., Yenagi, V. et Brini, A. T. (2013). Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: *In vitro* Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access*, 2(2), 107-117. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0291>
- Caplan, A. I. et Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076-1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>
- Catros, S., Guillemot, F., Amédée, J. et Fricain, J.-C. (2010). Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 16(4), 227-237. <https://doi.org/10.1051/mbcb/2010031>

- Choi, J. W., Jeong, W. S., Yang, S. J., Park, E. J., Oh, T. S. et Koh, K. S. (2016). Appropriate and Effective Dosage of BMP-2 for the Ideal Regeneration of Calvarial Bone Defects in Beagles: *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(1), 64e-72e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002290>
- Choi, J. W., Park, E. J., Shin, H. S., Shin, I. S., Ra, J. C. et Koh, K. S. (2014). In Vivo Differentiation of Undifferentiated Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Critical-Sized Calvarial Bone Defects: *Annals of Plastic Surgery*, 72(2), 225-233. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31825f70f5>
- Cremers, S., Garnero, P. et Seibel, M. J. (2008). Biochemical Markers of Bone Metabolism. Dans *Principles of Bone Biology* (p. 1857-1881). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00020-3>
- Cui, F.-Z., Li, Y. et Ge, J. (2007). Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 57(1-6), 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.04.001>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. et Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Directive 2001/83/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. , n° L 311/67 (2001). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0083>
- Directive (CE) 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, J.O.U.E, L 276/33 du 20.10.2010. , n° L 276/33. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32010L0063>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. et Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Ducy, P. (2000). Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 219(4), 461-471. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999::AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C)
- Dumont, T., Simon, E., Stricker, M., Kahn, J.-L. et Chassagne, J.-F. (2007). La graisse de la face : anatomie descriptive et fonctionnelle à partir d'une revue de la littérature et de dissections de dix hémifaces. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, 52(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2006.04.003>

- Eggenhofer, E. et Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplantation Research*, 1(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2047-1440-1-12>
- Egyedi, P. (1977). Utilization of the buccal fat pad for closure of oro-antral and/or oro-nasal communications. *Journal of Maxillofacial Surgery*, 5(4), 241-244. [https://doi.org/10.1016/s0301-0503\(77\)80117-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0503(77)80117-3)
- El Haddad, S. A., Abd El Razzak, M. Y. et El Shall, M. (2008). Use of Pedicled Buccal Fat Pad in Root Coverage of Severe Gingival Recession Defect. *Journal of Periodontology*, 79(7), 1271-1279. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070176>
- English, K., French, A. et Wood, K. J. (2010). Mesenchymal Stromal Cells: Facilitators of Successful Transplantation? *Cell Stem Cell*, 7(4), 431-442. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.09.009>
- Fageeh, H. N. (2021). Preliminary Evaluation of Proliferation, Wound Healing Properties, Osteogenic and Chondrogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells Obtained from Healthy and Periodontitis Affected Teeth. *Cells*, 10(8), 2118. <https://doi.org/10.3390/cells10082118>
- Fan, Q., Bai, J., Shan, H., Fei, Z., Chen, H., Xu, J., Ma, Q., Zhou, X. et Wang, C. (2021). Implantable blood clot loaded with BMP-2 for regulation of osteoimmunology and enhancement of bone repair. *Bioactive Materials*, 6(11), 4014-4026. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.008>
- Farré-Guasch, E., Martí-Pagès, C., Hernández-Alfaro, F., Klein-Nulend, J. et Casals, N. (2010). Buccal Fat Pad, an Oral Access Source of Human Adipose Stem Cells with Potential for Osteochondral Tissue Engineering: An *In vitro* Study. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(5), 1083-1094. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0487>
- Faure, A., Dufour, C. et Ltaief-Boudrigua, A. (2020). Tumeurs et pseudotumeurs maxillo-mandibulaires : revue iconographique et aide à l'orientation diagnostique. *Journal d'imagerie diagnostique et interventionnelle*, S2543343120302256. <https://doi.org/10.1016/j.jidi.2020.11.004>
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarrón, M. et Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 11(2), E151-157.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. et Keiliss-Borok, I. V. (1974). STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES: Cloning *In vitro* and Retransplantation *In Vivo*. *Transplantation*, 17(4), 331-340. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>

- Gaur, S. et Agnihotri, R. (2021). Application of Adipose Tissue Stem Cells in Regenerative Dentistry: A Systematic Review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 11(3), 266-271. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_43_21
- Gavalda, C. et Bagan, J. (2016). Concept, diagnosis and classification of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. A review of the literature. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, e260-e270. <https://doi.org/10.4317/medoral.21001>
- Griffin, M., Kalaskar, D. M., Butler, P. E. et Seifalian, A. M. (2014). The Use of Adipose Stem Cells in Cranial Facial Surgery. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(5), 671-685. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9522-3>
- Hanna, E., Rémuzat, C., Auquier, P. et Toumi, M. (2016). Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *Journal of Market Access & Health Policy*, 4(1), 31036. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>
- Harada, S. et Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937), 349-355. <https://doi.org/10.1038/nature01660>
- Herve, V. (2018, 20 mars). Les traumatismes maxillo-faciaux et leurs implications en pratique odontologique: Intérêts d'une approche pluri-disciplinaire. Université de Lorraine.
- Hewitt, C. et Farah, C. S. (2007). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a comprehensive review: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 36(6), 319-328. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00540.x>
- Hickson, L. J., Abedalqader, T., Ben-Bernard, G., Mondy, J. M., Bian, X., Conley, S. M., Zhu, X., Herrmann, S. M., Kukla, A., Lorenz, E. C., Kim, S. R., Thorsteinsdottir, B., Lerman, L. O. et Murad, M. H. (2021). A systematic review and meta-analysis of cell-based interventions in experimental diabetic kidney disease. *STEM CELLS Translational Medicine*, sctm.19-0419. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0419>
- Hogan, M. V., Bagayoko, N., James, R., Starnes, T., Katz, A. et Chhabra, B. A. (2011). Tissue Engineering Solutions for Tendon Repair: American Academy of Orthopaedic Surgeon, 19(3), 134-142. <https://doi.org/10.5435/00124635-201103000-00002>
- Horrión, J. et Milicevic, M. (2019). [Exploration of destructive lesions of the jaws]. *Revue Medicale De Liege*, 74(12), 672-676.
- Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P. et Picart, C. (2018). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143-162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>

- Johari, B., Ahmadzadehzarajabad, M., Azami, M., Kazemi, M., Soleimani, M., Kargozar, S., Hajighasemlou, S., Farajollahi, M. M. et Samadikuchaksaraei, A. (2016). Repair of rat critical size calvarial defect using osteoblast-like and umbilical vein endothelial cells seeded in gelatin/hydroxyapatite scaffolds: Repair of Rat Critical Size Calvarial Defect. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(7), 1770-1778. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35710>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. et Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Khojasteh, A., Hosseinpour, S., Rad, M. R. et Alikhasi, M. (2019). Buccal Fat Pad-Derived Stem Cells in Three-Dimensional Rehabilitation of Large Alveolar Defects: A Report of Two Cases. *Journal of Oral Implantology*, 45(1), 45-54. <https://doi.org/10.1563/aid-joi-D-17-00215>
- Khojasteh, A. et Sadeghi, N. (2016). Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillomandibular atrophy: a preliminary human study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45(7), 864-871. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.01.003>
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire: une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck.
- Kim, S.-S., Park, M. S., Cho, S.-W., Kang, S. W., Ahn, K.-M., Lee, J.-H. et Kim, B.-S. (2010). Enhanced bone formation by marrow-derived endothelial and osteogenic cell transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A(1), 246-253. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32360>
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S. et Epstein, S. E. (2004). Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote *In vitro* and *In Vivo* Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circulation Research*, 94(5), 678-685. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC>
- Kolios, G. et Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3-10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Langer, R. et Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lesclous, P., Abi Najm, S., Carrel, J.-P., Baroukh, B., Lombardi, T., Willi, J.-P., Rizzoli, R., Saffar, J.-L. et Samson, J. (2009). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone*, 45(5), 843-852. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.07.011>

- Li, G., Wang, X., Cao, J., Ju, Z., Ma, D., Liu, Y. et Zhang, J. (2014). Coculture of peripheral blood CD34+ cell and mesenchymal stem cell sheets increase the formation of bone in calvarial critical-size defects in rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52(2), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2013.10.004>
- Li, W., Liu, Y., Zhang, P., Tang, Y., Zhou, M., Jiang, W., Zhang, X., Wu, G. et Zhou, Y. (2018). Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(6), 5240-5254. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17620>
- Li, Y., Chen, S.-K., Li, L., Qin, L., Wang, X.-L. et Lai, Y.-X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3(3), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2015.05.002>
- Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L. et Stein, G. S. (2004). Regulatory Controls for Osteoblast Growth and Differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML Factors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 14(1-2), 1-42. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v14.i12.10>
- Lian, M., Sun, B., Han, Y., Yu, B., Xin, W., Xu, R., Ni, B., Jiang, W., Hao, Y., Zhang, X., Shen, Y., Qiao, Z. et Dai, K. (2021). A low-temperature-printed hierarchical porous sponge-like scaffold that promotes cell-material interaction and modulates paracrine activity of MSCs for vascularized bone regeneration. *Biomaterials*, 274, 120841. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120841>
- Liang, X., Zhang, L., Wang, S., Han, Q. et Zhao, R. C. (2016). Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *Journal of Cell Science*, 129(11), 2182-2189. <https://doi.org/10.1242/jcs.170373>
- Linero, I. et Chaparro, O. (2014). Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration. *PLoS ONE*, 9(9), e107001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107001>
- Liu, T., Xu, J., Pan, X., Ding, Z., Xie, H., Wang, X. et Xie, H. (2021). Advances of adipose-derived mesenchymal stem cells-based biomaterial scaffolds for oral and maxillofacial tissue engineering. *Bioactive Materials*, 6(8), 2467-2478. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.015>
- Liu, Y., Wang, H., Dou, H., Tian, B., Li, L., Jin, L., Zhang, Z. et Hu, L. (2020). Bone regeneration capacities of alveolar bone mesenchymal stem cells sheet in rabbit calvarial bone defect. *Journal of Tissue Engineering*, 11, 204173142093037. <https://doi.org/10.1177/2041731420930379>
- Má, B., Ds, M., B, B., S, G., P, H., C, T., C, C., Mp, G. et P, L. (2021). Biomimetic versus sintered macroporous calcium phosphate scaffolds enhanced bone regeneration and human

mesenchymal stromal cell engraftment in calvarial defects. *Acta Biomaterialia*, S174270612100595X. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.09.007>

Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences*, 17(12), 1252-1259. <https://doi.org/10.1051/medsci/200117121252>

Martín-Granizo, R., Naval, L., Costas, A., Goizueta, C., Rodriguez, F., Monje, F., Muñoz, M. et Diaz, F. (1997). Use of buccal fat pad to repair intraoral defects: review of 30 cases. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 35(2), 81-84. [https://doi.org/10.1016/S0266-4356\(97\)90680-X](https://doi.org/10.1016/S0266-4356(97)90680-X)

Marx, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61(9), 1115-1117. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(03\)00720-1](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(03)00720-1)

Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C. et Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2204-2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>

Meshram, M., Anchlia, S., Shah, H., Vyas, S., Dhuvad, J. et Sagarka, L. (2019). Buccal Fat Pad-Derived Stem Cells for Repair of Maxillofacial Bony Defects. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 18(1), 112-123. <https://doi.org/10.1007/s12663-018-1106-3>

Miron, R. J. et Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *Journal of Dental Research*, 91(8), 736-744. <https://doi.org/10.1177/0022034511435260>

Moreira, C. A., Dempster, D. W. et Baron, R. (2000). Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. Dans K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (dir.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279149/>

Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N. et Suganuma, N. (2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17), 3323-3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>

Najm, S. A., Lesclous, P., Lombardi, T., Bouzouita, I., Carrel, J.-P. et Samson, J. (2008). Ostéonécrose des maxillaires dues aux bisphosphonates : mise au point. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 14(1), 5-18. <https://doi.org/10.1051/mbcb/2008015>

Offner, D. (2017, 15 septembre). Régénération des lésions osseuses maxillo-faciales: épidémiologie, stratégie innovantes au service des patients, qualité et réflexions éthiques. Université de Strasbourg.

- Ouchi, K., Yoshie, S., Miyake, M. et Hazama, A. (2020). Cl- channels regulate lipid droplet formation via Rab8a expression during adipocyte differentiation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(2), 247-255. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1677143>
- Owen, M. et Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*, 136, 42-60. <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>
- Paduano, F., Marrelli, M., Amantea, M., Rengo, C., Rengo, S., Goldberg, M., Spagnuolo, G. et Tatullo, M. (2017). Adipose Tissue as a Strategic Source of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration: A Topical Review on the Most Promising Craniomaxillofacial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2140. <https://doi.org/10.3390/ijms18102140>
- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Planat-Benard, V., Silvestre, J.-S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Pénicaud, L. et Casteilla, L. (2004). Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61>
- Rada, T., Reis, R. L. et Gomes, M. E. (2009). Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 15(2), 113-125. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0423>
- Rathod, N., Khobaragade, B. et Ganesan, K. (2021). Use of the temporal extension of the buccal fat pad for closure of oro-antral communications. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, S090150272100093X. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2021.02.030>
- Règlement (CE) N°1394/2007 du Parlement Européen et du Conseil du 13 Novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004, J.O.U.E. , n° L 324/121 (2007). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32007R1394>
- Rikitake, K., Kunimatsu, R., Yoshimi, Y., Nakajima, K., Hiraki, T., Aisyah Rizky Putranti, N., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., Hayashi, Y., Nikawa, H. et Tanimoto, K. (2021). Effect of CD146+ SHED on bone regeneration in a mouse calvaria defect model. *Oral Diseases*, odi.14020. <https://doi.org/10.1111/odi.14020>
- Saeedi, P., Halabian, R. et Imani Fooladi, A. A. (2019). A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investigation*, 6, 34-34. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.08.11>

- Sávio-Silva, C., Soinski-Sousa, P. E., Simplício-Filho, A., Bastos, R. M. C., Beyerstedt, S. et Rangel, É. B. (2021). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in a Pre-Clinical Model of Diabetic Kidney Disease and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1546. <https://doi.org/10.3390/ijms22041546>
- Schmitz, J. P. et Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (205), 299-308.
- Shanbhag, S., Pandis, N., Mustafa, K., Nyengaard, J. R. et Stavropoulos, A. (2017). Cell Cotransplantation Strategies for Vascularized Craniofacial Bone Tissue Engineering: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical In Vivo Studies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(2), 101-117. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0283>
- Shi, S. et Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(4), 696-704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>
- Stanovici, J., Le Nail, L.-R., Brennan, M. A., Vidal, L., Trichet, V., Rosset, P. et Layrolle, P. (2016). Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Current Research in Translational Medicine*, 64(2), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.006>
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology*, 7(4), 292-304. <https://doi.org/10.1038/nri2062>
- Torquato, L. C., Suárez, E. A. C., Bernardo, D. V., Pinto, I. L. R., Mantovani, L. O., Silva, T. I. L., Jardini, M. A. N., Santamaria, M. P. et De Marco, A. C. (2021). Bone repair assessment of critical size defects in rats treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study. *Lasers in Medical Science*, 36(7), 1515-1525. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03234-5>
- Tostevin, P. M. J. et Ellis, H. (1995). The buccal pad of fat: A review. *Clinical Anatomy*, 8(6), 403-406. <https://doi.org/10.1002/ca.980080606>
- Uda, Y., Azab, E., Sun, N., Shi, C. et Pajevic, P. D. (2017). Osteocyte Mechanobiology. *Current Osteoporosis Reports*, 15(4), 318-325. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0373-0>
- Vaculik, C., Schuster, C., Bauer, W., Iram, N., Pfisterer, K., Kramer, G., Reinisch, A., Strunk, D. et Elbe-Bürger, A. (2012). Human Dermis Harbors Distinct Mesenchymal Stromal Cell Subsets. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 563-574. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.355>

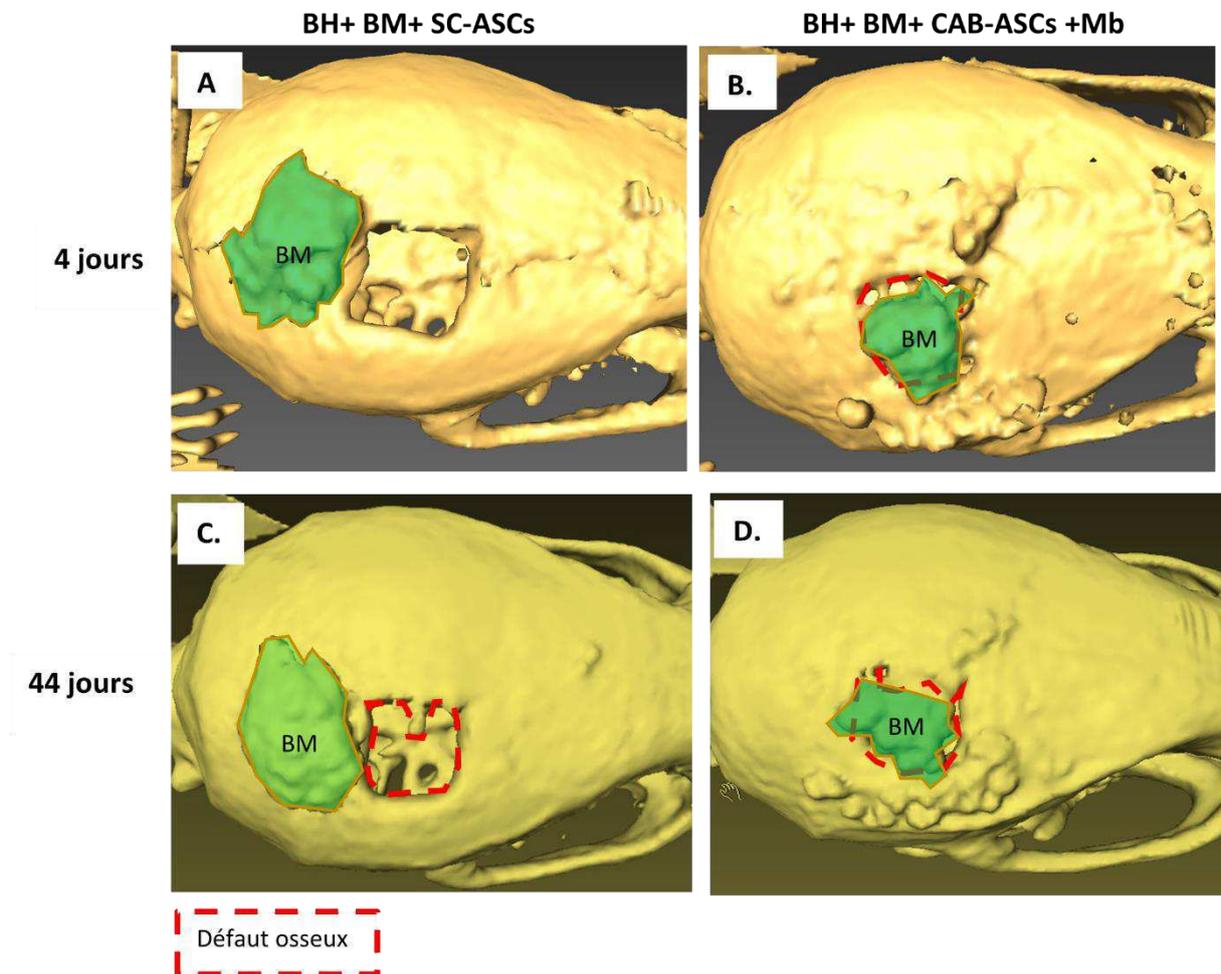
- Varshney, S., Dwivedi, A. et Pandey, V. (2020). Efficacy of autologous stem cells for bone regeneration during endosseous dental implants insertion - A systematic review of human studies. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(4), 347-355. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2020.06.007>
- Vuillemin, T., Raveh, J. et Ramon, Y. (1988). Reconstruction of the maxilla with bone grafts supported by the buccal fat pad. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(2), 100-105. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(88\)90258-3](https://doi.org/10.1016/0278-2391(88)90258-3)
- Wehrhan, F., Amann, K., Molenberg, A., Lutz, R., Neukam, F. W. et Schlegel, K. A. (2012). PEG matrix enables cell-mediated local BMP-2 gene delivery and increased bone formation in a porcine critical size defect model of craniofacial bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 23(7), 805-813. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02223.x>
- Wei, W. et Dai, H. (2021). Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges. *Bioactive Materials*, 6(12), 4830-4855. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.011>
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B. et 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: Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368-374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x>
- Willekens, B., Wens, I., Wouters, K., Cras, P. et Cools, N. (2021). Safety and immunological proof-of-concept following treatment with tolerance-inducing cell products in patients with autoimmune diseases or receiving organ transplantation: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Autoimmunity Reviews*, 102873. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102873>
- Williams, D. et Zhang, X. (dir.). (2019). II - Biomaterials and biomedical materials. Dans *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century* (p. 15-23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818291-8.00002-X>
- Xue, C., Shen, Y., Li, X., Li, B., Zhao, S., Gu, J., Chen, Y., Ma, B., Wei, J., Han, Q. et Zhao, R. C. (2018). Exosomes Derived from Hypoxia-Treated Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through the PKA Signaling Pathway. *Stem Cells and Development*, 27(7), 456-465. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0296>
- Ye, J.-H., Xu, Y.-J., Gao, J., Yan, S.-G., Zhao, J., Tu, Q., Zhang, J., Duan, X.-J., Sommer, C. A., Mostoslavsky, G., Kaplan, D. L., Wu, Y.-N., Zhang, C.-P., Wang, L. et Chen, J. (2011). Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials*, 32(22), 5065-5076. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.053>

- Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. A. et Evans, G. R. D. (2007). In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Tissue Engineering*, 13(3), 619-627. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0102>
- Zhao, D., Cui, D., Wang, B., Tian, F., Guo, L., Yang, L., Liu, B. et Yu, X. (2012). Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone*, 50(1), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.002>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. et Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

ANNEXES

Annexe 1- Imagerie par tomodensitométrie à 4 jours et 44 jours post opératoire.

Le suivi par tomographie des souris appartenant à la deuxième étude en cinétique longue (traitement avec le BM, jusqu'à 3 mois) a été réalisé à 4 jours et 44 jours post-opératoire. On peut ainsi corréler les observations histologiques relatives à la position des BM par rapport au défaut osseux faites sur la cinétique précoce à 7 jours post-opératoire, avec environ 50% des BM localisés en dehors de la lésion (A.), et 50% dans la lésion ou en regard (B.). On peut également apprécier l'initiation de la fermeture du défaut osseux après 44 jours (C. et D.).



Annexe 2- Protocole de coloration histochimique à l'hémalun-éosine.

COLORATION HEMALUN- EOSINE

PREMIERE ETAPE : DEPARAFFINAGE

- 5 minutes dans le toluène

SECONDE ETAPE : REHYDRATATION

- 5 minutes dans alcool absolu
- 5 minutes alcool à 95°
- 5 minutes sous eau du robinet
- éponger les lames

TROISIEME ETAPE : COLORATION ET MONTAGE

- 3 min dans le *colorant hémalun*(colorant nucléaire)
- rincer à l' eau : ajouter 3 gouttes d' ammoniaque et laisser couler l' eau
- nettoyer les contours avec du papier
- 30 secondes dans le *colorant éosine* ; rincer en faisant des bains rapides (eau)
- alcool à 95° décolore l' éosine , laisser assez longtemps si les lames sont trop roses .
- passage à l'alcool absolu
- toluène
- effectuer le montage des lames avec du baume.

RESULTATS :

- les noyaux sont colorés en bleu.
- les cytoplasmes sont colorés en rose.

PRODUITS :

- hémalun de MAYER réactif de RAL
- éosine à 2 % : éosine jaunâtre 1 g
érythrosine 1 g
eau distillée 100 ml.

Annexe 3- Référence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase utilisé en immunohistochimie



DakoCytomation ARK™ (Animal Research Kit), Peroxidase for Mouse Primary Antibodies

Code K3954 15 mL

Code K3955 110 mL

Intended use

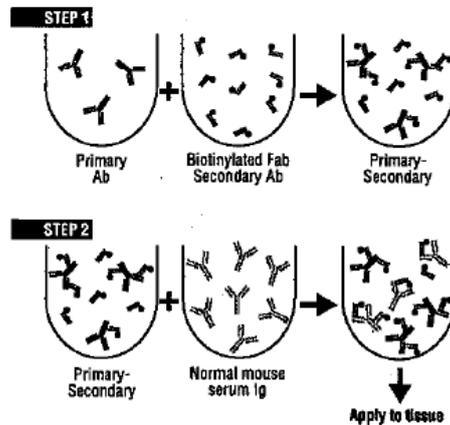
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Summary and explanation

These instructions apply to the ARK™ (Animal Research Kit), Peroxidase. This system is intended for use with primary antibodies from mouse supplied by the user for the qualitative identification of antigens by light microscopy in normal and pathological formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, cryostat tissues or cell preparations from any animal species.

The ARK is designed for immunohistochemical staining with mouse primary antibodies on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, cryostat tissues or cell preparations from any species, including mouse. The techniques used in this system are based on the avidin-biotin and peroxidase methodologies.¹⁻⁷ This system is formulated to minimize reactivity of secondary anti-mouse antibody with endogenous immunoglobulin that may be present in the specimen. Prior to application of the primary antibody to the specimen, the antibody is labelled using the Biotinylation Reagent, a modified biotinylated anti-mouse immunoglobulin. The primary antibody and the Biotinylation Reagent are mixed in solution, resulting in binding of biotinylated secondary antibody to the primary antibody.^{8,9} The Blocking Reagent, containing normal mouse serum, is then added to the mixture. The mouse immunoglobulin present in the Blocking Reagent binds residual Biotinylation Reagent not bound to the primary antibody, minimizing potential interaction with immunoglobulin endogenous in the specimen (see Figure 1).^{10,11} The biotin-labelled primary antibody is then applied to the specimen. The specimen is next incubated with streptavidin-peroxidase, followed by reaction with diaminobenzidine/hydrogen peroxide as substrate-chromogen.

Figure 1



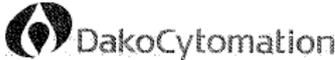
Principles of procedure

Endogenous peroxidase activity is quenched by incubating the specimen for five minutes with Peroxidase Block. The specimen is then incubated for 15 minutes with the prepared biotinylated primary antibody, followed by a 15-minute incubation with streptavidin-peroxidase. Staining is completed by a 5-minute incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB)+ substrate-chromogen which results in a brown-colored precipitate at the antigen site.

(113646-001)

302425_032105 p. 1/12

Annexe 4-- Référence de l'anticorps primaire dirigé contre la Vimentine humaine utilisé en immunohistochimie

 	
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone V9 Code No./ Code/ Code-Nr. M 0725 Edition/ Ausgabe 18.12.02	
ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels primarily cells of mesenchymal origin in normal and neoplastic tissues, and is of value in tumour diagnosis. Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies – especially antibodies against other types of intermediate filaments (1). Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Introduction	Vimentin is a 57 kDa intermediate filament (IF) protein, which form part of the cytoskeleton of vertebrate cells. Among the five classes* of IFs, comprising nine groups, vimentin belongs to class III, showing a high degree of specificity for cells of mesenchymal origin. The cell type specificity, displayed by each of the IF subtypes, was initially thought to be retained in malignant cells as well as their normal counterpart, which made IFs important as diagnostic markers in histogenesis. The coexpression of intermediate filaments, particularly vimentin and cytokeratin, has now been demonstrated in a variety of normal cells/tissues and in neoplastic lesions, necessitating the use of a panel of antibodies in differential tumour diagnosis (2). *Recently, an additional class (i.e. class VI) was created for nestin (2).
Reagent provided	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L Na ₂ S ₂ O ₃ . Clone: V9 (3), isotype: IgG1, kappa. Mouse IgG concentration: see label on vial.
Immunogen	Purified vimentin from porcine eye lens (3).
Specificity	In Western blotting of purified porcine vimentin, the antibody labels a single band of 57 kDa corresponding to vimentin. When applying whole cell extracts of cell lines expressing vimentin plus glial fibrillary acidic protein (GFAP), and vimentin plus desmin, respectively, the antibody labels specifically the 57 kDa vimentin band. As directly shown by these experiments, the antibody does not react with the two IF proteins most closely related to vimentin, i.e. desmin and GFAP (3). In immunocytochemistry the antibody labels the vimentin-positive human cell lines IMR90, RD, glioma and HeLa (3). As demonstrated by immunocytochemistry, the antibody cross-reacts with the vimentin-equivalent protein in man, cow, dog, hamster, horse, rhesus and African green monkey, rabbit, rat and kangaroo. No cross-reaction with mouse vimentin could be demonstrated, and results on chicken specimens are contradictory (3, 4).
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.
Specimen preparation	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. Optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code no. S 3308, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 8.5. Less optimal results are obtained with 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. However, DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, and pre-treatment of tissues with proteinase K were found destructive of the epitope. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling frozen sections or fixed cell smears (3).
Staining procedure	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, code No. M 0725, may be used at a dilution range of 1:50-1:100 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval solution, High pH, code No. S 3308, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG1, code No. X 0831, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit. <u>Automation:</u> The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation autostainer.
Performance characteristics	Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic staining pattern. <u>Normal tissues:</u> In general, most human mesenchymal cells are labelled by the antibody, including fibrocytes, lipocytes, smooth muscle cells, vascular endothelial cells, astrocytes, peripheral nerve (Schwann) cells, macrophages (including Kupffer cells), as well as myoepithelial cells of sweat and salivary glands and of breast, which are all labelled strongly. Also positive, with variable intensity and distribution, are the follicular cells of the thyroid, adrenal cortex, renal distal tubules, and mesangial and endothelial cells of the renal
(103465-001)	M 0725/EFG/CE/18.12.02 p. 1/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2800 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Annexe 5-- Référence de l'anticorps primaire dirigé contre le Ku80 humain utilisé en immunohistochimie

#2753
 Store at -20°C

Ku80 Antibody

100 µl
 (10 western blots)



Orders ■ 877-616-CELL (2355)
 orders@cellsignaling.com
Support ■ 877-678-TECH (8324)
 info@cellsignaling.com
Web ■ www.cellsignaling.com

rev. 03/31/10

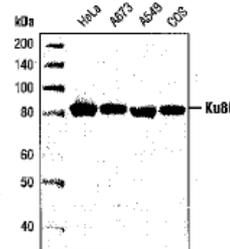
This product is intended for research purposes only. This product is not intended to be used for therapeutic or diagnostic purposes in humans or animals.

Entrez-Gene ID # 7520
Swiss-Prot Acc. # P13010

Applications	Species Cross-Reactivity*	Molecular Wt.	Source
W, IP, IHC-P, IF-IC, F Endogenous	H, Mk, (M, R)	86 kDa	Rabbit**

Background: Ku is a heterodimeric protein composed of two subunits (Ku70 and Ku80) originally identified as autoantigens associated with several autoimmune diseases including scleroderma, polymyositis and systemic lupus erythematosus (1). Ku is an abundant, ubiquitously expressed, nuclear protein that binds to and stabilizes the ends of DNA at telomeres or double-stranded DNA breaks (2,3,4,5). The Ku70/Ku80 heterodimer has ATP-dependent DNA helicase activity and functions as the DNA-binding regulatory component of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (6,7,8). The assembly of DNA-PK complex at DNA ends is required for nonhomologous end-joining (NHEJ), one mechanism involved in double-stranded DNA break repair and V(D)J recombination (8). DNA-PK has been shown to phosphorylate many proteins, including p53, serum response factor, c-Jun, c-Fos, c-Myc, Oct-1, Sp-1 and RNA polymerase II (1,8). The combined activities of Ku70/Ku80 and DNA-PK implicate Ku in many cellular functions, including cell-cycle regulation, DNA replication and repair, telomere maintenance, recombination and transcriptional activation.

Specificity/Sensitivity: Ku80 antibody detects endogenous levels of total Ku80 protein.



Western blot analysis of lysates from HeLa, A673, A549 and COS cells, using Ku80 antibody.

Source/Purification: Polyclonal antibodies are produced by immunizing animals with a synthetic peptide corresponding to the carboxy terminus of human Ku80. Antibodies are purified by protein A and peptide affinity chromatography.

Storage: Supplied in 10 mM sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C. Do not aliquot the antibody.

Recommended Antibody Dilutions:

Western blotting	1:1000
Immunoprecipitation	1:25
Immunohistochemistry (Paraffin)	1:300
Unmasking buffer:	Citrate
Antibody diluent:	TBST-5%NGS
Immunofluorescence (IF-IC)	1:400
Flow Cytometry	1:50

For application specific protocols please see the web page for this product at www.cellsignaling.com.

Please visit www.cellsignaling.com for a complete listing of recommended companion products.

Background References:

- (1) Tuteja, R. and Tuteja, N. (2000) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 1-33.
- (2) Biler, P.R. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7594-601.
- (3) Jin, S. and Weaver, D.T. (1997) *EMBO J.* 16, 6874-85.
- (4) Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1998) *EMBO J.* 17, 1819-28.
- (5) Gravel, S. et al. (1996) *Science* 280, 741-4.
- (6) Cao, Q.P. et al. (1994) *Biochemistry* 33, 8548-57.
- (7) Lees-Miller, S.P. et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 6472-81.
- (8) Collins, S.J. et al. (2005) *Oncogene* 24, 949-61.



DAPI staining (left) and immunofluorescence staining (right) of paraformaldehyde-fixed HeLa cells, using Ku80 Antibody.

IMPORTANT: For western blots, incubate membrane with diluted antibody in 5% w/v nonfat dry milk, 1X TBS, 0.1% Tween-20 at 4°C with gentle shaking, overnight.

Applications Key: W—Western IP—Immunoprecipitation IHC—Immunohistochemistry ChIP—Chromatin Immunoprecipitation IF—Immunofluorescence F—Flow cytometry E-P—ELISA-Peptide
Species Cross-Reactivity Key: H—human M—mouse R—rat Hm—hamster Mk—monkey MI—mink C—chicken Dm—D. melanogaster X—Xenopus Z—zebrafish B—bovine
 Dg—dog Pg—pig Ss—S. cerevisiae Ce—C. elegans Hr—Horse All—all species expected Spikes enclosed in parentheses are predicted to react based on 100% homology.

© 2010 Cell Signaling Technology, Inc.

NOM : CUVELIER

Prénom : Marie

TITRE : CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT DE MEDICAMENT DE THERAPIE INNOVANTE A BASE D'ASCS POUR LA REPARATION DES LESIONS OSSEUSES DE LA FACE CHEZ L'HOMME : COMPARAISON DES ASCS ISOLEES DU CORPS ADIPEUX DE LA BOUCHE ET DU TISSU ADIPEUX SOUS-CUTANE

RESUME: Les lésions des os de la face sont des pathologies fréquentes en médecine humaine, aux conséquences fonctionnelles et esthétiques lourdes pour les patients. Les thérapies cellulaires à base de cellules stromales mésenchymateuses dérivées de tissus adipeux sous-cutané (SC-ASCs) ont montré leur efficacité pour supporter la reconstruction osseuse. Mais le corps adipeux de la bouche, serait aussi une source originale et prometteuse de cellules stromales mésenchymateuses (CAB-ASCs).

Nous présenterons dans une première partie une étude bibliographique exposant les éléments essentiels de la biologie de l'os, des cellules stromales mésenchymateuses et de l'état actuel des thérapies cellulaires appliquées aux os de la face. Dans un deuxième temps, nous présenterons le travail expérimental réalisé, ayant pour objectif de comparer les propriétés de différenciation mésodermique *in vitro* des CAB-ASCs et SC-ASC isolées à partir de tissu adipeux de mêmes donneurs, et capacité à soutenir la reconstruction osseuse *in vivo* dans un modèle de lésion osseuse de taille critique de la calvaria chez la souris, conjointement ou non à un biomatériau composé d'hydroxyapatite et de béta-tricalcium phosphate.

MOTS CLES : Cellules stromales mésenchymateuses, tissu adipeux, corps adipeux de la bouche, lésion osseuse, histologie, histomorphométrie.

TITLE : CONTRIBUTION TO THE DEVELOPMENT OF ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS WITH ASCS FOR THE REPAIR OF FACIAL BONY DEFECTS IN HUMAN: COMPARISON OF ASCS DERIVED FROM BUCCAL FAT PAD AND SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE.

ABSTRACT: Facial bone defects are common in human pathology, and involve both functional and aesthetic issues for patients. The efficiency of cell therapies for bone repair using mesenchymal stromal cells derived from subcutaneous adipose tissue (SC-ASCs) is now well recognized. But the buccal fat pad, which is routinely used in odontologic surgeries, could also be an original and promising source of ASCs (CAB-ASCs).

We will expose in a first part a bibliographic study of basic and essential notions about bone biology, mesenchymal stromal cells and current advances in cell therapies for facial bone repair using these cells. Then, we will present an experimental study which aimed to compare the ability of CAB-ASCs and SC-ASCs from same donors to differentiate *in vitro* in mesodermal lineages, and to support bone repair *in vivo* in a model of calvarial critical size defect in mice, with or without a biomaterial composed of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate.

KEY WORDS: Mesenchymal stromal cells, adipose tissue, buccal fat pad, bone defect, histology, histomorphometry.