
Cellules Souches Mésoenchymateuses et ostéoreconstruction

F. DESCHASEAUX, Z. SELMANI, P. GARBUIO, L. OBERT.

UMR INSERM U645, Université de Franche-Comté, Besançon.
Département Chirurgie Orthopédie, C.H.U. J. Minjoz, Besançon

Correspondance :

E-Mail : fdeschaseaux@chu-besancon.fr

Résumé

Les cellules souches (CS) et progéniteurs adultes sont des cellules aux potentiels prolifératifs et différenciatifs importants. Ce sont donc des cellules professionnelles de la régénération tissulaire. La moelle osseuse chez un homme adulte comporte plusieurs types de cellules souches et progéniteurs : les CS hématopoïétiques et non-hématopoïétiques dont font partie les cellules souches mésoenchymateuses (CSM). Ces CSM génèrent *in vivo* toutes les cellules du squelette. Elles sont sélectionnées *in vitro* via un processus d'adhérence et d'expansion. Ainsi, à partir de 1ml de MO, on peut obtenir plusieurs millions de cellules.

Les CSM cultivées ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui leur sont propres et donc nécessaire à leur caractérisation. Leur potentiel régénératif a été montré pour l'os, le cartilage et le stroma de support à l'hématopoïèse et plusieurs études cliniques ont été rapportées. Certaines avaient pour but d'utiliser ces potentiels pour améliorer le tableau clinique d'enfants atteints d'osteogenes imperfecta, d'autres pour combler des défauts osseux importants, pour la reconstitution du cartilage du genou, mais aussi pour régénérer les zones infarciées du cœur. Par ailleurs, nous savons aujourd'hui que ces CSM sont également capables d'inhiber la réponse immunitaire contre le rejet et d'intenses investigations sont encore en cours pour en évaluer l'efficacité et les mécanismes *in vivo*.

Toutes ces potentialités font des CSM syngéniques ou allogéniques un outil incontournable pour la régénération de tissus lésés ou malades et leur pouvoir immunomodulateur permet aussi d'étendre leur utilisation comme médicament immunosuppresseur de rejet d'organes allogreffés.

Mots clés : Cellules souches adultes / moelle osseuse / médecine régénérative / lésions osseuses / transplantation.

Les cellules souches mésoenchymateuses (CSMs) sont des cellules souches adultes qui sont à l'origine des cellules des lignages ostéoblastiques, chondroblastiques, adipocytaires, stromales et ténoblastiques. Des études ont montré qu'elles pouvaient générer des myoblastes et des neurones mais cela reste encore sujet à discussion [1].

Les CSMs sont situées dans la moelle osseuse mais on en trouve aussi dans le tissu adipeux. La méthode de référence d'enrichissement des CSMs est une méthode indirecte faisant intervenir à la fois l'adhérence des CSMs aux plastiques et la culture cellulaire. Après séparation

Abstract

Mesenchymal stem cells and osteoregeneration.

Adult stem and progenitor cells have strong proliferation and differentiation potentials allowing them to regenerate damaged tissues. In the human adult bone marrow, two types of stem and progenitor cells can be found: hematopoietic stem cells and non-hematopoietic stem cells such as mesenchymal stem cells (MSCs). These MSCs are the origin of all connective tissue cells. Therefore, they have the ability to regenerate cartilage, bone, muscle, tendon, ligament and fat. They are isolated *in vitro* by using their adhesion capacities on plastic of the culture flasks and by their strong proliferation potentials. Using this protocol, it is possible to obtain several million cells from 1ml of bone marrow.

Cultured MSCs were used in clinical studies for assessing their osteo-chondrogenic potentials. They were injected to improve the *osteogenesis imperfecta* disease, to fill bone defects or to regenerate cartilage. Several reports have also shown a potential to regenerate or to preserve vascular cells and cardiomyocytes after ischemia. Besides, MSCs are able to immunosuppress the allogenic T lymphocyte responses *in vitro* as well as *in vivo*.

In conclusion, MSCs are stem cells easy to obtain and to expand with strong regeneration potentials in allogenic and syngenic settings.

Key words: Adult stem cells / bone marrow / regenerative medicine / bone injury / transplantation.

par gradient de densité, les cellules mononucléées de moelle osseuse sont cultivées dans un milieu spécifique. Au bout de 2 semaines, il y a formation de colonies de type fibroblastique ou CFU-f. Ces CFU-fs sont ensuite amplifiées dans le même milieu pendant au moins 3 autres semaines. C'est de cet « amplifia » que sont prélevées les cellules utilisées pour leur potentiel différenciatif [2, 3]. Cependant, ce processus *ex-vivo* fait que les CSMs natives ne sont pas connues, contrairement aux CSMs cultivées.

Pour connaître les CSMs natives il faut utiliser des méthodes d'enrichissement directes via des marqueurs spécifiques de ces cellules souches. Il y a au moins 3 marqueurs connus utilisés par ce type de méthode :

- la molécule CD49a (sous unité alpha-1 de l'intégrine VLA-1) [4, 5]

- l'antigène reconnu par l'anticorps (Ac) Stro-1 [6, 7]
- le récepteur du Nerve Growth Factor (NGF-R) [8].

Après incubation avec les Ac, les cellules exprimant ces molécules vont pouvoir être retenues grâce à des Ac secondaires anti-primaires conjugués à des billes contenant du fer et grâce à un aimant. Toutes les CSMs natives sont ainsi comprises dans une petite fraction cellulaire qui, lorsqu'on les cultive, génèrent des CFU-fs puis les différents lignages mésenchymateux. Aujourd'hui ces méthodes directes ne servent qu'à la recherche notamment pour caractériser les cellules natives. Au laboratoire, nous utilisons à la fois la méthode indirecte et la méthode directe via le NGF-R et via le CD49a, dont nous sommes les premiers à l'avoir décrite [4, 5].

La méthode directe est plus difficile à mettre en place que la méthode indirecte puisqu'il faut produire les Ac à usage clinique mais elle permettrait d'obtenir d'emblée dans un petit volume un greffon riche en CSMs qui pourrait être injecté in situ ou en intraveineuse.

Comme la méthode indirecte est relativement bien maîtrisée et comme la population est pure, beaucoup de données phénotypiques des CSM cultivées ont été obtenues. Nous savons que les CSMs cultivées n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, CD14), ni le CMH de type II. Par contre, elles expriment d'autres molécules qui servent à leur identification. De plus, il est à noter qu'elles n'expriment pas les molécules de co-stimulation importantes pour la réponse immunitaire [3]. Elles expriment aussi un certain nombre de cytokines importantes pour la régénération tissulaire comme l'IL-6, LIF, SCF et VEGF [9]. D'autres molécules comme celles de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, collagène, ...) et du cytosquelette (vimentine) peuvent être utilisées pour caractériser les CSMs cultivées.

Ce phénotype est bien sûr différent de celui des cellules natives puisque nous avons publié récemment que les CSMs natives étaient CD45+, CD34+ et CD133+ (marqueur de cellules souches) [3].

La preuve principale du caractère CSM est la multipotentialité, que ce soit in vivo ou in vitro : les CSMs doivent donner des ostéoblastes, des chondroblastes et des adipocytes [10].

Dans la littérature, il a été décrit que des cellules de type CSMs ou MAPC (Multipotential Adult Progenitor cells),

qui ont été cultivées dans des conditions plus strictes que celles utilisées dans la méthode de référence (donc plus difficiles à mettre en place au laboratoire), étaient capables de pluripotence, puisque les cellules issues des 3 feuilletts primordiaux ont été générées. On ne connaît pas encore la relation entre les CSMs et les MAPC ou si l'on est face à un artefact de la culture cellulaire [11].

Les CSMs cultivées ont une autre propriété remarquable : elles sont immuno-suppressives. In vitro, elles sont capables 1) d'inhiber la réponse de type lymphocyte Th1 face à l'alloantigène, 2) de favoriser la production de lymphocytes T régulateurs et 3) d'inhiber les cellules NK. Ces données semblent être soutenues par les études in vivo où les CSMs n'étaient pas rejetées par l'hôte, voire génèrent une certaine tolérance [12]. Ce potentiel est fortement attractif pour la transplantation.

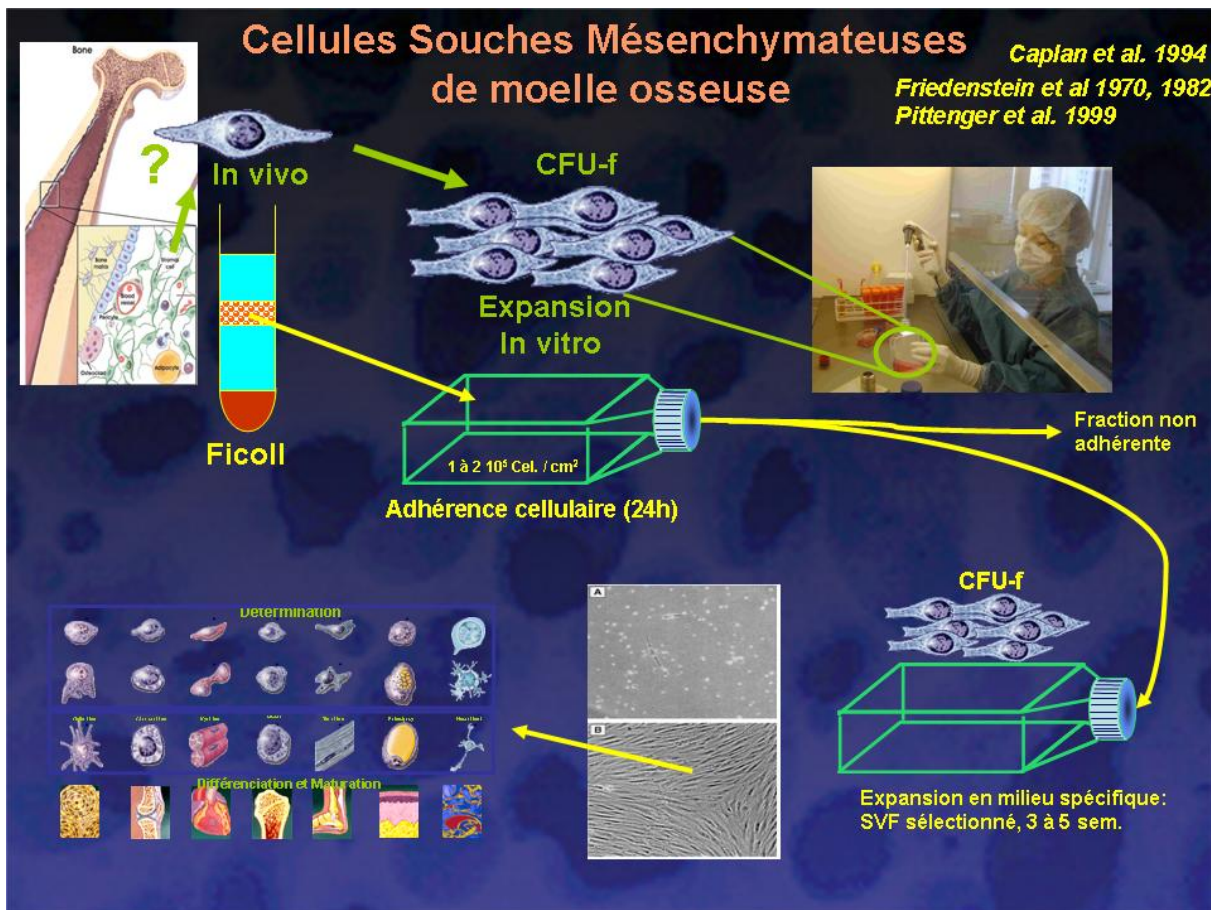
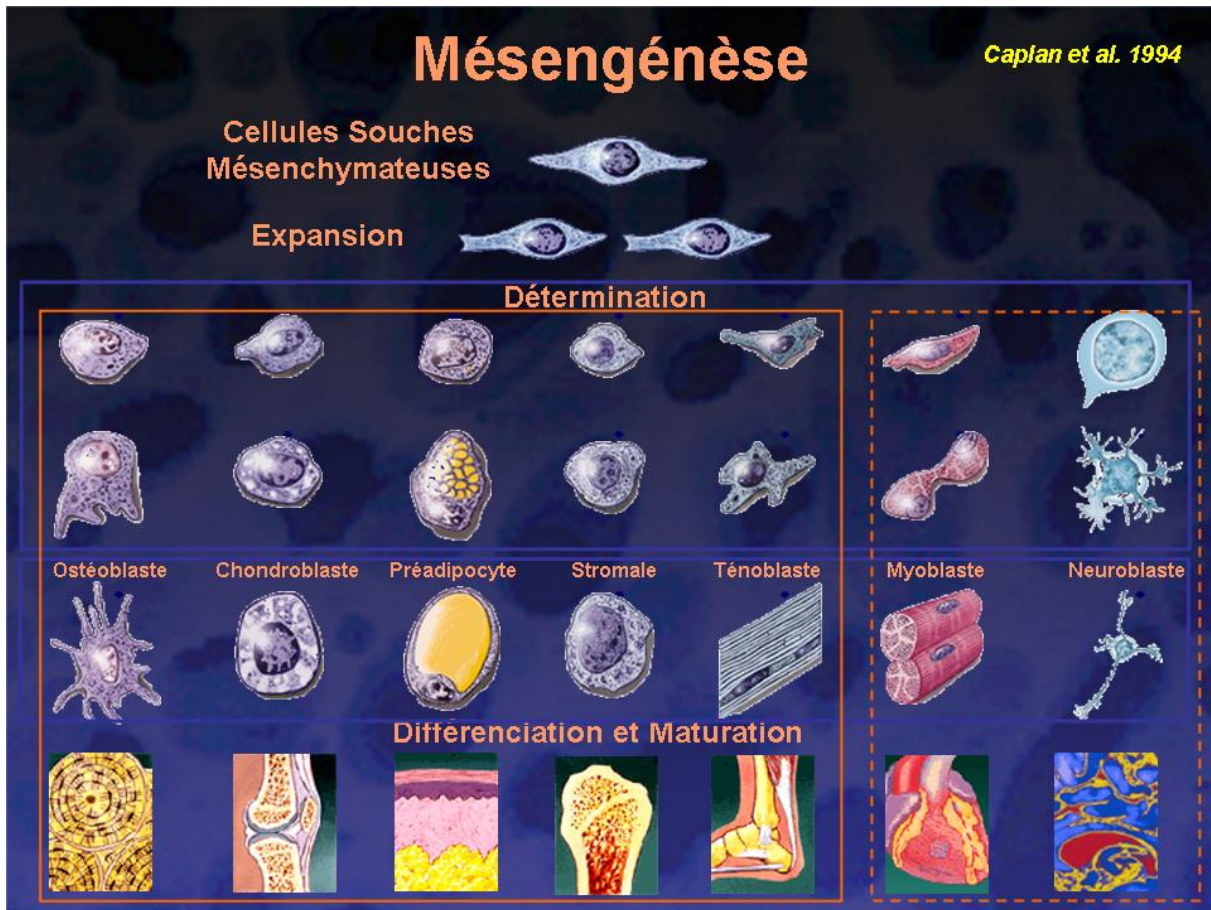
Une des applications première des CSMs est la reconstruction osseuse. Les données recueillies des études portant sur les différentes étapes de l'ostéoreconstruction après fracture montrent l'importance de certaines cytokines et leur séquence d'action. L'importance des cytokines pro-inflammatoires, des molécules de la famille des TGF β et des cytokines angiogéniques a ainsi été démontrée [13]. C'est à partir de ces données qu'ont été développés des protocoles in vitro pour engager les CSMs dans une voie de différenciation ou dans une autre.

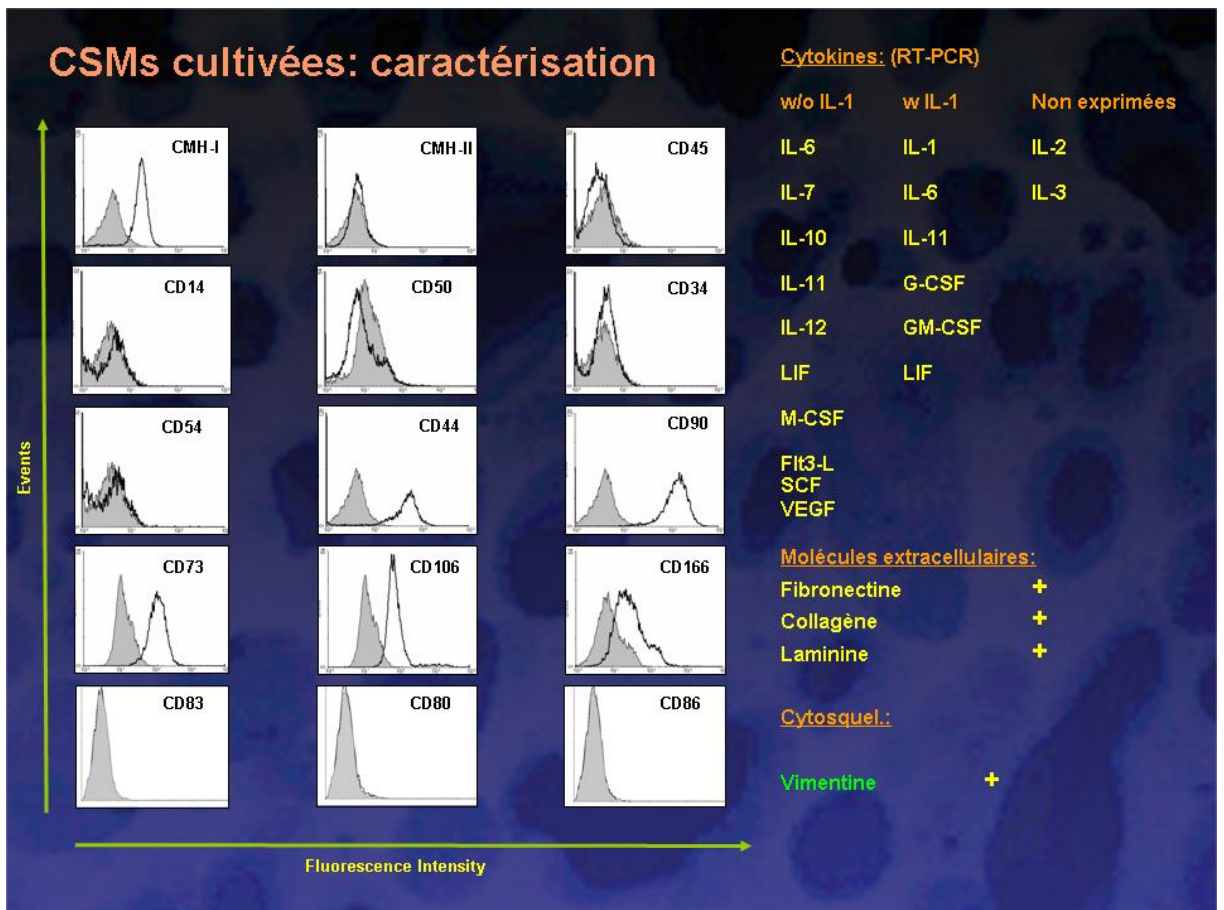
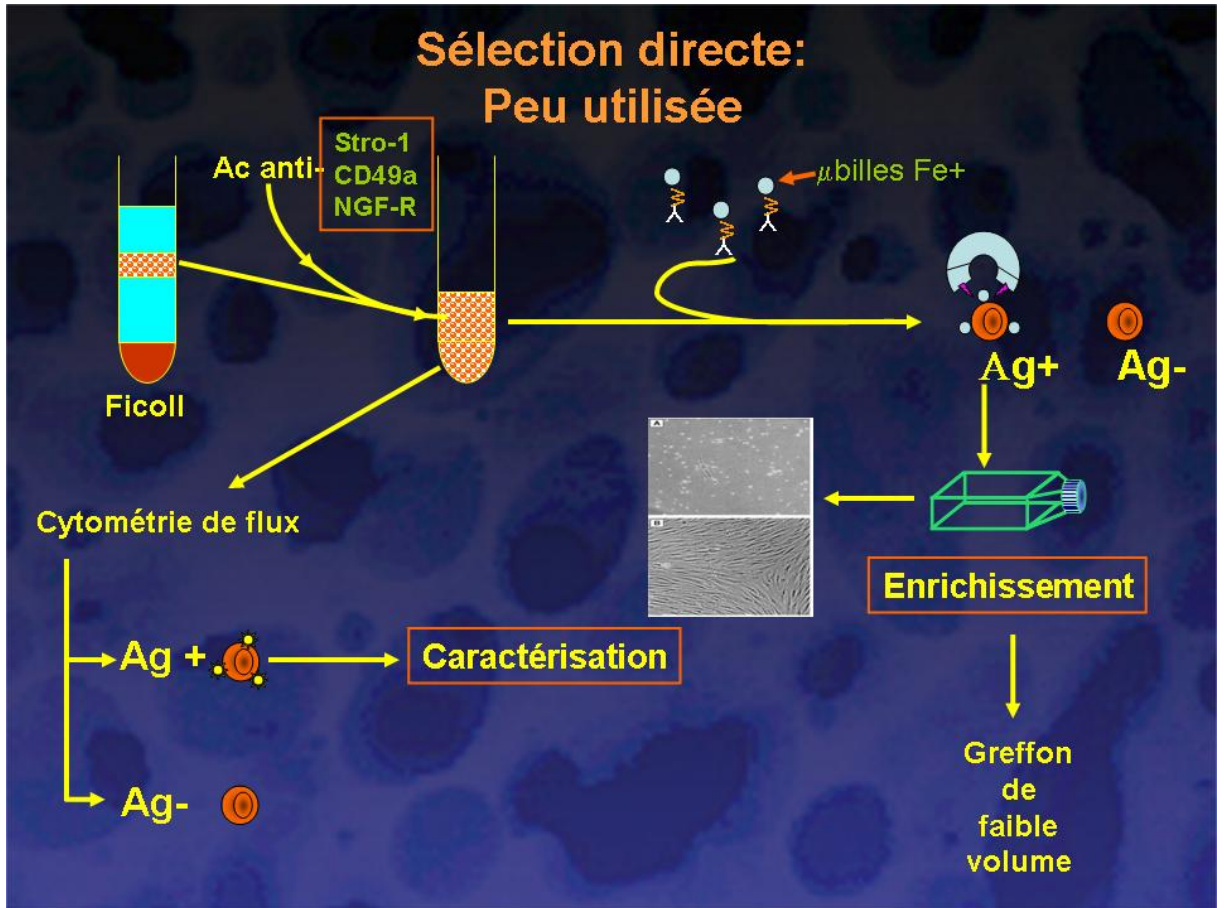
Mais les cytokines ne suffisent pas. Il faut des supports ostéoconducteurs comme l'hydroxy-apatite, le triphosphate, le corail, ... [14] D'après les études faites chez l'animal, l'ostéorégénération la plus efficace est obtenue quand les 3 facteurs CSMs, bio-matériels et ostéoinducteurs (BMP-7, BMP-2) sont présents [15]. Mais cela reste à démontrer chez l'humain.

Les applications sont multiples et envisageables notamment grâce à leur facilité d'obtention, leur potentiel régénérateur important et leur faculté immuno-régulatrice. Dans les domaines de l'ostéoreconstruction, les CSMs cultivées peuvent être ajoutées à des bio-matériaux pour reconstruire articulations, pertes de substances, pour l'allongement ou pour la chirurgie maxillo-faciale. Mais elles peuvent aussi être utilisées dans des cas de maladies génétiques comme l'ostéogénèse imparfaite. En dehors de l'ostéoreconstruction, les CSMs cultivées sont utilisées pour la régénération du tissu cardio-vasculaire [16-19].

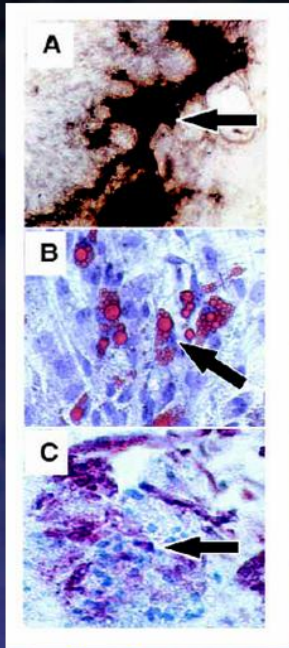
Références

1. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994; 21 :429-35.
2. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3: 393-403.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-7.
4. Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype. *Br J Haematol* 2003; 122: 506-17.
5. Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol.* 2000; 184: 319-25.
6. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1992; 80: 388-95.
7. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.* 1991; 78: 2848-53.
8. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 2002; 30: 783-91.
9. Sensebe L, Deschaseaux M, Li J, Herve P, Charbord P. The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment. *Stem Cells.* 1997; 15: 133-43.
10. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1827-35.
11. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418: 41-9.
12. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
13. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005; 36: 1392-404
14. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80: 985-96.
15. Arnaud E, De Pollak C, Meunier A, Sedel L, Damien C, Petite H. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. *Biomaterials.* 1999; 20: 1909-18.
16. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 8932-7.
17. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone.* 2004; 35: 892-8.
18. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001; 344: 385-6
19. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006; 26: 363-9.

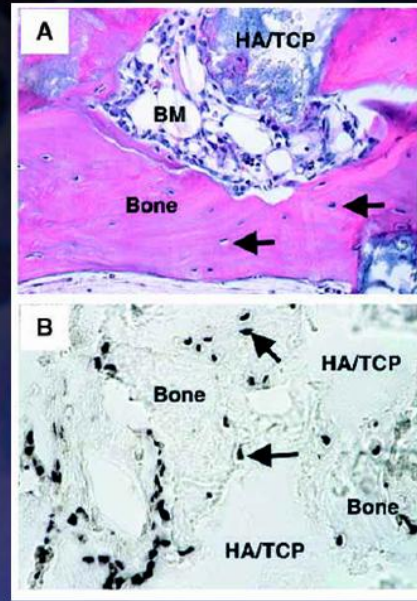
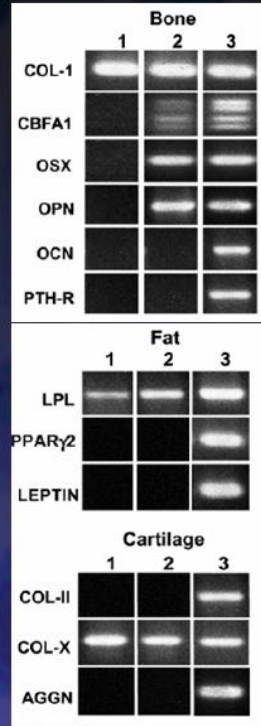




CSMs cultivées: caractérisation



- in vitro**
- von Kossa
 - Oil red O
 - Collagène II

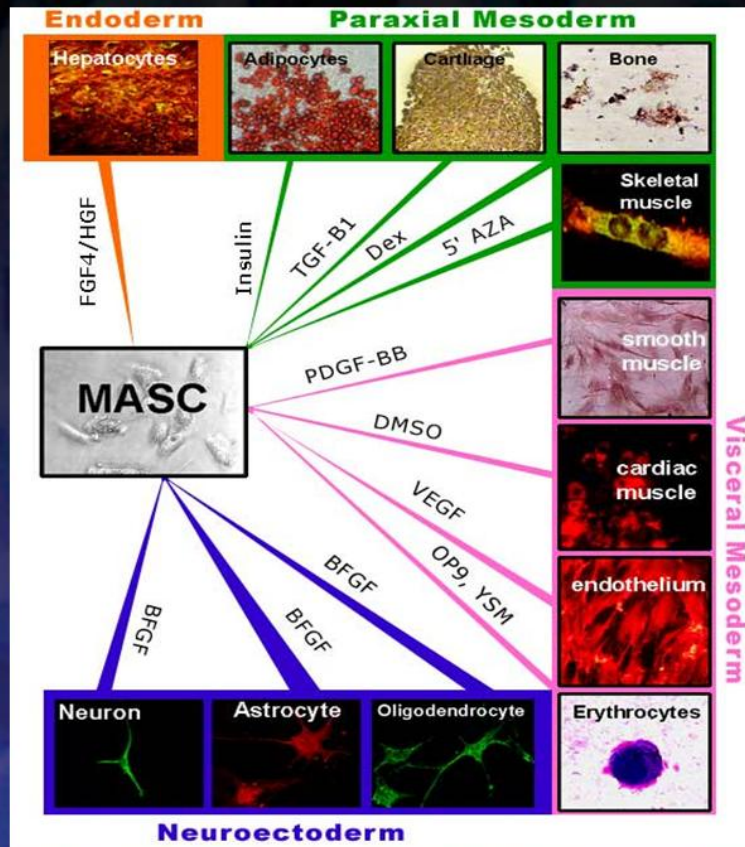


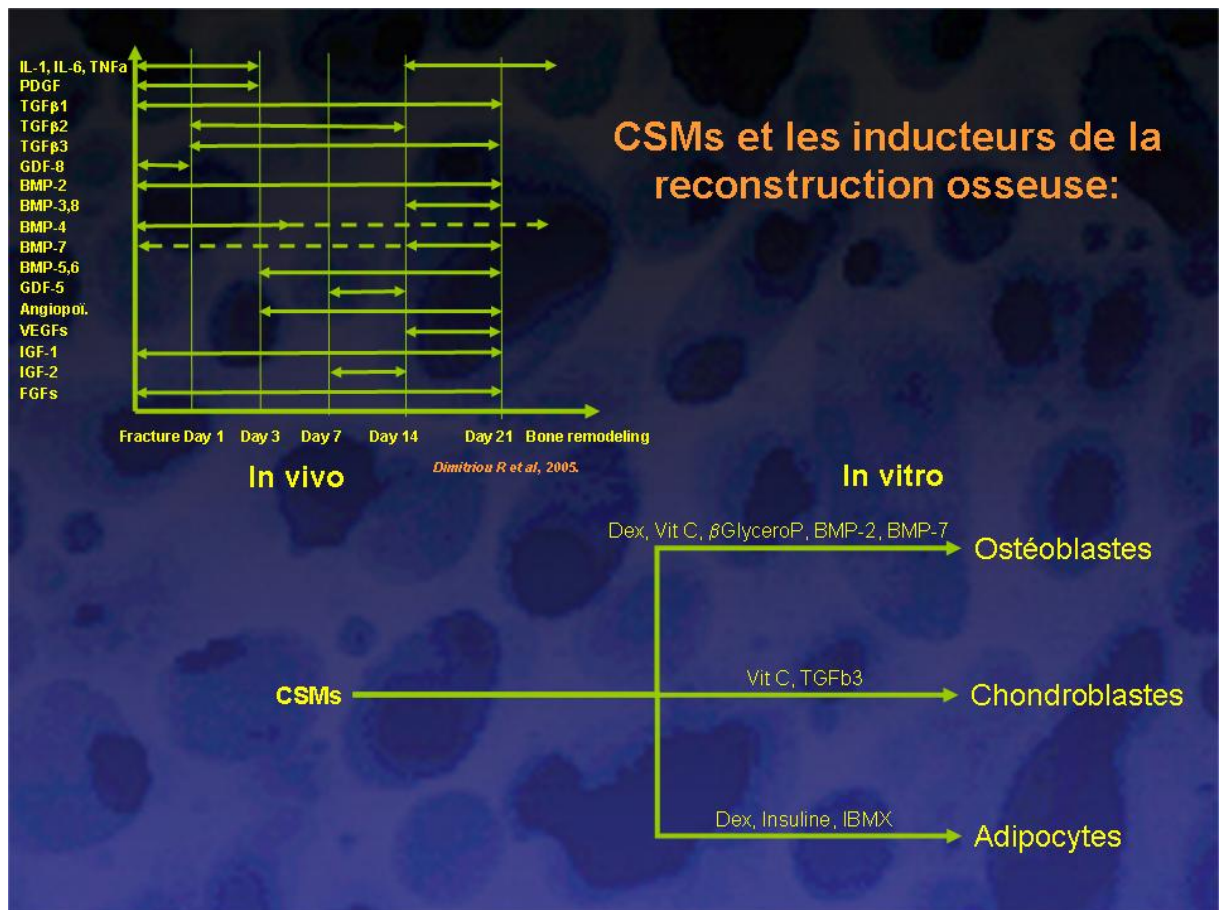
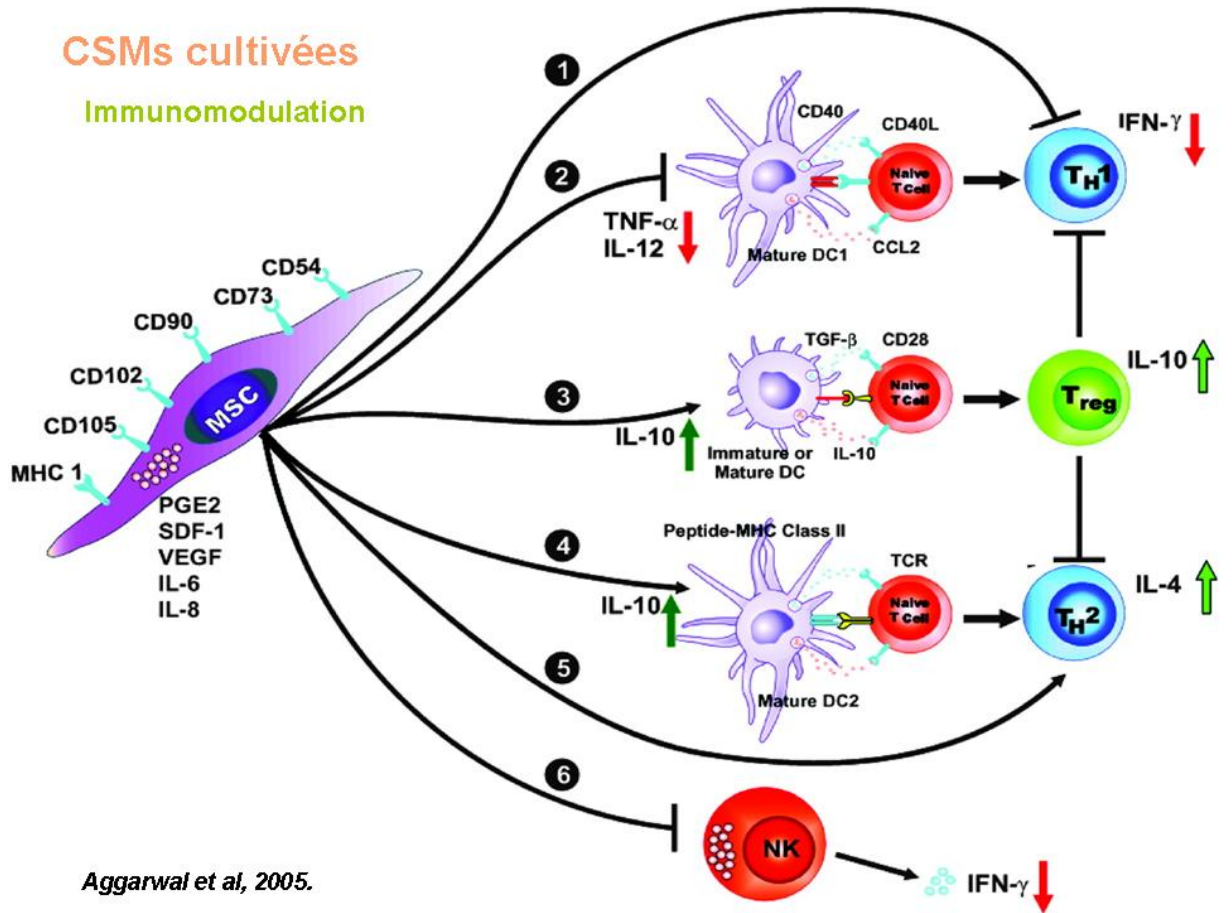
- in vivo**
- support + hMSC
 - souris SCID

Gronthos S et al, 2003

Multipotent Adult Progenitor Cells (MASC o MAPC)

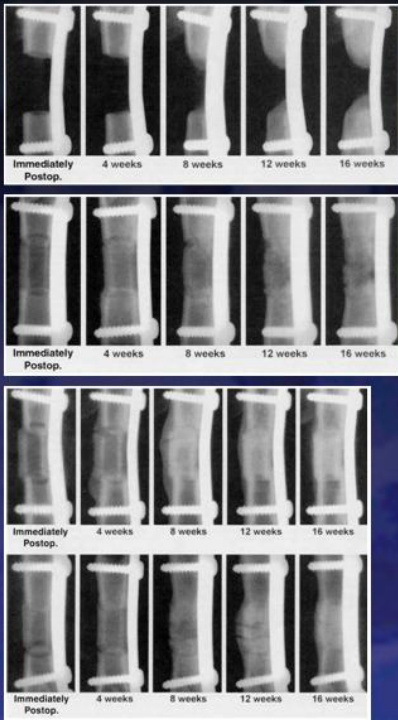
Jiang et al, Nature 2002



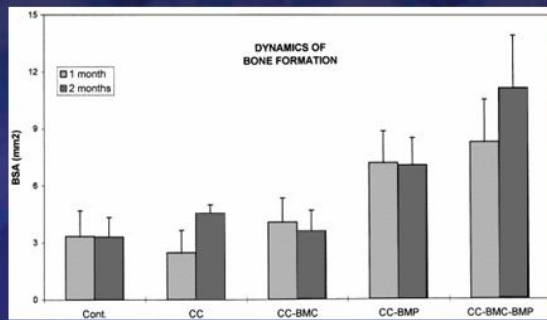
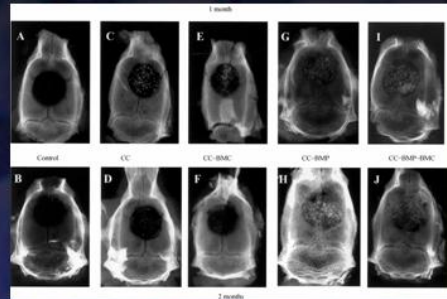


CSMs et ostéoconduction

CSMs + Biomatériel:HA/ β TCP



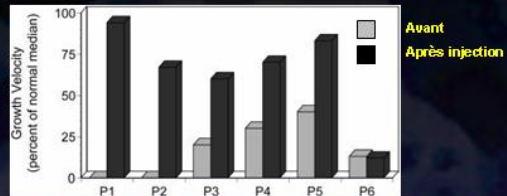
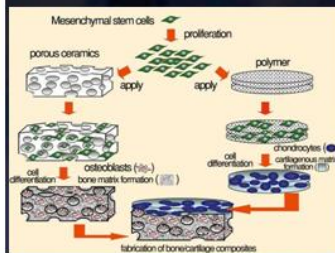
CSMs+biomatériel+BMP



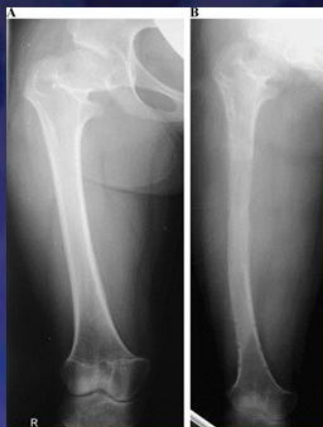
Bruder SP et al, 1998

Amaud E et al, 1999

Les applications



*MSCs chez patients osteogenesis I.: Effet sur la croissance. Mais réponse immune contre transgène NéoR et les protéines du sérum. Corrélation inverse entre temps de culture et activité transplantatoire. (Horwitz 2002).



Kitoh H, 2004



Quarto et al, NEJM (2001).



Hibi H, 2006

