

# UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

---

**THÈSE**  
**pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR**  
**Sciences de la Vie et de la Santé**  
**Ecole Doctorale : GC2ID**  
**Discipline : biologie cellulaire.**

présentée et soutenue publiquement  
par François Ferré  
le 19 Décembre 2013

---

**Sujet : Isolation et caractérisation des cellules souches  
gingivales. Étude de leur potentiel multipotent.**

---

Jury :

Professeur Louis Maman	Président
Professeur Bruno Gogly	Directeur de thèse
Docteur Benjamin Fournier	Co-directeur de thèse
Professeur Jean-Christophe Fricain	Rapporteur
Professeur Jean-Louis Lejonc	Rapporteur
Professeur José Cohen	Examineur
Professeur Ariane Berdal	Examineur



## REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Louis Maman**

Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris Descartes,  
Doyen de la faculté de chirurgie-dentaire de Montrouge  
D'avoir accepté de présider ce jury.

**A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Fricain**

Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Université Bordeaux Segalen,  
D'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

**A Monsieur le Professeur Jean-Louis Lejonec**

Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris Est Créteil  
Responsable du pôle MINNGUS, GHU Henri Mondor.  
D'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

**A Monsieur le Professeur José Cohen**

Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris Est Créteil  
Responsable du centre d'investigation clinique BT504-Henri Mondor.  
D'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur.

**A Madame le Professeur Ariane Berdal,**

Professeure des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris Diderot,  
Directrice du laboratoire INSERM UMR872 .  
De m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et d'avoir accepté de participer à ce jury  
en tant qu'examinateur.

**A Monsieur le Professeur Bruno Gogly,**

Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris Descartes,  
Chef du service d'odontologie du GHU Henri Mondor.  
D'avoir dirigé ma thèse d'université. Veuillez recevoir toute ma gratitude

**A Monsieur Benjamin Fournier,**

Maître de conférences des Universités -Praticien Hospitalier, Université Paris  
Diderot.  
Grand frère de recherche. Merci de m'avoir soutenu pendant ces années de travail.

**A Monsieur le Professeur Hannu Larjava,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Colombie  
Britannique, Vancouver, Canada,  
Directeur du laboratoire de parodontologie, UBC.  
De m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Cette expérience m'a beaucoup apporté.

A la **fondation des « Gueules Cassées »**,

et plus particulièrement au **Docteur Marie-Andrée Roze-Pellat**

De m'avoir accompagné et soutenu financièrement pour la réalisation de cette thèse.

A mes camarades de laboratoire.

De m'avoir supporté pendant toutes ces années.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	3
<b>SOMMAIRE</b> .....	5
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	8
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	10
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	11
<b>II. SITUATION DU SUJET</b> .....	12
I.1. Le fibroblaste .....	12
I.1.1. Définition .....	12
I.1.2. Fonctions du fibroblaste .....	12
I.1.3. Dysfonctions du fibroblaste .....	16
I.1.4. Hétérogénéité fibroblastique .....	16
I.1.5. La gencive, un tissu aux propriétés de cicatrisation exceptionnelles .....	18
I.1.6. Le fibroblaste gingival .....	24
I.2. Les cellules souches .....	27
I.2.1. Définition .....	27
I.2.2. Critères de différenciation.....	28
I.2.3. Les cellules souches embryonnaires .....	29
I.2.4. Les cellules souches induites .....	30
I.2.3. Les cellules souches adultes.....	32
I.2.3. Cellules souches dérivées des crêtes neurales.....	40
I.3. Objectifs de la thèse .....	44
<b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	48
II.1. Culture cellulaire .....	48
II.1.1. Culture primaire.....	48
II.1.2. Culture secondaire .....	48
II.1.3. Génération des cellules souches gingivales (CSG).....	49
II.1.4. Protocole d'adhésion.....	49

II.1.5. Protocole de prolifération .....	49
II.2. Protocoles de différenciation cellulaires .....	49
II.2.1. Différenciation adipocytaire .....	50
II.2.2. Différenciation ostéocytaire.....	50
II.2.3. Différenciation chondro/endochondrale .....	50
II.2.4. Cultures en neurosphères .....	51
II.3. Analyses protéiques .....	51
II.3.1. Zymogrammes .....	51
II.3.2. Western blot.....	54
II.3.3. Analyses par cytométrie en flux .....	55
II.4. Analyse des ARNm .....	55
II.4.1. Extraction des ARNm.....	56
II.4.2. Quantification des ARNm .....	56
II.4.3. Retro-transcription .....	57
II.4.4. PCR quantitative .....	57
II.4.5. Préparation des amorces .....	58
II.4.6. PCR.....	61
II.4.7. Efficacité des primers .....	62
II.5.4. Spécificité des primers.....	62
II.4.9. Analyse des résultats.....	63
II.5. Transfection des micromasses par ARN interférant .....	64
II.6. Expériences <i>in vivo</i> .....	64
II.7. Analyses histologiques .....	65
II.7.1. Méthodes de fixation .....	65
II.7.2. Colorations classiques.....	66
II.7.3 Immunohistochimie .....	69
II.7.4. Histologie par microscopie électronique à balayage.....	71
III. RÉSULTATS .....	72
III.1. Génération de colonies fibroblastique (CFU-F) .....	72
III.2. Prolifération, adhésion des CSG.....	72
III.3. Caractérisation membranaire par cytométrie de flux des CSG .....	74
III.4. Caractérisation crête neurale des GSC .....	76

III.4. Sécrétion de MMPs .....	76
III.5. Multipotence.....	78
III.5.1. Différenciation adipocytaire .....	78
III.5.2. Différenciation ostéogénique.....	80
III.5.3. Différenciation chondro/endochondrale.....	85
III.6. Utilisation du fibroblaste gingival comme outil de diagnostic moléculaire .....	96
IV. DISCUSSION .....	99
RÉFÉRENCES.....	105
ANNEXES .....	113

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Phénotype du fibroblaste gingival.....	14
Figure 2. Vue macroscopique et schéma en coupe transversale de l'organe dentaire et de la gencive.....	19
Figure 3. Coupe histologique de gencive.....	21
Figure 4. Comparaison clinique et histologique de la cicatrisation gingivale palatine et cutanée chez le porc .....	23
Figure 5. Les lignées hématopoïétiques à l'âge adulte.....	33
Figure 6. Organisation des niches pour les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques.....	35
Figure 7. Interactions entre les CSM et les cellules immunitaires .....	38
Figure 8. Devenir des crêtes neurales.....	41
Figure 9. Structures dérivées des crêtes neurales chez la souris .....	42
Figure 10. Cellules souches adultes dérivées des crêtes neurales céphaliques décrites à ce jour.....	43
Figure 11. Ossification par la voie endochondrale.....	46
Figure 12. Génération de CFU-F à partir de fibroblastes gingivaux .....	73
Figure 13. Prolifération et adhésion des FG et CSG.....	74
Figure 14. Caractérisation des marqueurs membranaires des CSG par cytométrie de flux.....	75
Figure 15. Caractérisation de l'origine crête.....	77
Figure 16. Zymogrammes de milieux de culture comparant les sécrétions de FG et CSG en culture simple ou en gel de collagène .....	78
Figure 17. Différenciation adipocytaire des CSG .....	79
Figure 18. Différenciation ostéocytaire des CSG en culture deux dimensions. (A) Les cellules différenciées produisent des nodules calcifiés qui prennent la coloration ARS (grossissement x50). (B) Gros plan de nodule (grossissement x200) .....	81
Figure 19. Coloration à l'ARS des différenciations ostéocytaires .....	82
Figure 20. Étude de l'expression génique durant la différenciation osseuse de type intramembranaire.....	83
Figure 21. Étude <i>in vivo</i> du comportement des FG, des CSG et des CSM .....	84
Figure 22. Photographies des CSG induites pour une différenciation en chondrocytes.....	85
Figure 23. Différenciation chondrocytaire des CSG.....	87
Figure 24. Analyse du réseau de collagène au jour 21 après induction de la différenciation chondrocytaire.....	88
Figure 25. Étude de la synthèse des ARNm spécifiques de la voie de différenciation endochondrale par qPCR.....	89

<b>Figure 26. Histologie des sphères au jour 35 après différenciation chondrocytaire.</b>	<b>91</b>
<b>Figure 27. Analyse du réseau de collagène au jour 35 après différenciation chondrocytaire.....</b>	<b>92</b>
<b>Figure 28. Différenciation en synoviocytes de type fibroblastique des CSG au jour 21 .....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 29. Immunohistologie de l'ASMA .....</b>	<b>95</b>
<b>Figure 30. Rôle de SOX9 dans la régulation de la morphogénèse des micromasses cartilagineuses .....</b>	<b>97</b>
<b>Figure 31. Analyses histologique et moléculaire de patients atteints de la maladie d'Ehlers-Danlos de type vasculaire .....</b>	<b>98</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ALPL** : phosphatase alcaline  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARS**: coloration alizarine red s  
**ASMA**:  $\alpha$ -smooth muscle actin  
**CDH**: cadhérine  
**CFU-F**: colony-forming unit fibroblast  
**CN**: crête neurale  
**CNC**: crête neurale céphalique  
**CSE**: cellule souche embryonnaire  
**CSG** : cellule souche gingivale  
**CSH**: cellule souche hématopoïétique  
**CSM**: cellule souche mésenchymateuse  
**CSMMO** : cellule souche mésenchymateuse de moelle osseuse  
**DMEM**: Dulbecco's modification of Eagle's medium  
**FG**: fibroblaste gingival  
**FGF**: fibroblast growth factor  
**GAG**: glycosaminoglycanes  
**IDO**: l'indoléamine 2,3-dioxygénase  
**IFN** : interféron  
**IHH** : indian hedgehog  
**IL**: interleukine  
**IPS**: induced pluripotent stem cells  
**KGF**: keratinocyte growth factor  
**LIF**: leukemia inhibitory factor  
**MEB**: microscope électronique à balayage  
**MEC**: matrice extra cellulaire  
**MEH** : micro environnement hématopoïétique  
**MMP**: métalloprotéinase matricielle  
**NK** : natural killer  
**OSX**: osterix  
**PCR**: polymerase chain reaction  
**PDGFR**: platelet-derived growth factor receptor  
**RUNX** : runt-related transcription factor  
**SOX**: SRY (sex determining region Y)-box  
**SVF**: serum de veau foetal  
**TGF- $\beta$** : transforming growth factor- $\beta$   
**TNF** : tumor necrosis factor  
**VEGF**: vascular endothelial growth factor

## INTRODUCTION

L'évolution des connaissances sur le fonctionnement cellulaire n'a cessé d'apporter un renouveau dans le domaine de la biologie cellulaire. La découverte de l'ADN et des mécanismes de transcription et de traduction de l'information génétique en protéines par l'intermédiaire de messagers a notamment permis l'avènement de la biologie moléculaire. Cependant, la notion selon laquelle les cellules d'un individu partagent le même patrimoine génétique et se distinguent les unes des autres non pas par ce patrimoine mais par l'expression sélective de certains gènes selon une dynamique finement régulée, témoigne de la nécessité d'une approche transversale des questions soulevées par les mécanismes cellulaires. En effet, les mécanismes de régulation de ces gènes font intervenir de nombreux intermédiaires qui relèvent de la signalisation interne à la cellule mais qui sont orientés par son environnement. Ainsi, de multiples niveaux de régulation agissent sur la cellule, guidant sa spécification et l'expression de ses fonctions.

La découverte de cellules souches à l'âge l'adulte (reprogrammées ou non) capables d'être réorientées vers un état indifférencié a modifié la façon d'appréhender les tissus adultes. Ainsi, ces cellules ont fait la preuve, à maturité, d'une plasticité insoupçonnée jusqu'alors, permettant de concevoir des cellules non pas figées, mais étant capable de réorienter leurs phénotypes, leurs fonctions, leurs activités, non seulement en fonction des conditions de leur environnement mais également selon leur potentiel intrinsèque.

C'est dans cette optique que nous avons envisagé l'étude du fibroblaste gingival, cellule majoritaire du tissu conjonctif gingival. En effet, la gencive se présente comme un modèle de régénération tissulaire à l'âge adulte. Le rôle du fibroblaste gingival dans cette régénération est central puisqu'il régule la réponse inflammatoire et guide les processus de cicatrisation. Envisager cette cellule sous l'aspect « souche » permettrait d'enrichir la compréhension des fonctionnements physiologiques de ce tissu particulier et par la suite, d'envisager l'utilisation de ces cellules à des fins thérapeutiques.

## I. SITUATION DU SUJET

### I.1. Le fibroblaste

#### I.1.1. Définition

Le fibroblaste est une cellule mésenchymateuse ubiquitaire impliquée dans de nombreuses fonctions vitales dont l'embryogénèse et le développement, l'homéostasie et la réparation tissulaire. Cellule mononuclée, non polarisée et isolée au sein d'une trame de collagène et de glycoprotéines matricielles qu'elle participe à synthétiser, le fibroblaste se présente globalement sous forme allongée selon le grand axe de la cellule (1-3). Cellule non inflammatoire, non vasculaire, non épithéliale, elle est la cellule majoritaire des tissus conjonctifs mous. Cette définition résulte de l'acquisition progressive des connaissances concernant cette cellule. Les premières descriptions du fibroblaste ont été réalisées par Schwann en 1847 puis par Virchow et Duvall à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (3). Au XX<sup>ème</sup> siècle, les premières mises en culture de biopsies ont permis d'obtenir des lignées fibroblastiques améliorant la compréhension des fonctions de cette cellule. Cependant, définir une cellule reste un exercice délicat tant ses caractéristiques structurales et fonctionnelles sont soumises aux conditions environnementales, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi faut-il privilégier une description rendant compte des dynamiques cellulaires plutôt qu'une définition statique qui serait forcément incomplète et aléatoire.

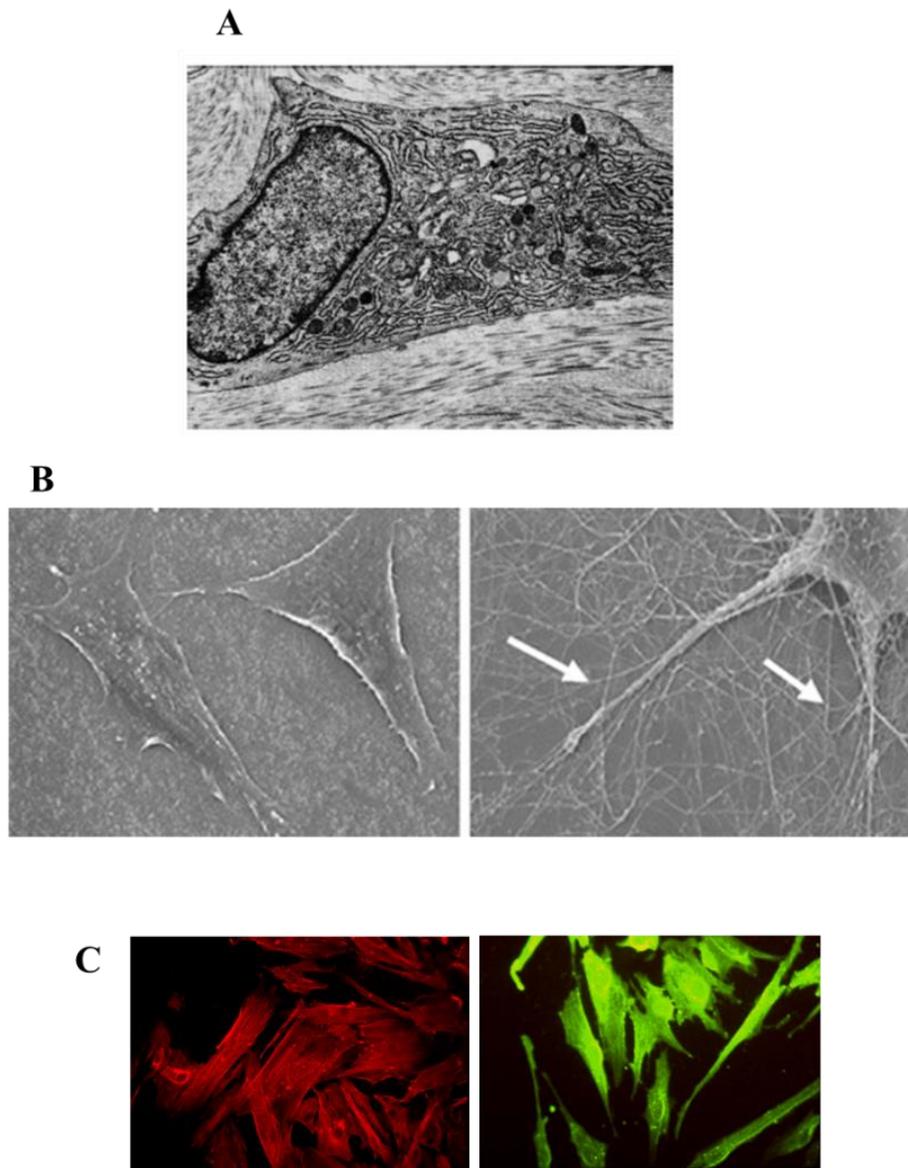
#### I.1.2. Fonctions du fibroblaste

- Assurer l'homéostasie tissulaire

*In vivo*, le fibroblaste gingival (FG) établit peu de contacts avec ses congénères. Il est fusiforme suivant l'axe de la trame collagénique l'entourant et forme des projections vers les composantes de la matrice extra cellulaire (MEC). Il est constitué d'un

volumineux noyau, d'un réticulum endoplasmique et d'un appareil de Golgi bien développé ainsi que de nombreuses mitochondries, vacuoles et vésicules témoignant d'une activité métabolique intense (4) (Figure 1A). *In vitro*, contrairement à sa situation *in situ*, le FG va rechercher les contacts intercellulaires. A faible densité, il va avoir un phénotype élargi et projeter des prolongements autour de lui, mais lorsqu'il est à forte densité, il est fusiforme et noue de nombreux contacts entre cellules par l'intermédiaire de gap junctions et de *junction adherens* (par l'intermédiaire de cadhérines). Son cytosquelette est formé notamment de microfilaments d'actine et de vimentine (Figure 1B et 1C).

Cellule quiescente à l'état physiologique, le fibroblaste est soumis à peu de signaux. Il ne prolifère pas mais reste métaboliquement actif synthétisant et dégradant les divers constituants de la MEC. Dans cet état, une interaction bidirectionnelle est entretenue entre les fibroblastes et les éléments de la MEC mais également avec les autres cellules environnantes. Ces interactions se font par l'intermédiaire de liaisons ligand-récepteurs, par des stimulations mécaniques, par des sécrétions de cytokines autocrines et paracrines et par des liaisons avec les hormones circulantes. Ces interactions permettent d'assurer l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire l'adéquation qualitative et quantitative des composants de la MEC nécessaires aux fonctions du tissu (5).



**Figure 1. Phénotype du fibroblaste gingival. (A) Fibroblaste gingival entouré d'un réseau de collagène capté par microscopie électronique. Notez le volume du noyau, du reticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi (Bartold PM, 1998, Quintessence Publishing Co Inc. Chicago). (B) Image réalisée par microscopie à balayage de fibroblaste en culture. Notez les flèches indiquant les lamellipodes (image, laboratoire de Vancouver). (C) Marquage du cytosquelette de fibroblastes gingivaux en culture, de gauche à droite: l'actine (phalloïdine, x200), la vimentine (x400) (image du laboratoire, Pr Gogly)**

- Assurer la cicatrisation tissulaire

Après une lésion, sous l'influence de conditions inflammatoires, le fibroblaste est apte à modifier son phénotype. Capable de proliférer, de migrer, de remodeler les éléments de la MEC et de synthétiser des cytokines impliquées dans la cicatrisation, cette

cellule mésenchymateuse est au cœur des phénomènes de réparation tissulaire. Ce changement de phénotype est concomitant à une large modification de l'expression du transcriptome (6). Lors d'une lésion, la réponse inflammatoire est suivie de la formation d'un tissu de granulation synthétisé par les fibroblastes. Ce tissu contient les éléments d'une MEC transitoire sur laquelle vont pouvoir migrer les fibroblastes et synthétiser les éléments nécessaires à la génération d'une MEC mature. La synthèse de la MEC provisoire va également permettre la recolonisation des cellules en contact avec le tissu conjonctif. Par exemple, au niveau de la peau, elle va permettre la ré-épithélialisation de la plaie par les kératinocytes. Par ailleurs, sous l'influence de cytokines et notamment du Transforming Growth Factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ ), le fibroblaste va se différencier en myofibroblaste (7) permettant d'assurer la contraction de la plaie. Cette contraction va accélérer la cicatrisation en rapprochant les berges de la lésion (6).

L'implication dans les événements de réparation est liée principalement aux phénomènes en rapport avec d'une part, les interactions cellule/matrice, et d'autre part, celles entretenues avec les cellules inflammatoires. Par l'intermédiaire de protéoglycanes de surface et d'intégrines, le fibroblaste est capable de se lier aux éléments de la MEC de manière spécifique. Par exemple, les intégrines  $\alpha_1\beta_1$  et  $\alpha_2\beta_1$  sont capables de se lier au collagène alors que les intégrines  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  interagissent préférentiellement avec la fibronectine (8). Par l'intermédiaire du domaine intracytoplasmique de la sous-unité  $\beta_1$ , l'interaction entre une intégrine et son ligand déclenche des signaux intracellulaires modifiant l'activité du fibroblaste. C'est par l'intermédiaire de ce potentiel de transduction que des éléments issus de la dégradation de la MEC vont déclencher des modifications de conformation du cytosquelette du fibroblaste favorisant d'une part, la formation de lamellipodes permettant au fibroblaste de migrer et d'autre part, la modification de la synthèse des cytokines et des métalloprotéinases matricielles (MMPs).

Deux types d'interactions avec les cellules inflammatoires coexistent: (a) soit par contact direct entre le fibroblaste et les cellules inflammatoires, c'est le cas par exemple des interactions entre les fibroblastes gingivaux et les lymphocytes qui induisent l'expression des ARNm de l'interleukine (IL)-1 $\alpha$  et d'IL-6 de la part du fibroblaste gingival (9) et d'autre part, l'expression de CD13 (impliqué dans la dégradation des neuropeptides et des cytokines de l'inflammation) à la surface des lymphocytes T en

contact les fibroblastes gingivaux (10); (b) soit par l'intermédiaire de la libération de cytokines et de facteurs de croissance. Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) bactériens stimulent la sécrétion d'IL-6 par le fibroblaste gingival, laquelle induira la synthèse de la MMP-1 par les macrophages (11).

### I.1.3. Dysfonctions du fibroblaste

Une perturbation des processus normaux, lors de l'état quiescent, lors de la morphogénèse ou encore au cours de la cicatrisation d'une lésion peut conduire à divers types de pathologies. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de ces altérations. Ils incluent des facteurs génétiques, les effets de l'inflammation, des lésions répétées et des mécanismes d'autoimmunité (12).

Interagissant avec les cellules inflammatoires, une altération dans ce dialogue peut conduire à des pathologies ou alors les renforcer. C'est le cas par exemple des polyarthrites rhumatoïdes ou encore des sclérodermies (13-16). Une altération dans la réparation tissulaire peut conduire à des cicatrices aberrantes. C'est le cas des chéloïdes qui se caractérisent par un excès de tissu fibreux cicatriciel au niveau cutané. D'autres types de fibrose sont imputables à une dérégulation du fibroblaste et peuvent compromettre la fonction de l'organe qui en est le siège (fibroses du foie, du rein,...). Enfin, comme toute cellule, une transformation maligne peut intervenir et produire un cancer du tissu conjonctif (sarcome, fibrosarcome). Ces propriétés générales sont communes à l'ensemble des fibroblastes. Cependant, il existe une variété phénotypique entre les fibroblastes issus de tissus différents (hétérogénéité inter-tissulaire) ou au sein d'un même tissu (hétérogénéité intra-tissulaire).

### I.1.4. Hétérogénéité fibroblastique

La plupart des données scientifiques concernant le fibroblaste sont issues d'études réalisées *in vitro*. A partir de biopsies, les cellules sont récupérées soit par digestion enzymatique soit par contact direct de la biopsie avec la boîte de culture (méthode par explant). Dans cette dernière technique, après adhésion de l'explant, les cellules migrent hors du prélèvement et colonisent la boîte de Pétri. Or, par ces deux techniques, il est impossible d'être certain d'obtenir uniquement des fibroblastes. En effet, soumis aux

conditions de culture classique (milieu contenant du DMEM et du sérum de veau fœtal à 10%, CO<sub>2</sub> à 5%, ...) d'autres types cellulaires sont capables de survivre et de proliférer (5). Il s'agit des myofibroblastes, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) du tissu conjonctif, des péricytes ou encore des fibrocytes (5). L'ensemble de ces cellules présente certaines propriétés phénotypiques et fonctionnelles communes qui leur permettent de se maintenir dans ces conditions. Par ailleurs, une grande partie des marqueurs membranaires sont identiques et aucun ne discrimine un type cellulaire des autres. De ce fait, la mise au point d'une technique de culture permettant une sélection stricte des fibroblastes reste à établir.

En dehors de ces difficultés techniques, l'hétérogénéité au sein même des fibroblastes a été mise en évidence. Des différences peuvent être décrites à plusieurs niveaux. Il s'agit notamment des origines embryologiques de ces cellules. La plupart des fibroblastes dérivent, au niveau embryonnaire, du feuillet mésodermique comme c'est le cas des fibroblastes de la peau abdominale ou de la moelle osseuse du squelette axial. Mais d'autres fibroblastes, comme ceux présents au niveau de certaines structures cranio-faciales (ligament parodontal, pulpe dentaire,...) dérivent des crêtes neurales.

Par ailleurs, la localisation anatomique des fibroblastes à l'âge adulte est également un élément de discrimination. Les travaux de Chang ont mis en évidence un profil d'expression génétique qui dépend de leur localisation topographique et qui sont en lien avec les origines embryonnaires (17). L'expression de morphogènes et notamment des homéogènes HOX à l'âge adulte est corrélée aux situations anatomiques antéro-postérieure, rostro-caudale et dermique/non-dermique (18). Ainsi, on retrouve plus de variations entre les transcriptomes de fibroblastes de deux régions anatomiques différentes provenant d'un même individu qu'entre les transcriptomes de fibroblastes issus d'une même localisation chez deux individus différents (17, 18).

D'un point vu fonctionnel, les interactions avec les cellules environnantes sont différentes selon le type de fibroblastes. Par exemple, les interactions entre fibroblastes gingivaux (FG) et les cellules épithéliales de la muqueuse orale sont différentes de celles qu'entretiennent les fibroblastes dermiques avec les cellules épithéliales de la peau. La production d'une MEC spécifique à chacun des tissus va modifier le phénotype des kératinocytes. Par exemple, la production des collagènes de type III et V va être moins

abondante par les fibroblastes gingivaux que par les fibroblastes dermiques. Ils vont en revanche sécréter plus de keratinocyte growth factor (KGF), (HGF) et de vascular endothelial growth factor (VEGF) lors de la ré-épithélialisation (19, 20). Les fibroblastes gingivaux sont également moins sensibles aux effets pro-fibrotiques du TGF- $\beta_1$  que les fibroblastes dermiques. Ceci est dû à une moindre production d'endothéline-1 par les fibroblastes dermiques (21).

Les différences entre fibroblastes vont influencer sur les capacités de cicatrisation du tissu dans lequel ils siègent. Certainement lié à leur fonction et à leur ontogénie, les organes possèdent des capacités de cicatrisation très diverses dans le corps humain. Ainsi, le foie ou la peau présente un potentiel de réparation très supérieur aux artères ou au système nerveux. Ces différences nous ont amenées à étudier des fibroblastes issus de tissus présentant une cicatrisation optimale. L'objectif est de comprendre comment ces cellules présentent un tel potentiel afin de pouvoir les utiliser, à long terme, dans des protocoles de thérapie cellulaire. En somme, transférer des compétences de régénération accrues de certains tissus pour d'autres tissus faiblement efficaces pour cette fonction.

#### I.1.5. La gencive, un tissu aux propriétés de cicatrisation exceptionnelles

- **Situation anatomique**

Parmi les tissus ayant un fort pouvoir cicatrisant, la muqueuse orale présente l'avantage d'être facilement accessible et donc de permettre l'étude des fibroblastes qui la peuplent. Au sein de cette muqueuse, la gencive est un tissu à part. Faisant partie des muqueuses masticatoires, elle se situe entre les collets dentaires et la ligne muco-gingivale et présente un aspect festonné au niveau de sa crête. La gencive marginale se situe au niveau vestibulaire et lingual tandis que la gencive palatine, comme son nom l'indique recouvre le palais. Les espaces entre les dents sont comblés par les papilles gingivales inter-dentaires. Dans le sens corono-apical, la gencive est divisée en deux parties : libre et attachée. La première partie laisse un espace entre la gencive et la dent appelé sulcus. La seconde partie est en contact avec le périoste de l'os alvéolaire, os dans lequel s'ancrent les dents (Figure 2).

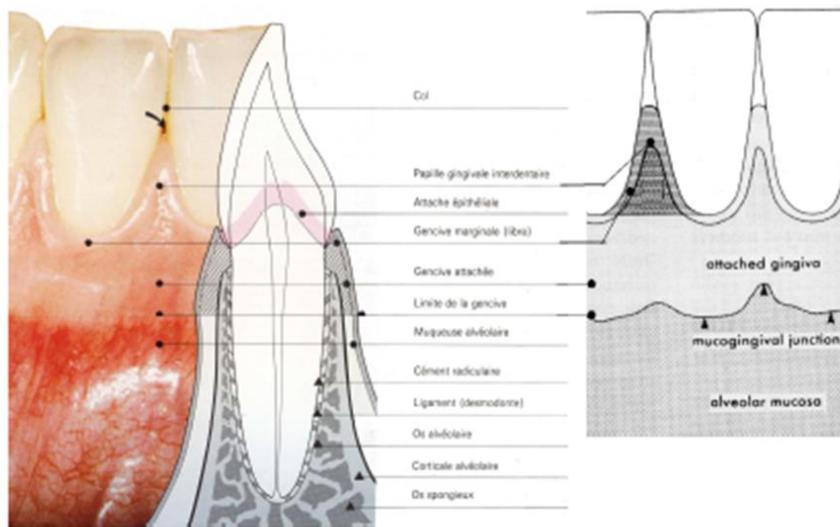


Figure 2. Vue macroscopique et schéma en coupe transversale de l'organe dentaire et de la gencive. (22)

- **Composition histologique**

La gencive se distingue au niveau histologique du reste de la muqueuse orale. Elle présente au niveau superficiel un épithélium malpighien kératinisé qui forme des interdigitations dans le tissu conjonctif sous-jacent. Plusieurs types d'épithéliums vont composer la gencive. On retrouve ainsi l'épithélium de jonction qui se situe au contact des dents, au fond du sulcus, l'épithélium sulculaire qui va être en continuité de l'épithélium de jonction et va tapisser le sulcus. Enfin l'épithélium buccal se situe sur le reste de la gencive. Ces épithéliums vont montrer certaines spécificités en fonction de leur localisation. Par exemple, l'épithélium de jonction va présenter des liaisons lâches entre les cellules le constituant permettant l'exsudation du fluide crévicaire.

Le tissu conjonctif est composé de diverses cellules : principalement de fibroblastes gingivaux (que nous détaillerons dans le chapitre suivant) et de cellules inflammatoires. La MEC est composée en majorité de collagène (60% du volume total). Le collagène va assurer les propriétés structurales du tissu conjonctif. Trois types de collagène sont prépondérants dans ce tissu. Il s'agit du type I (91%), du type III (8%) et du type V (moins de 1%) (22). Le collagène de type I majoritaire dans les différentes couches du tissu conjonctif gingival est organisé soit, en faisceaux larges et denses (qui

composent en majorité l'appareil d'ancrage supra-radicaire), soit en réseau à fibres courtes et fines associées au collagène de type III (23). Une altération de la synthèse du type III, comme dans le cas d'une mutation génétique va perturber la fibrillogénèse du type I se caractérisant par un diamètre plus important des fibres (24). D'un point de vue clinique, les patients souffrant de la maladie d'Ehlers-Danlos de type vasculaire et dont l'étiologie est une mutation génétique affectant le collagène de type III, présentent une gencive anormalement fine (25). Par ailleurs, on retrouve le collagène de type III organisé en réseau réticulaire près de la membrane basale de l'épithélium de jonction. La distribution du collagène de type III dans le reste du tissu conjonctif est plus diffuse (23, 26, 27). Le collagène de type V, par sa structure filamenteuse, va enrober les fibres de collagène de type I et III (23, 26, 28). D'autres types de collagènes, très minoritaires, vont également être retrouvés, comme le collagène de type VI sous forme de réseau diffus ou encore le collagène de type IV, localisé au niveau de la membrane basale mais aussi autour des fibres nerveuses.

L'autre composante fibrillaire du tissu conjonctif provient des fibres élastiques. Les fibres du réseau élastique sont, après le collagène, les composants fibrillaires majeurs du tissu conjonctif gingival. Elles confèrent au tissu son élasticité. On en distingue trois types (oxytalane, élaunine et fibres élastiques) qui vont avoir une localisation spécifique. Ainsi, les fibres d'oxytalane sont localisées au tiers superficiel, les fibres d'élaunine au tiers moyen et les fibres élastiques au niveau profond du tissu conjonctif (29). Par ailleurs, la proportion de fibres élastiques dans la muqueuse orale est sensiblement différente avec une abondance supérieure à la gencive qui en explique la laxité.

En dehors des fibres de collagènes et élastiques, la MEC contient un grand nombre de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes (GAG), de glycoprotéines et d'autres protéines. Les protéoglycanes sont des glycoprotéines composés d'une protéine porteuse sur laquelle va se lier des chaînes composées de motifs disaccharides sulfatés ou non, appelés glycosaminoglycanes (GAG). Au niveau du tissu conjonctif gingival, différents types ont été identifiés : la décorine, le biglycan, le versican, le perlécan et le syndécan qui est le seul à être membranaire contrairement aux autres qui sont sécrétés (30). Ils assurent plusieurs fonctions essentielles au fonctionnement du tissu conjonctif. Ainsi, ils participent au maintien de l'hydratation des tissus en fixant les molécules d'eau. Cette

fonction est assurée par les protéoglycanes larges et très chargés négativement comme le versican ou par le GAG acide hyaluronique. De même, les longues chaînes de répétition disaccharidique vont former un maillage qui va retenir les grosses molécules et donc participer à la fonction de filtrage et de stockage (4). Les petits protéoglycanes comme la décorine vont participer à la régulation de la synthèse des collagènes. Certains sont capables de réguler la distribution des facteurs de croissance (31). Cette fonction régulatrice permet à la cellule d'établir des rétrocontrôles en modifiant la synthèse des macromolécules matricielles et des facteurs de croissance en fonction de l'activité métabolique. Par ailleurs, ils participent à l'adhérence cellulaire et à la croissance tissulaire.

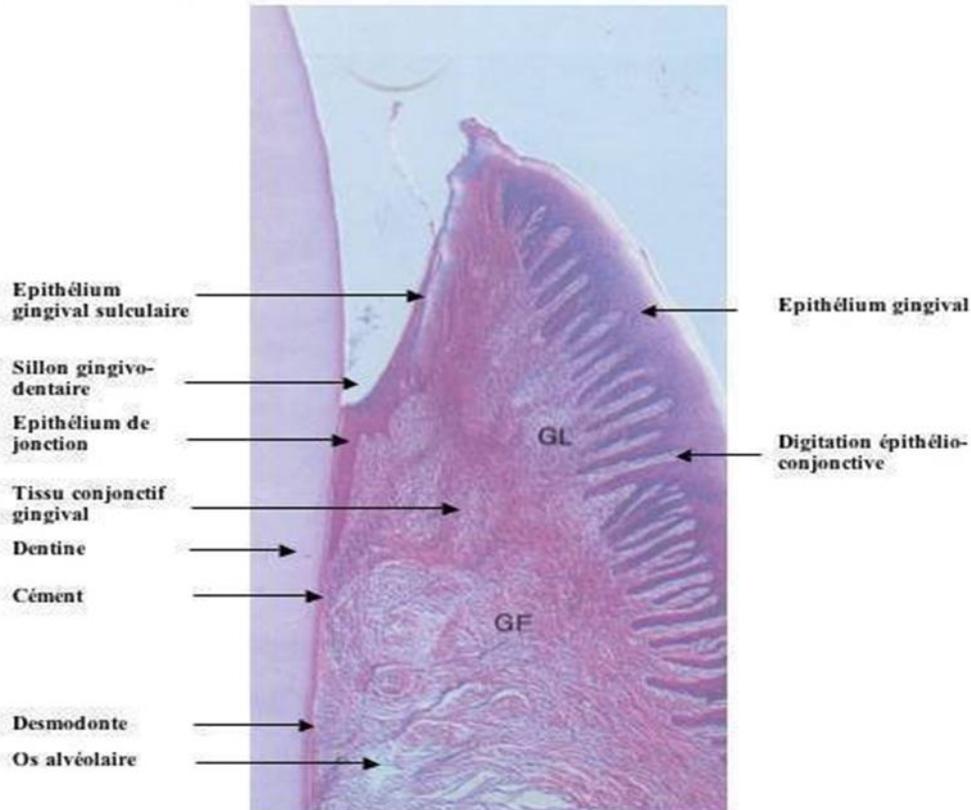


Figure 3. Coupe histologique de gencive. GL: Gencive libre, GF: gencive attachée (Fonzi L., Piccin Nuovo Libreria. Padoue 1994).

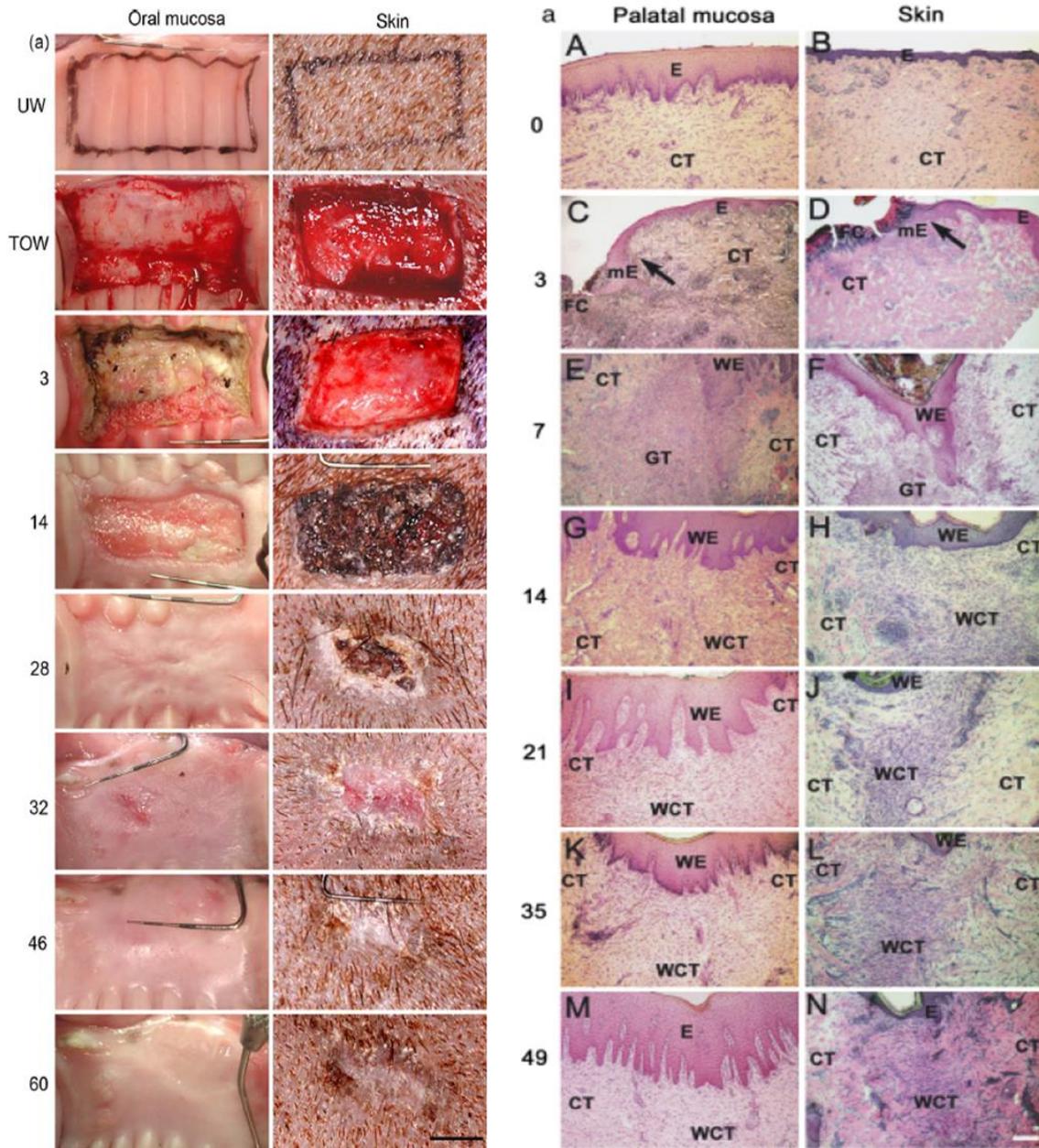
Les GAG peuvent être partie intégrante du protéoglycane ou être libres (acide hyaluronique). Le plus abondant est le dermatane sulfate (60% des GAG). Le deuxième GAG le plus abondant est le chondroïtine sulfate (30% des GAG), puis viennent l'héparane sulfate et l'hyaluronate (10% chacun du total des GAG). Ils présentent une large gamme de poids moléculaire, allant de 15 kD pour l'héparane sulfate à 340kD pour l'hyaluronate, ainsi que de degrés de sulfatation et de charges négatives. Ils se distribuent dans l'ensemble du tissu conjonctif gingival.

Les glycoprotéines de structure vont assurer les liaisons entre les différentes macromolécules de la MEC et les cellules qui la composent. On retrouvera différents types de molécules comme la fibronectine, la laminine, mais également la vitronectine ou encore la té nascine.

- **Propriétés de cicatrisation**

Servant de tissu de recouvrement, la gencive est exposée en permanence aux traumatismes que subit la cavité buccale. Premier segment du système digestif, directement en contact avec le monde extérieur, la gencive est soumise à des agressions très importantes, qu'elles soient thermiques, mécaniques, chimiques ou infectieuses. C'est très certainement en raison de ces conditions extrêmes que la gencive a acquis un potentiel accru, tant au niveau de son taux de renouvellement - parmi les plus importants du corps humain (32, 33) - qu'au niveau de ses capacités de cicatrisation. En effet, après une lésion ou une chirurgie, la gencive est capable de se régénérer *ad integrum*, sans fibrose ni cicatrice (22, 34). De ce fait, la cicatrisation gingivale est considérée comme embryonnaire ("embryo-like") (22). A partir de modèles animaux comparant des plaies cutanées et gingivales, il a été montré que la cicatrisation de ce dernier tissu était plus rapide et présentait une baisse très significative de la formation de cicatrice, et ceci à la fois cliniquement et histologiquement (Figure 4). La phase inflammatoire, précédant la cicatrisation est par ailleurs atténuée et plus courte que dans la peau, avec une baisse du recrutement de neutrophiles, de macrophages, et de lymphocytes T (35-37). A l'inverse, le nombre de myofibroblastes est plus important dans la gencive que dans la peau au jour 14 après l'induction de la lésion. Il est également plus important avant la lésion de la gencive tandis qu'il est le même dans la peau (35). En outre, il a été montré que le ratio

TGF- $\beta_3$ / TGF- $\beta_1$  était plus important dans la cicatrisation gingivale. Or le TGF- $\beta_3$  a un effet anti-fibrotique tandis que le TGF- $\beta_1$  a un effet inverse (38, 39).



**Figure 4. Comparaison clinique (A) et histologique (B) de la cicatrisation gingivale palatine et cutanée chez le porc. Notez la différence de vitesse et de qualité de cicatrisation entre les deux tissus. L'épithélium gingival est plus épais que celui de la peau. Il se reforme plus vite et réalise des projections dans le tissu conjonctif sous-jacent. La comparaison entre les deux tissus se fait aux jours 3, 14, 28, 32, 46, 60 au niveau clinique et aux jours 3, 7, 14, 21, 35, 49 pour l'analyse histologique. Les flèches indiquent les bords de la lésion. Légendes: (A) UW: tissu normal, TOW: section prise lors de l'induction de la plaie; (B) CT: tissu conjonctif, WCT: tissu conjonctif de cicatrisation E: épithélium, mE: épithélium migratoire, wE: épithélium de cicatrisation, FC: clou fibrinaire, GT: tissu de granulation. (38, 39)**

Les propriétés de cicatrisation de la gencive sont attribuables à plusieurs acteurs : les cellules épithéliales, qui, à partir des berges de la lésion, vont migrer vers son centre en reconstituant l'épithélium; le tissu vasculaire qui va fournir les éléments nutritifs nécessaires; la salive qui apporte un taux d'humidité favorable à la cicatrisation et qui contient des facteurs de croissance (EGF, TGF- $\beta$ , FGF, IGF etc.), des ions Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> favorisant les réactions enzymatiques en tant que co-facteurs et des histatines et secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) pro-cicatriciels (6, 40). Cependant, le fibroblaste est l'élément central de ces processus en interagissant avec l'ensemble de ces acteurs et en modulant leurs rôles.

#### I.1.6. Le fibroblaste gingival

Constituant majoritaire du tissu conjonctif gingival, il représente 65% des cellules du tissu conjonctif, soit environ  $200.10^6$  cellules par  $\text{cm}^3$  (22). Le FG présente des particularités le distinguant de fibroblastes issus d'autres tissus. D'un point de vue embryologique, les FG comme la plupart des cellules constitutives des structures cranio-faciales dérivent des crêtes neurales crâniennes (nous détaillerons plus loin la notion de crête neurale). De manière plus précise, la grande majorité des FG dérive des crêtes neurales bien qu'une fraction soit d'origine mésodermique (5, 41). Ces données sont issues d'expériences faisant intervenir des souris dont le gène WINT1 a été marqué à la protéine à fluorescence verte (GFP). Il n'est pas impossible que l'âge de l'individu influence la proportion de ces deux origines. En effet, il a été montré que les cellules adipeuses de la face sont à l'origine uniquement dérivées des crêtes neurales puis sont progressivement colonisées par des adipocytes d'origine mésodermique parallèlement à l'avancée en âge (42). Ces expériences n'ont cependant pas été confirmées au niveau des FG.

Comme tout fibroblaste, les FG vont synthétiser les composants de la MEC gingivale. Les composants et les proportions de cette MEC péri-cellulaire (ou niche) sont spécifiques au tissu et donc au fibroblaste qui les produit. Ainsi, lorsque l'on compare la composition des MEC dermique et gingivale, on observe des différences qualitative et

quantitative. Ces différences concernent notamment, les collagènes de type III et V qui sont moins synthétisés par le fibroblaste gingival mais également des glycosaminoglycanes sulfatés, l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate, l'acide hyaluronique ou encore la ténascine-C (36, 43-45). Autre exemple, l'élastine est moins abondante dans le tissu conjonctif gingival que dans la peau. Cependant, le FG synthétise les composants micro fibrillaire associés au réseau élastique tels que la fibuline 5, la fibrilline 1 et 2 de manière plus abondante (46-48). Néanmoins, bien que FG synthétise moins d'élastine que le fibroblaste dermique, le réseau élastique gingival est moins dégradé par le vieillissement que dans la peau (49).

- Hétérogénéité fibroblastique intra-tissulaire

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les fibroblastes présentent des propriétés communes quel que soit leur tissu d'origine mais également des spécificités tissulaires. Cette hétérogénéité inter-tissulaire s'accompagne d'une hétérogénéité intra-tissulaire. En effet, il a été démontré qu'au sein du tissu conjonctif de la gencive coexistent des fibroblastes phénotypiquement et fonctionnellement différents. Par exemple, selon les sites gingivaux, le FG va synthétiser différents composants : la composition de la MEC est différente entre la gencive attachée et les papilles interdentaires (50). Au niveau du tissu conjonctif inter-dentaire, on retrouve plus de pro-collagène de type I, les isoformes alternatifs A et B (EDA et EDB) de la fibronectine, la ténascine-C, le TGF- $\beta$ , le connective tissue growth factor (CTGF) et le signaling molecule son-of-sevenless (SOS)-1. La présence, au niveau des papilles inter-dentaires de ces macromolécules, qui sont normalement exprimées au cours de la cicatrisation, suggère la présence de cellules avec un profil sécrétoire pro-cicatrisant différent de la gencive marginale (50). Ces données sont à rapprocher des études de cultures *in vitro* montrant des capacités de migration dans des gels de collagènes différents entre les FG de papilles inter-dentaire et de gencive libre. Les premiers présentent un indice d'infiltration comparable aux fibroblastes fœtaux contrairement aux seconds. Cette capacité d'infiltration est dépendante du facteur stimulant la migration (MSF). Ce facteur est sécrété par les fibroblastes fœtaux, par les fibroblastes papillaires mais ne l'est ni par les fibroblastes dermiques, ni par les fibroblastes du conjonctif profond (51).

Le facteur C1q, constituant du complexe 1 du complément (C1), est également un facteur différenciant les fibroblastes gingivaux. Les fibroblastes gingivaux exprimant à leur surface le facteur C1q présentent des propriétés différentes : ils prolifèrent plus vite et synthétisent deux à trois fois plus de protéines que les souches parentales. Quarante pourcent de cette synthèse est dédiée au collagène dont une part de collagène de type III et V plus importante que les fibroblastes n'exprimant pas le facteur C1q (52).

Hakkinen a montré que cette hétérogénéité se retrouvait également au sein du tissu de granulation, que ce dernier soit formé au cours d'un processus de cicatrisation ou lors de lésions induites par une parodontite. Dans ces expériences, des cultures monocellulaires ont permis de générer des unités de formation de colonies fibroblastiques (CFU-F) à partir, soit de tissus de granulation, soit de gencive normale. Il a été montré que trois types cellulaires pouvaient être obtenus, différenciables au niveau morphologique (les clones présentaient un aspect soit petit/fusifforme, soit large/étoilé ou alors épithélioïde). Alors que le tissu de granulation contient un nombre prépondérant de cellules de type étoilé, la gencive normale contient préférentiellement les deux autres types (53). Les clones étoilés présentent une capacité proliférative moindre que les autres types cellulaires (53).

Cette hétérogénéité fibroblastique présente un corollaire clinique : l'hyperplasie/hypertrophie gingivale d'étiologie médicamenteuse. Cette pathologie se caractérise par un accroissement du volume de la gencive. Les inhibiteurs calciques sont les plus fréquemment associés à cet accroissement gingival. D'autres médicaments comme certains immuno-modulateurs et anti-convulsants peuvent avoir les mêmes conséquences. Cet effet est propre à la gencive renforçant les arguments d'une hétérogénéité fibroblastique inter-tissulaire (la peau, par exemple, ne devient jamais hyperplasique sous l'effet de ces médicaments) (54). En outre, les cultures *in vitro* de fibroblastes soumis à ces médicaments montrent que seule une sous-population des FG répond par une production excessive de MEC. Par ailleurs, les fibroblastes issus de biopsies de gencives hyperplasiques continuent de synthétiser, *in vitro*, une trop grande quantité de MEC, suggérant une sélection/expansion du phénotype incriminé *in vivo* par l'exposition chronique aux médicaments (54, 55).

Au regard de cette capacité exceptionnelle de cicatrisation qu'offre le FG et des nombreuses études mettant en évidence la présence d'une hétérogénéité intra-tissulaire, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le tissu conjonctif gingival pouvait contenir des cellules souches mésenchymateuses. Pour appuyer cette hypothèse, nous devons désormais développer la notion de cellule souche.

## **I.2. Les cellules souches**

### **I.2.1. Définition**

Le terme de cellule souche regroupe une grande variété de types cellulaires. Ce terme est employé de manière large et se définit davantage comme un socle commun de propriétés cellulaires plutôt qu'une entité clairement identifiée. On pourra ainsi parler de cellules souches hématopoïétiques, de cellules souches de la moelle osseuse, mais également de cellules souches adultes ou embryonnaires, de cellules souches induites... Le socle commun de ces cellules est finalement simple. On définira ainsi une cellule souche comme étant capable de se renouveler *in vitro* à partir d'une seule cellule (capacité de clonogénicité) d'une part, et de pouvoir se différencier en plusieurs lignages cellulaires (capacité de différenciation) d'autre part (56). Cette dernière capacité est modulée en différents grades selon la variété des différenciations possibles par le type cellulaire concerné. On parlera de cellule unipotente pour une cellule capable de donner un seul type cellulaire (par exemple : les cellules souches spermatogonales), de multipotente pour une cellule pouvant se différencier en plusieurs types cellulaires appartenant au même lignage cellulaire (par exemple, les cellules souches hématopoïétiques), de pluripotente lorsque la cellule est capable de se différencier en plusieurs types cellulaires appartenant à différents feuillets primordiaux de l'embryon : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (par exemple, les cellules souches embryonnaires). Seuls l'ovule fécondé et les premières cellules divisées du blastomère sont totipotents, étant capables de donner l'ensemble des tissus de l'individu et également les annexes placentaires nécessaires au développement de l'embryon (57).

### I.2.2. Critères de différenciation

Les critères utilisés pour décrire les capacités de différenciation sont variés et offre une gradation du niveau de preuve du potentiel d'une cellule. Les essais de différenciation *in vitro* auront pour but de mettre en évidence des marqueurs spécifiques d'une lignée induite par des conditions de culture adaptées. Cependant, le mode de culture *in vitro* peut induire des biais notamment par stress cellulaire produisant des faux positifs, surtout pour la différenciation neurale (57-59). Par ailleurs, ces essais reposent la plupart du temps sur des marqueurs sans que la différenciation ne soit confirmée par des tests fonctionnels (57).

Les essais *in vivo* de différenciation sont plus contraignants. Ils diminuent les biais liés au mode de culture *in vitro* et permettent de suivre l'évolution des cellules transplantées dans un environnement plus proche de la réalité physiologique. Le taux de réussite de différenciation lorsque l'on passe de tests *in vitro* à *in vivo* est inférieure. Il a été montré, par exemple, que des cellules souches de moelle osseuse (CSMMO) purifiées à l'aide des marqueurs Stro-1<sup>bright</sup>/V-CAM+ se différenciaient en ostéoblastes produisant une matrice minéralisée *in vitro* (testées sur 64 clones) dans des conditions osteoinductive, mais que seulement 54% des clones étaient capable, *in vivo*, de produire de l'os et 35% de constituer des éléments hématopoïétiques et adipeux dans les zones transplantées (60). Cependant, des biais liés à l'expérimentation peuvent induire des erreurs d'interprétations. Par exemple, la présence de cellules souches de donneurs retrouvées au niveau de différents organes chez le transplanté peut résulter des effets de la circulation sanguine ou de la fusion avec des cellules hôtes (61).

Les essais pour prouver la pluripotence *in vivo* des cellules testées sont multiples. Il y a les essais consistant à former des tératomes. Ils ont pour but de démontrer la capacité de pluripotence en induisant *in vivo* des tumeurs possédant de multiples lignages cellulaires. Ce test ne permet cependant pas de prouver la capacité des cellules testées à accomplir un développement normal. La formation de chimère permet, elle, d'évaluer la contribution des cellules injectées dans le blastocyste au développement des tissus embryonnaires et donc de participer de manière physiologique à l'établissement des organes. Cependant, pour des raisons éthiques évidentes, ce test ne peut être réalisé avec des embryons humains. Enfin, le test le plus contraignant consistera en une

complémentation d'embryon tétraploïde (4n). Ces derniers sont générés par fusion de deux zygotes et acquièrent un patrimoine génétique composé de 2 paires de chromosomes. Dans ces conditions, ces embryons 4n ne peuvent contribuer au développement des lignées somatiques mais permettent seulement la mise en place des annexes placentaires. Ainsi les lignées somatiques sont exclusivement créées par les cellules testées (57).

Les applications de ces cellules sont multiples. Au-delà de l'aide à la compréhension des mécanismes fondamentaux de développement embryologique et tissulaire, l'utilisation de ces cellules est envisagée pour le traitement de pathologies par thérapie cellulaire. Parmi la variété des cellules souches étudiées, quelques-unes sont plus particulièrement promises à des applications en la matière. Elles correspondent à des stratégies différentes dans l'obtention et la production des cellules souches à promouvoir. Ainsi, trois grandes variétés de cellules souches sont plus particulièrement étudiées par la communauté scientifique : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches à pluripotence induite et les cellules souches adultes.

### I.2.3. Les cellules souches embryonnaires

La possibilité de cultiver *in vitro* des cellules dérivées de blastocystes murins date de 1981 (62) et celles dérivées de blastocystes humain date de 1998 (63). Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont isolées à partir de la masse cellulaire interne de l'embryon, aux jours 4-5 après fécondation. Plusieurs cellules sont nécessaires pour pouvoir proliférer. Après dissociation, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri, sur des couches de fibroblastes fœtaux irradiés (pour éviter qu'ils ne prolifèrent et n'entrent en compétition avec les CSE) en présence de leukemia inhibitor factor (LIF) qui est un facteur inhibant leur différenciation vers des lignées hématopoïétiques. Ces cellules synthétisent un taux élevé de télomérase concordant avec leur capacité de renouvellement infini et gardent leur faculté de pluripotence après amplification. Elles expriment les marqueurs suivants : stage-specific embryonic antigen (SSEA) -3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, et la phosphatase alcaline (63). Elles sont pluripotentes comme le montrent différents essais réalisés *in vitro*. Injectées dans des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency), les cellules souches embryonnaires ont la capacité de

former des tératomes composés de multiples types tissulaires appartenant aux trois feuillets primordiaux (63). Elles peuvent former des chimères lorsqu'elles sont réinjectées dans des blastocystes et participer à la formation des gamètes (expériences réalisées uniquement chez la souris) (64). Il est étonnant de constater le délai relativement important dans l'établissement des lignées humaines de CSE et celles dérivées de lignées murines. Ce décalage peut être lié aux conditions de cultures. Les cellules murines nécessitent du LIF pour se renouveler et les lignées humaines ont besoin de la voie de signalisation fibroblast growth factor (FGF)-2-activin/nodal (65). Ces cellules font l'objet de nombreuses études. Cependant, plusieurs limites remettent en cause leur utilisation à des fins thérapeutiques. Tout d'abord, des limites éthiques : en effet, il est nécessaire de détruire des embryons humains pour obtenir ces lignées cellulaires. Par ailleurs elles produisent des tumeurs malignes ou des tératomes au niveau de leur point d'injection (66). Enfin, étant issues d'individus autres que le patient receveur, elles présentent un risque majeur de rejet immunitaire.

#### I.2.4. Les cellules souches induites

La possibilité de reprogrammer des cellules adultes afin qu'elles acquièrent des propriétés de cellules souches embryonnaires a bouleversé le champ d'investigation des cellules souches. En 2006, Yamanaka montre, à partir de fibroblastes dermiques de souris adultes, qu'il est possible, avec un nombre limité de facteurs (C-MYC, KLF4, SOX2 et OCT3/4), de rendre pluripotentes des cellules adultes (appelées iPS pour induced pluripotent stem cells) (66). Un an plus tard, il réitère ce procédé avec des cellules humaines (67). Ces avancées lui vaudront le prix Nobel en 2012. Ce prix ne récompensera pas Thomson J.A qui parviendra au même résultat en utilisant d'autres facteurs (NANOG, LIN28 à la place de C-MYC et KLF4) en 2007 (68). Le champ d'investigation de ces nouvelles cellules est large et peut être recoupé en quatre catégories (69). Reproduisant les mécanismes de développement embryonnaire, les iPS sont un outil pour la compréhension des processus de différenciation précoce. Elles permettent de reproduire *in vivo* des modèles de maladies en utilisant des cellules de personnes porteuses de mutations géniques. Elles peuvent également servir à tester des

médicaments. Enfin, leur utilisation à des fins de thérapie cellulaire est envisagée, permettant de recréer des tissus endommagés.

Les quatre facteurs intégrés dans la cellule par des rétrovirus vont permettre de modifier l'expression de gènes de pluripotence. D'après Yamanaka, il est probable que ce soient C-MYC et KLF4 qui agissent en tant que modificateurs de la structure de la chromatine, diminuant les liaisons entre la chromatine et les histones et permettant à SOX2 et OCT3/4 de reprogrammer la cellule vers un stade indifférencié. En effet, SOX2 et OCT3/4 ne peuvent se lier à leur cible lorsque la cellule est à l'état différencié. Il a été notamment démontré que KLF4 interagit avec la p300 histone acétyltransférase, induisant une acétylation des histones, diminuant la force des liaisons histone/ADN et donc permettant une augmentation des liaisons facteurs de transcription/promoteur (68). Après plusieurs jours de culture contenant notamment du FGF-2 (maintenant la pluripotence des cellules à l'instar des CSE), ces cellules présentent des propriétés de différenciation comparables aux cellules souches embryonnaires. Ainsi, elles ont la capacité de se différencier dans divers types cellulaires appartenant aux trois feuillets primordiaux, de former des tératomes lorsqu'elles sont injectées en sous cutané de souris immunodéficientes, de former des chimères lorsqu'elles sont injectées dans des embryons de souris et même de compléter des embryons tétraploïdes (70). Cependant, plusieurs écueils sont imputables à cette technique. Tout d'abord, sa faible efficacité, qui est de l'ordre de 0,1% de cellules reprogrammées sur l'ensemble des cellules transfectées (66). En outre, le taux élevé de copies rétrovirales (>20) des gènes insérés, et notamment de C-MYC, est un facteur favorisant la survenue de tumeurs. Cette incompatibilité vis-à-vis d'une utilisation humaine a poussé les chercheurs à mettre au point un transfert de gènes sans rétrovirus en utilisant soit des adénovirus (71), soit des plasmides non intégratifs (72), soit des transposons *piggyBac* permettant l'excision du transgène (73) ou encore des protéines recombinantes(74). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les iPS présentaient un potentiel de différenciation supérieur dans les lignages dont les cellules sont issues, suggérant une mémoire épigénétique des origines embryonnaires (75-77). De manière surprenante, cette mémoire diminue au fur et à mesure des passages en culture cellulaire et peut être effacée lorsqu'une seconde reprogrammation est réalisée (77). Les écueils concernant les potentiels tumérogéniques des iPS doivent cependant être

comparés aux CSE. En effet, la comparaison du taux de mutation entre les iPS et les CSE montre qu'ils sont finalement assez proches. Ce taux, autour de 12,5% selon Taapken (78), peut dès lors être attribué à des mutations propres aux processus de prolifération et de différenciation et/ou aux effets de la culture *in vitro*.

#### I.2.5. Les cellules souches adultes

- Les cellules souches hématopoïétiques

Eu égard aux difficultés éthiques et techniques de l'utilisation des CSE, les scientifiques ont cherché des cellules alternatives à des fins thérapeutiques. A l'âge adulte, les organes contiennent des cellules progénitrices capables de reformer/réparer le tissu lésé. Selon les organes et les tissus, les propriétés de réparation varient considérablement comme nous l'avons déjà évoqué ci-dessus. Les cellules hématopoïétiques sont un exemple d'organisation, à l'âge adulte, de processus de différenciations multiples à partir d'un précurseur indifférencié. Le concept, controversé à l'époque et validé depuis, selon lequel une seule cellule peut donner de multiples lignages hématopoïétique, a été développé au XIX<sup>ème</sup> siècle par l'allemand F. Neumann (1834-1918). Les cellules souches hématopoïétique (CSH) ont donc la capacité de se renouveler et de se différencier, maintenant le pool de cellules nécessaire tout au long de la vie d'un individu (79). Les CSH vont se différencier en progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes (qui eux ne se renouvellent pas) donnant à leur tour l'ensemble des cellules du sang. Les processus de différenciation sont complexes et finement régulés aboutissant à des cellules présentant des fonctions spécifiques interagissant entre elles et avec les cellules environnantes. Ainsi, les lignées myéloïdes vont donner les érythrocytes, les plaquettes, les monocytes/macrophages, les granulocytes et une partie des cellules dendritiques. Les précurseurs lymphoïdes vont quant à eux donner les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules Natural Killer (NK) et l'autre partie des cellules dendritiques (79)(cf. Figure 5). Les controverses concernant l'origine embryonnaire de ces CSH sont encore d'actualité. Cependant, il semble établi que plusieurs sites indépendants soient le siège de l'établissement des premières lignées souches (80, 81), appelées cellules endothéliales hémogéniques.

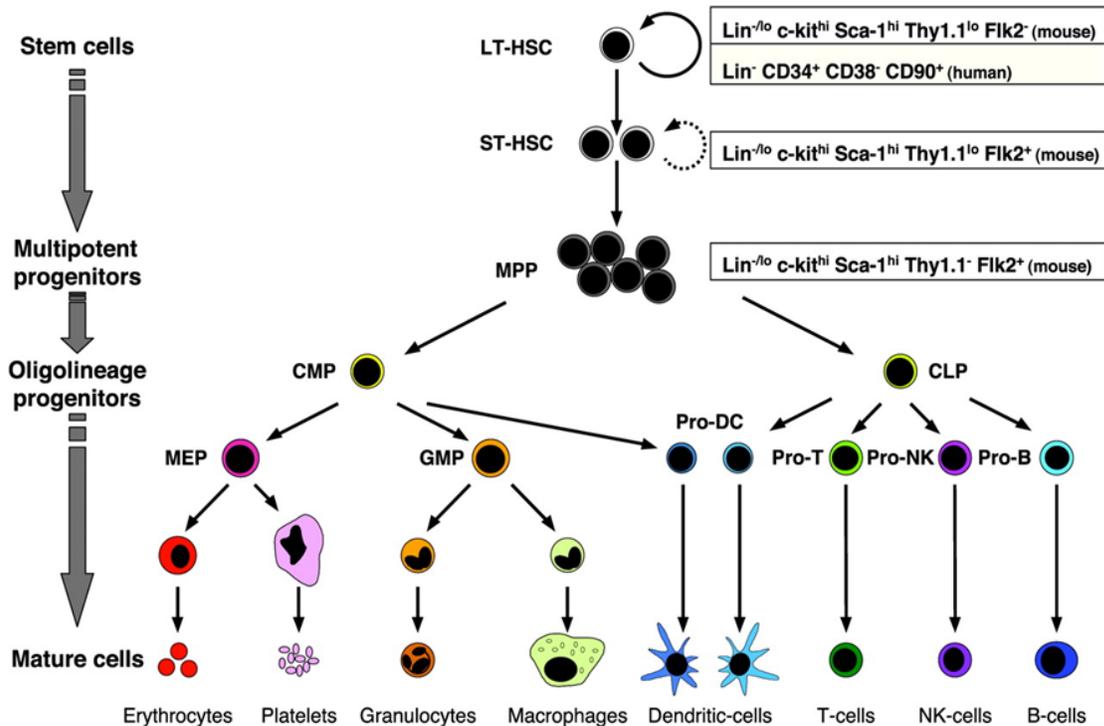


Figure 5. Les lignées hématopoïétiques à l'âge adulte offrent un exemple de différenciation dans différents types cellulaires à partir d'un précurseur commun. LT(SC)-HSC: cellules souches hématopoïétique de long (court) terme, MPP: progéniteurs multipotents, CMP: progéniteurs myéloïdes, CLP: progéniteurs lymphoïdes. MEP: progéniteurs érythrocytaires et mégakariocytaires ; GMP: progéniteurs des granulocytes et mono/macrophages (Passequé, E., PNAS, 2003)

Cet ancêtre commun a, comme son nom l'indique un phénotype endothélial, ce qui le rend difficilement discernable des cellules endothéliales non-hémogénique (82). Chez les mammifères, ces cellules forment au niveau sous-endothélial, des îlots cellulaires qui vont s'engager dans une transition « endothélio-hématopoïétique » grâce notamment à l'activation du gène runt-related transcription factor (RUNX)1 (83). A ce stade, il exprime les marqueurs de cellules endothéliales comme le CD31 ou le Vascular Endothelial (VE)-Cadhérine mais également des marqueurs de cellules souches hématopoïétiques comme le CD41 (GPIIb) (84). Les cellules vont migrer à travers la paroi de l'aorte et gagner l'espace extra-aortique où elles vont rejoindre le compartiment veineux et finir par coloniser la moelle osseuse. C'est dans cette moelle osseuse que les CSH vont se maintenir à l'âge adulte et permettre une hématopoïèse continue. Dès les années 1960, les greffes de moelle osseuse ont été réalisées afin de traiter des hémopathies congénitales ou acquises comme par exemple les leucémies. Le pourcentage de CSH récoltées lors de prélèvement de moelle osseuse du donneur est faible mais

suffisant pour rétablir une fonction hématopoïétique normale chez le receveur. Ces succès thérapeutiques ont permis de consolider le concept de thérapie cellulaire comme base de traitement.

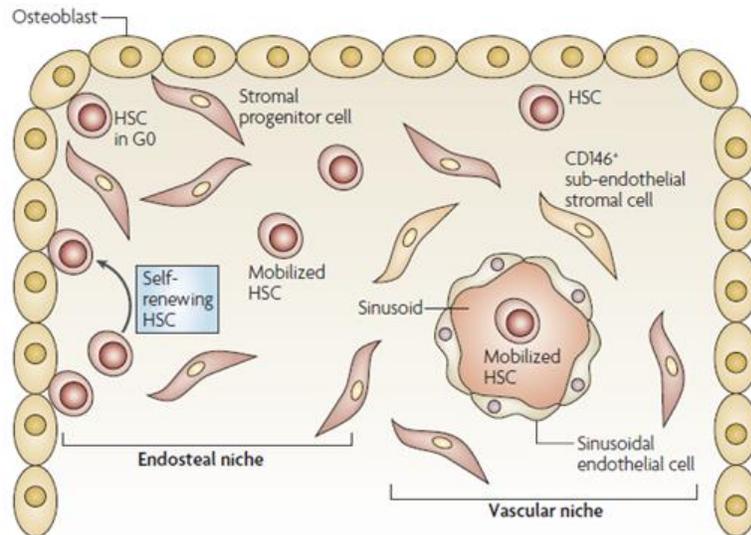
- Micro environnement des CSH

A l'âge adulte, l'hématopoïèse va être assurée dans les os plats comme la scapula, ou l'os iliaque et dans l'épiphyse des os longs, par exemple au sein des têtes de fémur. Dans la moelle osseuse, les CSH vont former un micro environnement hématopoïétique (MEH) assurant l'homéostasie de leur fonction. Ce MEH fait intervenir différentes cellules agissant de concert pour fournir les signaux nécessaires à son élaboration et à son maintien. L'origine, le type et le rôle respectif de ces cellules est un vaste sujet de recherche. Cependant, certains acteurs semblent incontournables dans cette organisation : les cellules endothéliales, les cellules périvasculaires (ou péricytes ou réticulaires), les ostéocytes et un contingent des cellules souches mésenchymateuses. On distingue ainsi deux niches à CSH : une localisée dans la partie vasculaire et l'autre localisée dans l'espace endostéal, sous la couche d'ostéoblastes (Figures 6). Ces derniers vont participer à l'entretien des CSH par l'intermédiaire de cytokines essentielles au MEH dont le stem cell factor (SCF), la chémokine CXCL12, l'Angiopoïétine-1 ou encore la Thrombopoïétine (85, 86).

- Les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse

C'est le rôle des CSM qui est certainement le plus débattu dans l'organisation de cet environnement. La présence de ces précurseurs au sein de la moelle osseuse a été mise en évidence par Friedenstein en 1974. A partir de prélèvement de moelle osseuse, il a montré qu'une fraction des cellules de ce tissu était capable d'adhérer à des boîtes de culture en plastique. Ces cellules ne sont pas hématopoïétiques mais présentent un phénotype fibroblastique. Elles ont la capacité de former des CFU-F et d'être amplifiées *in vitro*. Injectées *in vivo* dans un environnement richement vascularisé, elles forment des tissus osseux et hématopoïétiques (87). En 2009, il a été montré que pour réaliser cette formation hématopoïétique hétérotopique, l'ossification doit se faire nécessairement par la voie endochondrale. En effet, Chan a montré que seules les CSM issues d'os formés

par cette voie de différenciation étaient capables de former cette hématopoïèse hétérotopique



**Figure 6. Organisation des niches pour les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques.** Au sein du compartiment osseux, les CSM et CSH sont en contact. Dans la niche endostéale, les CSM et les ostéoblastes participent au maintien des CSH en phase quiescente (G0). Au niveau de la niche vasculaire, les CSM de type péricytes (CD146<sup>+</sup>) et les cellules endothéliales régulent la prolifération et la différenciation des CSH. (95)

alors que les CSM issues d'os formé par la voie intramembraneuse ne l'étaient pas. Dans cette série d'expériences, l'ossification est assurée par les cellules du donneur tandis que ce sont les cellules de l'hôte qui vont fournir le contingent hématopoïétique (88). Dans une autre série d'expériences, il a été montré que les CSMMO présentant le marqueur CD146 (MCAM), présent initialement au niveau subendothélial, étaient capables de générer *in vivo* des formations sinusoidales, préalable à l'établissement de l'hématopoïèse (89). Ces cellules sont par ailleurs positives aux marqueurs des péricytes. Ainsi, elles expriment le new glue 2 (NG2), l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), la calponine 1 et 3, le récepteur au platelet-derived growth factor  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) et synthétisent les facteurs nécessaires à l'élaboration de l'angiogenèse hématopoïétique (comme l'angiopoïétine-1 (ANG1)) et au maintien du MEH (SCF, CXCL12, N-cadhérine) (89). Une étude récente tend à prouver que les niches hématopoïétiques et mésenchymateuses sont en fait une seule et même niche. En effet, une fraction des CSMMO, positives à la nestine, est en contact étroit avec les CSH. Ces CSM sont également au contact des parois endothéliales

sans exprimer de marqueurs endothéliaux tels que le CD31 ou la VE-cadhérine. Elles synthétisent les facteurs nécessaires au maintien du MEH. Elles sont par ailleurs régulées par des mécanismes locaux et distants. La régulation locale fait intervenir le système nerveux sympathique (SNS) dont les fibres sont au contact de ces cellules. Ces dernières expriment le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique qui permet lors de sa stimulation (en cas de mobilisation médullaire par exemple) de diminuer la différenciation ostéoblastique. Par la présence de récepteurs à l'hormone parathyroïdienne, ces cellules sont régulées à distance. Sous l'effet de l'administration de parathormone, elles vont proliférer et s'orienter dans une voie de différenciation ostéoblastique. Par ailleurs, sur des souris irradiées (afin d'établir une aplasie médullaire), les CSH injectées vont se relocaliser (homing cellulaire) au contact de ces CSM, établissant une preuve supplémentaire d'une niche commune à ces deux types cellulaires (90). Une autre démonstration de l'interconnectivité de ces cellules souches est établie au travers des conséquences observées lors d'une ostéodifférenciation imparfaite sur les lignées hématopoïétiques. En effet, dans des modèles de souris, la délétion sélective du gène *dicer1* au sein des précurseurs ostéoblastiques, bloquant ainsi leur différenciation, conduit à une myélodysplasie puis à une leucémie (91).

L'intérêt pour les CSM ne se limite pas à leur rôle dans le maintien des CSH et au renouvellement des cellules ostéoblastiques. En effet, il a été montré que ces cellules ont des capacités de multipotence. Cette propriété permet d'envisager leur utilisation dans des protocoles cliniques de thérapie cellulaire. A la fin des années 90, plusieurs équipes ont montré la possibilité de différenciation en différents lignages de ces cellules (92, 93). Cultivées *in vitro*, elles peuvent être orientées dans diverses lignées mésenchymateuses telles que les chondrocytes, les adipocytes, les ostéocytes mais également en myocytes (92, 93). Des différenciations dans des lignées autres que mésodermiques ont été réalisées, notamment en neurones ou encore en cellules endothéliales (94). Cependant, la preuve d'une différenciation *in vivo*, reste encore à établir. Ce potentiel multipotent et notamment de différenciation osseuse ou cartilagineuse fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. De nombreux protocoles de différenciation avec divers supports sont testés à l'heure actuelle. Cependant, la difficulté d'obtenir des résultats réitératifs nécessite un perfectionnement de ce procédé thérapeutique.

Une autre propriété des CSM a été mise en évidence un peu plus tardivement : leurs capacités immunomodulatoires (95). En effet, les CSMMO peuvent moduler la prolifération, la différenciation des cellules immunitaires ainsi que leurs profils sécrétoires. Les CSMMO vont réguler la réaction inflammatoire dans le sens d'une diminution en agissant au niveau des systèmes immunitaires innés et adaptifs, soit par contacts directs entre cellules, soit par l'intermédiaire de facteurs sécrétés. Par exemple, sur les cellules du système immunitaire inné, les CSM peuvent bloquer la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes. Les CSM vont également réduire la synthèse par les cellules dendritiques de l'interféron gamma de type I (IFN- $\gamma$ ), cytokine pro-inflammatoire, et au contraire augmenter la production de l'interleukine 10 (IL-10), cytokine anti-inflammatoire (96). Sur le système immunitaire adaptif, les CSMMO vont inhiber la prolifération des lymphocytes CD8+, CD4+ et des lymphocytes B. Ces lymphocytes produisent des agents pro-inflammatoires (notamment le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ) mais également des anticorps (lymphocytes B). En revanche, les CSMMO vont favoriser la prolifération des lymphocytes T régulateurs (CD4/CD25/FoxP3). Cette variété de lymphocytes à un rôle d'adaptateur de la réponse inflammatoire en régulant la prolifération et la synthèse des autres lymphocytes. En augmentant la synthèse d'IL-10 par les cellules dendritiques, les CSMMO agissent indirectement sur l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T régulateurs. De manière directe, elles augmentent leur prolifération par la synthèse de l'isoforme immunorégulateur de L'HLA-G : l'HLA-G5 (97). Par la synthèse de certaines cytokines, elles vont diminuer la prolifération des autres lymphocytes comme nous l'avons indiqué ci-dessus. Les CSM vont notamment sécréter de l'oxyde nitrique (NO) et de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette dernière est sécrétée strictement par les CSM après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , va capter le tryptophane présent dans l'environnement et bloquer son utilisation par les lymphocytes autres que régulateurs (Figure 7).

Des observations récentes ont montré que cultivées en microsphères, les CSMMO avaient un pouvoir anti-inflammatoire supérieur par rapport à leur culture en monocouche. Ces observations sont issues d'expériences *in vivo*. En effet, en voulant traiter des infarctus de myocarde par injection intraveineuse de CSMMO, les chercheurs



essais de thérapie cellulaire et afin de traiter des défauts osseux de calvaria par des CSMMO, Shi a montré que l'administration d'aspirine modifie l'environnement en diminuant notamment la quantité d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  et participe ainsi à une amélioration de la régénération osseuse. Ces données montrent l'importance de l'environnement inflammatoire pour la réussite du traitement par thérapie cellulaire.

- Les CSM sont présentes dans la plupart des tissus adultes

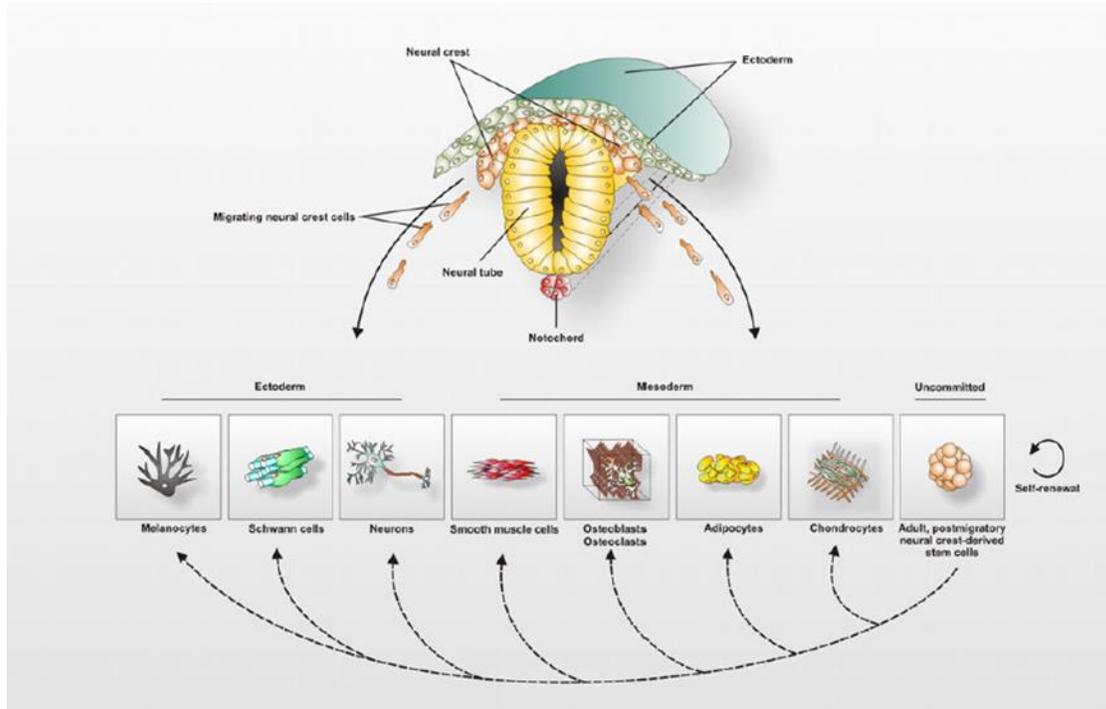
Si les CSM de moelle osseuse ont été les premières et les plus étudiées jusqu'à maintenant, il a été mis en évidence que la plupart des tissus adultes contiennent des précurseurs multipotents. Dans l'ensemble de ces tissus, un microenvironnement va maintenir un pool de cellules souches lesquelles auront cependant des spécificités relatives à leur tissu d'origine. Ainsi, des CSM ont été retrouvées, hormis dans la moelle osseuse, au niveau du tissu adipeux, de la peau, des muscles, du système nerveux, des membranes synoviales, etc...(101). Ces CSM sont organisées dans des niches qui régulent leur activité (101). Ces cellules ont la capacité d'adhérer aux boîtes de culture plastique, de s'autorenouveler, de présenter des marqueurs membranaires spécifiques (CD73, CD90, CD105), de se différencier dans les cellules de leurs tissus d'origine mais également dans des lignages différents (au minimum: adipocyte, ostéoblastes et chondrocytes) (101, 102). Par ailleurs, l'existence d'une niche périvasculaire semble commune à de nombreux tissus. En effet, des péricytes entourant l'endothélium des parois vasculaires présentant les marqueurs CD146, NG2, et PDGFR- $\beta$ , sont négatifs pour les marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux. Ces cellules ont été retrouvées dans de nombreux organes humains fœtaux et adultes, notamment au niveau du placenta, des muscles, des tissus graisseux, dans la moelle osseuse ou encore au niveau du pancréas. Cultivées *in vitro*, ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler et de garder leurs marqueurs spécifiques après de nombreux passages. Ils peuvent migrer sous l'effet de signaux chémo-attractant et peuvent être différenciés en myocytes, en ostéocytes, en adipocytes et en chondrocytes (103).

Toutes ces cellules sont issues du feuillet mésodermique. Néanmoins, des CSM dérivant d'un autre tissu embryonnaire, les crêtes neurales, ont été retrouvées à l'âge

adulte et notamment au niveau de certaines structures cranio-faciales. Nous allons désormais nous intéresser à ces cellules.

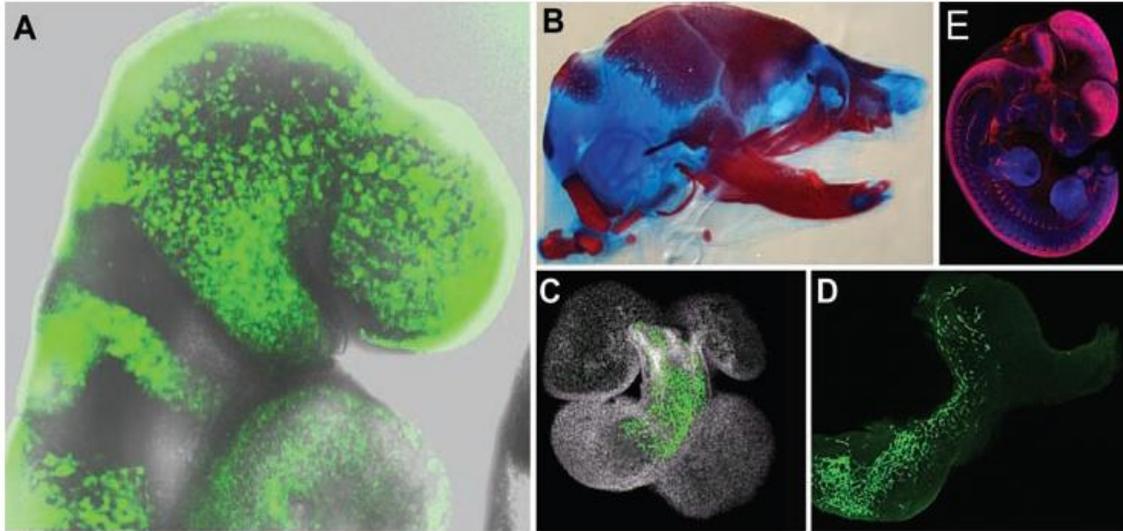
#### I.2.6. Cellules souches dérivées des crêtes neurales

Nous avons évoqué la transition «endothélio-hématopoïétique» dans l'ontogénie des cellules souches hématopoïétiques. Nous allons nous intéresser à un autre type de transition intervenant précocement dans l'embryon appelé transition «épithélio-mésenchymateuse» (TEM). Elle concerne un type particulier de cellules : les crêtes neurales. D'un point de vue phylogénétique, ces cellules apparaissent avec l'avènement des vertébrés. Alors que chez les invertébrés, de nombreuses cellules dérivent de précurseurs endomésodermiques, les crêtes neurales vont fournir de nombreux dérivatifs ectomésodermiques chez les vertébrés (104). Au stade embryonnaire, ces cellules se situent entre la plaque neurale et l'ectoderme non neural formant une sorte de « quatrième feuillet » primordial (105). Pendant la gastrulation, des signaux vont engager leur spécification. Elles expriment à ce stade des marqueurs spécifiques tels que Snail2 (Slug), SOX-9, SOX-10 ou encore FoxD3 et vont se maintenir à cette position pendant la formation et la fermeture du tube neural où elles gardent une position dorsale (106) (Figure 8). Par la suite, elles vont perdre leurs contacts avec les cellules ectodermiques les entourant. Ce processus est appelé délamination. Elles acquièrent alors un phénotype migratoire mésenchymateux au cours de la TEM.



**Figure 8. Devenir des crêtes neurales.** Les crêtes neurales sont issues de l'espace compris entre le tube neural et l'ectoderme. Elles vont migrer dans différents territoires embryonnaires et se différencier en de nombreux types cellulaires appartenant aux feuilletts ectodermique et mésodermique. (106)

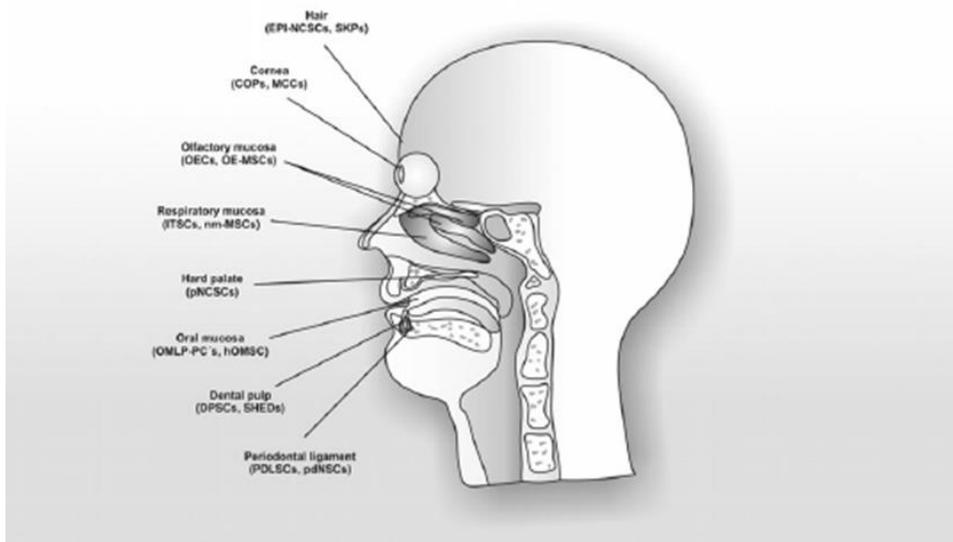
Selon leur localisation initiale, les CN vont coloniser différents territoires donnant des dérivatifs cellulaires spécifiques. On distingue ainsi plusieurs types de crêtes neurales en fonction de leur segmentation initiale affectant leur destination finale. Ce sont les crêtes neurales céphaliques (ou crêtes neurales crânielles CNC), les crêtes neurales tronculaires, les crêtes neurales cardiaques et les crêtes neurales vagues. Les premières vont donner la majorité des structures cranio-faciales notamment les os, le cartilage, les dents mais également les ganglions nerveux, les cellules musculaires, le tissu conjonctif et les mélanocytes. Les secondes vont donner naissance aux neurones périphériques et les cellules gliales participant ainsi au système nerveux périphérique. Elles vont également donner les cellules endocrines adrénomédullaires et les mélanocytes de la peau. Les troisièmes vont participer à la formation du cœur en produisant le septum aortico-pulmonaire et les coussins conotrunculaires. Enfin, les crêtes neurales vagues vont donner les ganglions entériques des intestins (107) (Figure 9).



**Figure 9. Structures dérivées des crêtes neurales chez la souris. (A) Les souris transgéniques marquées à la GFP pour le gène Pax-3 montrent la localisation des cellules dérivées des crêtes neurales au stade E8,5. (B) les crêtes neurales céphaliques fournissent une grande partie des éléments osseux (coloration Alizarin RED S) et cartilagineux (coloration au Bleu Alcian) du crâne et de la face. (C) Les crêtes neurales cardiaques contribuent notamment à la formation du septum aortico-pulmonaire du cœur. (D) Les crêtes neurales vagues donnent les ganglions entériques de l'intestin. (E) Les crêtes troncales donnent les neurones contribuant au système nerveux périphérique. (104)**

Le contingent des crêtes neurales céphaliques présente une pluripotence remarquable comme en témoigne la variété des tissus qu'elles génèrent. Elles vont donner des types cellulaires dérivés des feuillets ectodermique (neurones, cellules de Schwann, mélanocytes) et mésodermique (ostéoblastes, adipocytes,...). Cette pluripotence est retrouvée *in vitro* par l'étude de ces cellules à un niveau clonal (108). Ainsi, les clones montrent des potentiels de différenciation variables selon un modèle stochastique et hiérarchisé en fonction des variétés cellulaires capables d'être générées. A l'âge adulte, les crêtes neurales (post-migratoires) acquièrent un phénotype différencié : chondrocyte, ostéoblaste, fibroblastes,... Cependant, leur pluripotence alors éteinte semble pouvoir être réactivée. En effet, des études ont mis en évidence la présence de cellules souches (cellules souches dérivées des crêtes neurales, CSCN) à l'âge adulte pouvant être différenciées dans des dérivatifs appartenant aux feuillets ectodermique et mésodermique (109). Ces cellules peuvent recréer différents lignages cellulaires *in vivo*. Ainsi, il a été mis en évidence que les cellules souches du ligament parodontal avaient la capacité de

reformer *in vivo* les différents tissus nécessaires à la structure parodontale, à savoir le cément et le ligament parodontal (110). Par ailleurs, il a été montré que les cellules dérivées du follicule dentaire pouvaient intégrer la masse interne de l'embryon lorsqu'elles étaient injectées dans des blastocystes (111). Ainsi, des cellules souches ont été mises en évidence au niveau cranio-facial dans de nombreux sites : dans les follicules pileux de la peau du visage, dans plusieurs sites dentaires : la pulpe des dents temporaires et définitives ainsi qu'au niveau de leurs papilles apicales, et dans le ligament parodontal (Figure 10). Elles ont été retrouvées également au niveau des maxillaires et des follicules dentaires. Plusieurs propriétés les distinguent des CSM de moelle osseuse. Elles possèdent des marqueurs spécifiques, qui peuvent toutefois varier en fonction du type cellulaire, tel que la nestine, les facteurs de transcription Snail1, SOX10 ou encore Twist1 (106). Elles ont la capacité de former des neurosphères lorsqu'elles sont cultivées en suspension dans un milieu sans sérum, contenant du bFGF et de l'EGF. Par ailleurs, il a été montré que les cellules souches des papilles des follicules pileux de la face, appelées skin progenitor cells (SKP) avait la capacité de se différencier en neurones et cellules gliales *in vivo* (112, 113).



**Figure 10. Cellules souches adultes dérivées des crêtes neurales céphaliques décrites à ce jour. (106)**

### I.3. Objectifs de la thèse

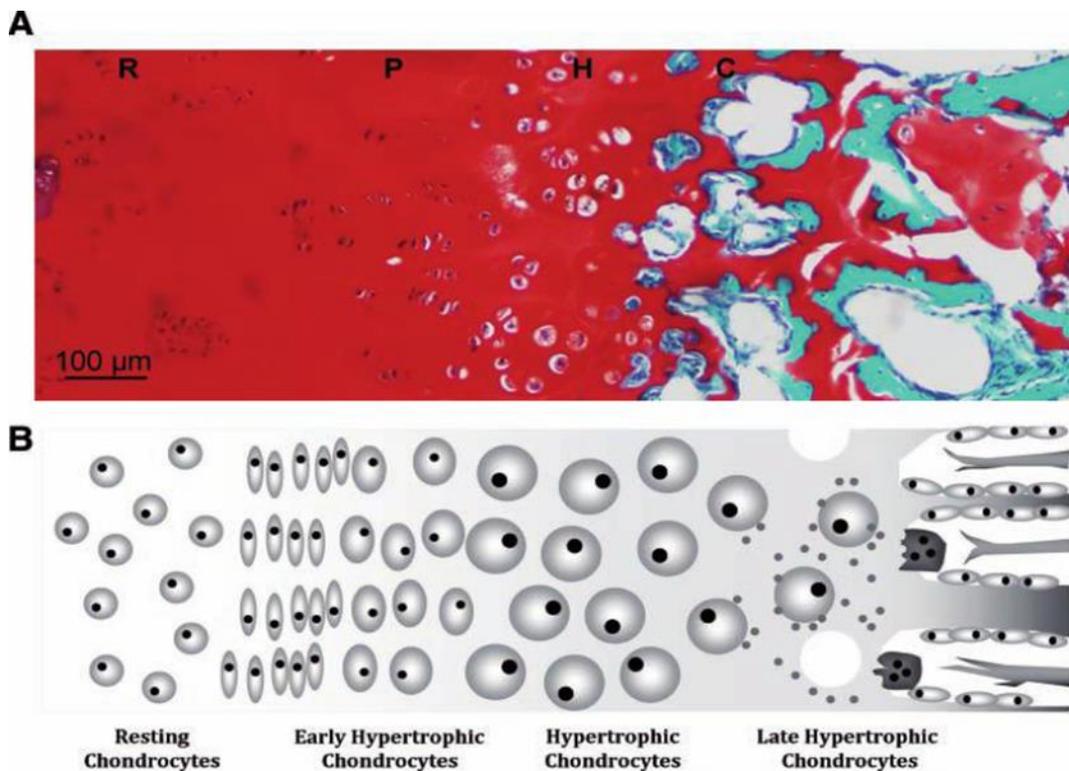
- Premier objectif : étude du potentiel « souche » des FG

Eu égard aux propriétés de cicatrisation de la gencive que lui confère le fibroblaste gingival, à ses origines et à la découverte de nombreuses cellules souches dans la sphère orale, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ce tissu contenait des cellules souches multipotentes. En effet, hormis les capacités du FG à remodeler son tissu conjonctif et permettre une cicatrisation *ad integrum*, cette cellule a été exploitée dans des modèles précliniques de thérapie cellulaire pour des applications extra-orales. Par exemple, des greffes de FG ont permis de favoriser la néo formation d'un épithélium trachéal au cours d'essais sur l'animal (114). Dans des modèles d'anévrismes créés chez le lapin, l'injection de FG dans les parois artérielles par voie endoluminale diminue la taille de l'anévrisme en restaurant le réseau élastique (115). La présence de cellules souches dérivées des crêtes neurales permettrait d'expliquer, en partie, ces capacités de cicatrisation et de réparation dans des tissus autres que gingivaux. Nous avons pour cela utilisé des prélèvements humains qui nous ont permis de mener à bien ces recherches.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la différenciation osseuse. D'un point de vue physiologique, deux types d'ossification interviennent au cours du développement. Le premier processus est appelé ossification de type intramembranaire. Dans ce cas, des cellules mésenchymateuses vont dans un premier temps se compacter puis se différencier en ostéoblastes et produire une matrice minéralisée. Les facteurs de transcription RUNX2 et Ostérix sont les gènes maîtres de cette voie de différenciation (116-118). Par ailleurs, certains gènes comme le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéopontine ou encore la phosphatase alcaline vont être fortement exprimés au cours de cette différenciation suivant une cinétique finement régulée. Ce processus d'ossification intervient de manière prépondérante au niveau des os du crâne et de la face ainsi qu'au niveau des zones périphériques des os longs (119).

L'autre mode d'ossification, de type endochondrale, intervient au niveau du reste des os du corps et fait intervenir différentes étapes. Dans un premier temps, les cellules mésenchymateuses se compactent avant de se différencier en chondrocytes. Lors de cette phase, certains gènes clés sont activés et notamment les gènes SOX9, SOX5 et SOX6

(120). Le gène SOX9 va être prépondérant au cours de cette phase, réprimant notamment l'expression du gène RUNX2 (121). D'autres gènes vont également être surexprimés tels que l'aggrécan (ACAN) ou le COL2A1 qui code pour le collagène de type II, spécifique de ce tissu. Ces chondrocytes vont continuer leur maturation en devenant pré-hypertrophiques puis hypertrophiques sous l'effet des conditions d'hypoxies auxquels ils sont soumis. Cette hypertrophie se caractérise par une augmentation du volume cellulaire. Au cours de cette phase, SOX9 est réprimé tandis que le facteur de différenciation RUNX2 est surexprimé. D'autres facteurs de transcription vont également être surexprimés, notamment l'Indian HedgeHog (IHH). Celui-ci régule la prolifération des chondrocytes, leur maturation en chondrocytes hypertrophiques et leur différenciation en ostéoblastes. Il est exprimé par les chondrocytes sortis de la phase proliférative et les chondrocytes hypertrophiques précoces. Il induit notamment la synthèse du récepteur à la PTHrP/PTH, qui va elle-même stimuler en retour l'expression de l'IHH, formant ainsi une boucle d'activation entre eux (122). A ce stade hypertrophique, les cellules vont sécréter différentes molécules remodelant la MEC. Le collagène de type II est remplacé par du collagène de type X. Des MMPs sont synthétisées ayant pour but de dégrader la matrice cartilagineuse. On retrouve notamment les MMP-9 et -13 (123, 124), cette dernière étant spécifique de ce tissu. Ces MMPs vont permettre de dégrader la matrice cartilagineuse et ainsi promouvoir son invasion par des vaisseaux nécessaires à la vascularisation des os. Le vascular endothelial growth factor (VEGF) est le facteur principal induisant ce processus. Son expression est induite par l'hypoxie. A ce stade, les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose laissant la place vacante aux ostéoblastes et aux précurseurs hématopoïétiques. Le tissu osseux est alors formé par la minéralisation de la matrice et la génération des lignées hématopoïétiques (122).



**Figure 11. Ossification par la voie endochondrale. (A) Coloration à la Safranine O d'un tibia en croissance. R représente les chondrocytes de réserve, P la zone de prolifération des chondrocytes, H la zone des chondrocytes hypertrophiques et C la zone de transformation de la matrice cartilagineuse en os. (B) Schéma des différentes étapes de la maturation chondrocytaire. (Gawlitta, Tiss. Eng. Part B. 2010)**

Dans l'hypothèse d'une multipotence avérée, nous avons voulu savoir si les fibroblastes gingivaux avaient la capacité de reproduire ces deux voies de différenciation. Emprunter la voie endochondrale permettrait par ailleurs de tester la différenciation cartilagineuse, celle-ci constituant une étape de cette voie d'ossification.

- Second objectif : utilisation du FG comme outil de diagnostic moléculaire

Un second objectif, de moindre ampleur, a consisté à évaluer la possibilité du FG à être utilisé comme outil de diagnostic pour des pathologies rares. Pour cela nous avons réalisé, dans le cadre d'une étude clinique sur les manifestations orales de la maladie d'Ehlers-Danlos de type vasculaire, plusieurs biopsies gingivales afin d'établir un

diagnostic moléculaire. Cette maladie est causée par la mutation du collagène de type III et se caractérise, comme son nom l'indique, par des atteintes des vaisseaux sous forme de dissections aortiques, d'anévrisme ou encore de fistules carotido-caverneuses (125). D'autres atteintes majeures sont fréquentes et correspondent à des perforations intestinales, des atteintes utérines et des complications hémorragiques lors de l'accouchement.

Le diagnostic de cette maladie repose sur des critères cliniques et moléculaires. Selon la classification de Villefranche (126), plusieurs critères majeurs (atteintes vasculaires, atteintes intestinales, finesse de la peau, faciès caractéristique,...) et mineurs (acrogérie, hyperlaxité des petites articulations, rétractions gingivales,...) doivent orienter le diagnostic, lequel doit être confirmé par une analyse moléculaire. Cette dernière est réalisée en première intention sur de l'ADN génomique (ADNg) isolé à partir d'une prise de sang. Un électrophorégramme est pratiqué permettant un séquençage du gène. Cependant, certaines mutations ne peuvent être détectées ou expliquer les modifications protéiques par l'ADNg et nécessitent une analyse des ARN messagers (ARNm). Dans ce cas, les biopsies cutanées sont entreprises afin d'en isoler les fibroblastes et de les amplifier pour en extraire leurs ARNm. Certaines mutations conduisant par exemple à des sauts d'exons peuvent ainsi être détectées.

Utiliser le fibroblaste gingival comme outil de diagnostic plutôt que les fibroblastes dermiques offrirait plusieurs avantages. Le prélèvement est simple, sans laisser de cicatrice et pourrait se réaliser au cours d'une consultation d'évaluation orale (critère de diagnostic mineur). Par ailleurs, les fibroblastes gingivaux prolifèrent plus vite et sur un plus grand nombre de passages permettant un diagnostic moléculaire de seconde intention plus simple et plus rapide.

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **II.1. Culture cellulaire**

#### **II.1.1. Culture primaire**

Les fibroblastes gingivaux sont amplifiés à partir de déchets opératoires de gencives provenant d'extractions dentaires ou de désinclusions auprès de patients ayant donné leurs accords et ne présentant aucune pathologie parodontale. Les explants proviennent soit de la gencive vestibulaire marginale et des papilles, soit du palais. Deux méthodes sont possibles pour recueillir les fibroblastes. Soit les explants sont cultivés dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> après avoir été découpés en morceaux de 1 à 2 mm<sup>3</sup> et déposés côté conjonctif. Dans ce cas-là, les cellules vont migrer hors de l'explant et coloniser la boîte de Pétri. Soit les biopsies sont digérées par une solution de collagénase de type 2 à 2 mg/mL pendant 3-6 heures en fonction de l'épaisseur de la biopsie à 4°C sur orbiteur. Les biopsies sont préalablement dilacérées au bistouri. Dans les deux cas, le milieu utilisé est du DMEM « low glucose » avec glutamax, du Sérum de Veau Foetal (SVF) à 20%, de la pénicilline 100 U/ml, de la streptomycine à 100 µg/ml, de l'amphotéricine B à 0,25 µg/ml (GIBCO®) et de l'acide ascorbique-2 phosphate à 50 µg/mL. Le milieu est remplacé deux fois par semaine jusqu'à confluence (environ 3 semaines).

#### **II.1.2. Culture secondaire**

Une fois à confluence, les cellules sont trypsinisées (Trypsine EDTA, GIBCO®, 1,5 ml à 0,05%) etensemencées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> contenant du milieu DMEM avec SVF 10%, de la pénicilline 100 U/ml, streptomycine à 100 µg/ml, de l'amphotéricine B à 0,25 µg/ml. Chaque passage correspond à environ une semaine de culture. Les cellules sont trypsinisées lorsqu'elles atteignent 80% à 90% de confluence dans la boîte de façon à rester dans la phase exponentielle de croissance.

### II.1.3. Génération des cellules souches gingivales (CSG)

Les CSG sont sélectionnées à partir de fibroblastes gingivaux au cours des passages précoces (passages 1 à 3). La sélection se fait par technique de dilution limite. Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre à une concentration limite (<50 cellules/cm<sup>2</sup>). Le milieu DMEM 10% de SVF est enrichi en vitamine C (0,05mg/ml). Les CSG peuvent également être directement sélectionnées après digestion du tissu en ensemençant directement les cellules à très basse densité (<50 cellules/cm<sup>2</sup>).

### II.1.4. Protocole d'adhésion

Utilisation de deux souches de CSG avec chaque souche répartie dans des plaques de 6 puits. Ensemencement de chaque puits avec 100 000 cellules dans du milieu de culture DMEM, SVF 10% et acide ascorbique (50µg/mL). Les résultats sont comparés avec les données concernant les FG. Après avoir éliminé le milieu contenant les cellules n'ayant pas adhérees, les cellules adhérentes dans les puits sont comptées. Le comptage intervient à 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures après ensemencement.

### II.1.5. Protocole de prolifération

Pour les expériences de prolifération, du milieu DMEM, SVF 10% et acide ascorbique (50µg/mL) est employé. 3 souches de CSG sont utilisées avec chaque souche répartie dans des flasques. Dans chaque flasque, 100 000 cellules sont ensemencées. La prolifération est évaluée sur trois semaines par comptage sur lame de Malassez.

## **II.2. Protocoles de différenciation cellulaires**

Les protocoles de différenciation sont basés sur ceux employés pour les cellules souches de moelle osseuse (93).

### II.2.1. Différenciation adipocytaire

Après isolation des CSG, les cellules sont amenées à confluence. Une fois celle-ci atteinte, le milieu de culture est remplacé par du milieu de différenciation adipocytaire pendant une durée de 3 à 5 semaines. Ce milieu contient du DMEM 10% de SVF, de l'isobutylmethylxanthine (0,5 mM), de la dexaméthasone (100 nM) et de l'indométhacine (50 µM). Le milieu est renouvelé 2 à 3 fois par semaine. A la fin de leur différenciation, les cellules ont été utilisées pour l'analyse histologique, protéique (Western Blot) et nucléique (RT-PCR).

### II.2.2. Différenciation ostéocytaire

Pour la différenciation ostéocytaire, les CSG sont amenées à confluence puis le milieu de culture est enrichi en  $\beta$ -glycérophosphate (10 mM), dexaméthasone (100 nM) et en vitamine D3. Les cellules sont cultivées ainsi pendant 3 à 5 semaines. A la fin de leur différenciation, les cellules ont été utilisées pour analyse histologique (coloration alizarin red S, activité de la phosphatase alcaline), protéique (Western Blot) et nucléique (RT-PCR).

Pour les expériences réalisées avec les souches palatines (n=3), plusieurs temps d'arrêts ont été réalisés aux jours 0, 4, 7, 14 et 21 pour analyse de leur expression génétique par PCR quantitative.

### II.2.3. Différenciation chondro/endochondrale

Pour la différenciation chondro/endochondrale, nous nous sommes inspirés du protocole utilisé pour les CSMMO (127, 128). Les CSG sont amenées à confluence puis décollées. Pour former les micromasses, 500 000 cellules ont été centrifugées à 500G pendant 5 min dans des tubes de polypropylène (Falcon®). Deux milieux de différenciation ont été utilisés successivement pour reproduire cette voie de différenciation. Le premier stimulant la chondrodiffférenciation pendant 3 semaines, le second pendant deux semaines stimulant la différenciation endochondrale. Le milieu de différenciation chondrogénique contient du DMEM sans sérum, du D-glucose (4g/L), du Pyruvate 1X, de la dexaméthasone (100nM), un mélange d'insuline transferrine acide sélénieux (ITS) 1X, de l'acide linoléique, du TGF- $\beta_3$  (10ng/mL), de l'acide ascorbique

(25µ/mL) et de la L-proline (40 µg/mL). Une partie des micromasses a été arrêtée au jour 14 pour analyse par PCR et histologie, une autre partie a été arrêtée au jour 21. Le reste des sphères ont été cultivées pendant deux semaines supplémentaires avec du milieu de différenciation endochondrale. Ce milieu crée des conditions d'hypoxie et contient les mêmes éléments que le milieu précédent auquel on soustrait le TGF-β<sub>3</sub>, on divise la concentration en dexaméthasone par 100 (1nM) et auquel on ajoute de la L-thyroxine (50nM) et du β-glycérophosphate (20 mM). Deux temps d'arrêt ont été réalisés pour cette différenciation : un après une semaine dans le nouveau milieu (soit après 28 jours de différenciation au total) pour analyse génétique par PCR et un autre au jour 35 pour l'analyse histologique.

#### II.2.4. Cultures en neurosphères

La culture en neurosphère nécessite des boîtes de cultures bactériologiques car ces dernières permettent aux cellules d'être cultivées en suspension. Les cellules sont déposées en goutte, chaque goutte contenant 25 000 cellules. Plusieurs milieux de différenciations ont été testés (cf. tableau infra) afin d'évaluer le plus efficace pour la formation des neurosphères. Un score arbitraire (compris entre 0 et 4) a été réalisé prenant en compte le nombre et la forme des neurosphères.

<b>Nom du milieu</b>	<b>Composition</b>
<b>NS1</b>	<b>Neurobasal + Glutamine + N2+ bFGF</b>
<b>NS2</b>	<b>DMEM/F12 + bFGF+EGF</b>
<b>NS3</b>	<b>DMEM/F12 + Glutamine + bFGF + EGF + Insulin + Transferrine</b>
<b>NS4</b>	<b>DMEM/F12+B27+bFGF+EGF</b>
<b>NP1</b>	<b>NPMM (Lonza)</b>
<b>NP2</b>	<b>NPDM (Lonza)</b>

### II.3. Analyses protéiques

#### II.3.1. Zymogrammes

Parallèlement aux études de proliférations, nous avons mis en cultures des CSG et FG dans les mêmes conditions que précédemment afin d'évaluer les sécrétions de MMPs dans les surnageant. Vingt-quatre heures avant chaque temps d'arrêt, le milieu de prolifération a été remplacé par du DMEM 0%. Les échantillons (20µl pour les

zymogrammes de gélatine, de collagène et de caséine) ont été dilués de moitié dans du Tris 1 M pH 6,8 contenant 50 % de glycérol, 2,5% SDS et 0,4 % de Bleu de Bromophénol, puis soumis à électrophorèse dans des gels de polyacrylamide-SDS contenant 10 mg/ml de gélatine ou de collagène ou 10 mg/ml de  $\alpha$ -caséine dérivée de peau porcine (Sigma Chemical) 1 h. Cette technique très sensible permet de détecter l'activité enzymatique des enzymes actives mais aussi des pro-enzymes (formes latentes). Le SDS active en effet les pro-enzymes *in situ* dans le gel, en démasquant leur site actif sans clivage de leur partie N-terminale, il linéarise également les protéines permettant une migration qui ne dépend que du poids moléculaire.

Gel de concentration:

H2O distillée	5,7 ml
TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 % (p/v)	100 $\mu$ l
Acrylamide/bis 30%	1,7 ml
Dégazer 15 mn à température ambiante	
Persulfate de sodium à 10 % (p/v)	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
Volume final	10 ml

Gel de séparation à 10 %

H2O distillée contenant 10 mg de gélatine de type I solubilisée à 50°C	4.05 ml
TRIS-HCl 1,5 M pH 7,4	2,5 ml
SDS 10 % (p/v)	100 $\mu$ l
Acrylamide/bis 30%	3,3 ml
Dégazer 15 mn à température ambiante	
Persulfate de sodium à 10% (p/v)	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
Volume final	10 ml

Tampon d'échantillon :

Le tampon d'échantillon non réducteur est ajouté selon le rapport 150 $\mu$ l de surnageant pour 100 $\mu$ l de Tampon Non Réducteur (TNR) dans chaque échantillon. Le mélange tampon d'échantillon/surnageant est ensuite déposé dans les puits des différents gels. La quantité de mélange déposé dans chaque puits est de 70 $\mu$ l. La composition du tampon est la suivante : 2 ml de TRIS-HCl 1 M pH 6,8 - 2 ml de SDS à 10% - 2 ml de

glycérol à 0,5% - 2 ml de bleu de bromophénol à 0,5%. Chaque échantillon est équilibré après quantification des protéines.

#### Tampon de migration :

La migration s'effectue dans un tampon Laemmli (14,4 g de Glycine - 3 g de TRIS - 1 g de SDS - QSP 1 litre d'eau distillée) à +4°C à 80 volts dans le gel de concentration puis 180 volts dans le gel de séparation.

#### Tampon de lavage :

Après migration, le gel est incubé dans du TRITON 100X à 2,5%, 2 fois 30 minutes à température ambiante afin d'éliminer le SDS contenu dans le gel et de permettre aux enzymes de récupérer leurs conformations originales et ainsi de pouvoir être actives.

#### Tampon d'incubation :

Les gels après lavage sont incubés à 37°C 48 heures pour les gels de gélatine dans du tampon compatible avec l'activité des MMP (TRIS-HCl 0,1 M - CaCl<sub>2</sub> 10 mM - 100 ml par gel à pH 7,4).

#### Coloration :

Les gels sont colorés par une solution contenant du bleu de Coomassie R 250 (gel de caséine ou de gélatine) ou G 250 (gel de collagène) pendant 30 minutes. (Bleu de Coomassie 0,5% - acide acétique 10% - propan-2-ol 30% - eau distillée 69,5 %)

#### Décoloration :

Les gels sont décolorés dans un mélange : méthanol 40% - acide acétique 10% - eau distillée 50%. Pour des raisons de sécurité, le méthanol a été remplacé par l'éthanol avec des résultats comparables. La décoloration s'arrête quand le gel de condensation est totalement décoloré. Le substrat (gélatine, collagène ou caséine) contenu dans le gel de séparation est ainsi coloré en bleu, sauf au niveau des activités protéolytiques dirigées contre le substrat (bandes blanches de lyse).

Standard coloré :

Sur chaque gel, un marqueur de poids moléculaire (RAINBOW, AMERSHAM, réf: RPN 756) est déposé afin de préciser les poids moléculaires des enzymes sécrétées.

### **II.3.2. Western blot**

Pour confirmer la différenciation cellulaire, nous avons voulu mettre en évidence des marqueurs protéiques classiquement utilisés. Après extraction protéique des cellules (Cell Lytic LT Sigma Aldrich), des Western Blot ont été réalisés pour détecter la sécrétion de LipoProtéine Lipase (LPL) et de Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR $\gamma$ ) par les CSG différenciées en adipocyte ; la sécrétion de l'ostéocalcine (OSC) par les CSG différenciées en ostéocytes ; et la sécrétion de collagène II par les CSG différenciées en chondrocytes.

Les électrophorèses ont été réalisées en utilisant un Mini Protean II System (Biorad). Les gels de polyacrylamide à 10% (10 cm de hauteur, 1 mm d'épaisseur, Duracryl de Millipore) contenaient une solution tamponnée consistant en un gel de 2,5 mL 1,5 M tris-HCl pH 8,8 ; 100  $\mu$ l SDS 10 %, 4 ml de polyacrylamide (34%) et 4 ml d'eau distillée pH 8.8, le stacking gel contenait 4 % de polyacrylamide dans 0,125 M Tris, pH 6.8. Les gels ont été polymérisés en ajoutant 50  $\mu$ l d'ammonium persulfate à 10 % et 10  $\mu$ l de TEMED à 0,1 %. Les échantillons ont été dilués de moitié dans du Tris 1 M pH 6,8 contenant 50 % de glycérol et 0,4 % de Bleu de Bromophénol, puis soumis à électrophorèse dans les conditions de Laemmli (40 mA, 1 heure). Les gels ont ensuite été transférés (25V à 4°C) sur des membranes difluorides de polyvinyle (Immobilon Millipore) avec un tampon de transfert contenant 10% de méthanol, du TRIS 25 mM, de la glycine 192 mM. Les membranes ont été séchées à l'air sec à 22°C pendant 1 h et traitées avec 1 % de solution bloquante (BS, Boehringer) pendant 1 h à 22°C sous mélange constant. Les filtres ont été alors traités avec des anticorps monoclonaux, anti-LPL (Abcam, ab21356) et anti-PPAR $\gamma$  (Abcam, ab19481) pour les adipocytes, anti-OSC (Abcam, ab13418) pour ostéocytes, et anti-collagen II (Sigma Aldrich, WH1280M1) pour les chondrocytes. L'incubation est réalisée avec une dilution au 1/500 dans une solution bloquante durant toute la nuit à 22°C. Les membranes ont été lavées à 4 reprises pendant 15 min avec 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 (v/v) pH 7.5

(TBS/Tween) et incubées avec un second anticorps marqué à la peroxydase dilués 1/200 (v/v) pH 7,5 dans de la solution bloquante. Elles ont alors été lavées avec du TBS-Tween, traitées avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diacylhydrazide (Boehringer) pendant 1 min et révélées en utilisant un film Kodak Biomax MR. De multiples expositions ont été examinées pour s'assurer que les résultats analysés réfléchissaient ceux produits dans le champ linéaire du film.

### II.3.3. Analyses par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet l'étude des cellules unitaires entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont alignées les unes derrière les autres et défilent devant un laser (argon, krypton) ou une lampe (mercure) permettant une caractérisation phénotypique des cellules. De nombreuses données peuvent ainsi être fournies par la cytométrie en flux. Sur le plan phénotypique, par les effets de la diffusion lumineuse, la taille (FCS), la granulométrie (SSC) et la fluorescence des cellules peuvent être mesurées. Par l'intermédiaire d'anticorps couplés directement ou secondairement à un fluorochrome, des analyses de marqueurs membranaires ou intracellulaires peuvent être étudiés (dans ce dernier cas après fixation, les cellules sont perméabilisées pour que l'anticorps pénètre la cellule). On peut ainsi, grâce à la fonction de tri du cytomètre, collecter des cellules cibles présentant des marqueurs spécifiques et les cultiver par la suite.

Pour nos expériences de caractérisation des marqueurs membranaires, nous avons utilisé plusieurs anticorps (avec le fluorochrome associé) dont voici la liste : CD29 FITC, CD34 FITC, CD44 PE, CD45 FITC, HLA-DR FITC, CD73 PE, CD90 PC5, CD105 PE, CD117 PE, CD146 PE, CD200 PE, CD271 PE et STRO-1 APC (Beckman Coulter et Abcam).

### II.4. Analyse des ARNm

La PCR (Polymerase chain reaction) fut inventée par K. Mullis en 1983 (129). Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer un très grand nombre d'exemplaires de brins d'ADN à partir d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt).

#### II.4.1. Extraction des ARNm

L'ARN total a été récupéré en utilisant les kits MACS molecular® et Aurun total mRNA extraction (Biorad®) suivant le protocole du constructeur. Dans les deux cas, les protocoles diffèrent peu et reposent sur les mêmes principes. Cette étape vise à séparer le total des ARNm de la cellule des autres molécules. Dans un premier temps, les cellules ont été dissoutes avec un tampon de lyse et un gratte-cellule (FALCON®) à même la boîte de culture ou alors trypsinisées et centrifugées avant d'être dissoutes par le tampon. Le tampon de lyse contient notamment des détergents qui vont perméabiliser les membranes cellulaires (triton, NP-40) et des agents chélateurs (EDTA, EGTA) qui vont inhiber l'activité des nucléases. L'ajout de bêta-mercaptoethanol permet de dissocier les ARNm des protéines par rupture des ponts cystéine. Le thiocyanate de guanidine, va agir en tant que puissant agent dénaturant des protéines empêchant ainsi l'activité des ARNases. La solution est alors mélangée (1:1) avec de l'éthanol 70° afin de faire précipiter les ARNm. Le lysat est filtré par une centrifugation supérieure à 11 000G et l'ARN est retenu dans des colonnes magnétiques par les oligo dT (MACS®) se liant aux queues polyA des ARNm ou sur des membranes de silices pour les colonnes Biorad® (on retient alors tous les ARN cellulaires). Différents lavages sont utilisés pour éliminer un maximum d'impuretés tel que les débris cellulaires, les protéines... Afin de dégrader de manière plus spécifique l'ADN résiduel et ainsi empêcher qu'il ne soit amplifié de manière involontaire lors de la PCR, une solution de DNase I est appliquée. Enfin, l'ARNm est récupéré grâce à un tampon d'élution et conservé à -80°C.

#### II.4.2. Quantification des ARNm

Les ARNm sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop®), permettant l'équilibration des échantillons entre eux. La pureté de l'échantillon est évalué grâce au ratio des longueurs d'onde 280/260 nm. Un échantillon dépourvu de protéine correspond à un ratio de 2, ici nous n'avons utilisé que les échantillons dont le rapport est supérieur à 1,85. Les ARNm extraits par oligodT ne peuvent être mesurés ce qui nous a fait renoncer à cette technique.

### II.4.3. Retro-transcription

Une fois équilibrée, la quantité d'ARNm entre les échantillons, l'étape suivante consiste à rétro-transcrire l'ARNm en ADNc. Cette étape est réalisée avec le kit i-script de Biorad®. Le volume final est de 20 µl et comprend 4 µl de mix (correspondant aux bases et aux coenzymes nécessaires à la rétro-transcription), 1 µl rétro-transcriptase et des quantités variables d'eau ARNase free et d'ARNm qui dépendent de la concentration de ce dernier. Idéalement, on recherche une quantité finale d'ADNc de 1µg pour diluer à une concentration de 5 ng/µL. Les étapes de la retro transcription correspondent à :

- 1- 5 minutes à 25°C au cours desquelles la rétro-transcriptase est activée
- 2- 30-45 minutes à 42°C au cours desquelles la rétro-transcriptase synthétise l'ADNc
- 3- 5 minutes à 85°C au cours desquelles les brins d'ARNm et d'ADNc sont séparés et la rétro-transcriptase inactivée.
- 4- 5 minutes à 4°C correspondant à la fin de la rétro-transcription

### II.4.4. PCR quantitative

La PCR quantitative permet de déterminer le taux d'ADN ou d'ARN dans un échantillon biologique. La méthode repose sur la détection d'un signal fluorescent qui est produit de façon proportionnelle à l'amplification de la PCR. Elle nécessite un thermocycleur couplé à un système de lecture optique qui mesure l'émission de fluorescence. Le thermocycleur est conçu de telle sorte que chaque échantillon soit lu par une fibre optique. L'agent de fluorescence est le Sybr green. Ce dernier possède la propriété de fluorescer lorsqu'il est intercalé entre deux brins d'ADN. Ainsi sa quantité de fluorescence sera proportionnelle au nombre de copie d'ADN synthétisées lors de la PCR et donc à l'ADNc initialement présent. La détection de fluorescence du Sybr green est donc non spécifique de l'ADN amplifié contrairement à d'autres systèmes de fluorescences utilisant des sondes Taqman par exemple.

#### II.4.5. Préparation des amorces

Les amorces (primers) sont préparées par paires avec une séquence sens et une séquence antisens. Les deux séquences vont ainsi flanquer le gène d'intérêt. Ces séquences doivent donc être spécifiques du gène à amplifier. Des outils informatiques (nBLAST) permettent de s'assurer de la spécificité des amorces produites. Chaque séquence est constituée d'une vingtaine de bases dont 40 à 60% de nucléotides GC. En effet, les groupements C-G présentent trois liaisons non covalentes contre deux pour les groupements A-T, ce qui rend l'hybridation plus difficile donc plus spécifique. La composition des amorces selon leurs bases va déterminer leur température de fusion ( $T_m$ ) avec l'ADN complémentaire. Cette température doit être proche entre les deux séquences sens et anti sens (différence de  $T_m < 3$  degrés Celsius). Plusieurs formules permettent de prévoir les températures de fusion :

-Méthode de Wallace :

$$T_m = 4 \times (nG + mC) + 2 \times (pA + qT)$$

-Règle tenant compte de la longueur des amorces (L) et les sels monovalents (M) :

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times \text{Log}([M+]) + 0,41 \cdot (\%GC) - 675 / L$$

Les amorces ne doivent pas s'auto hybrider (self-dimer) ni s'hybrider entre elles (dimer), ni former des structures en épingles à cheveux (hairpin). Ces structures peuvent être anticipées par évaluation de l'enthalpie libre des amorces qui dépendront des séquences nucléotidiques principalement, mais également des conditions de la réalisation de la PCR (concentration en ions calcium et magnésium, température des cycles,...). Il faut donc une enthalpie positive lorsque le design des amorces le permet. Ces structures indésirables peuvent être déterminées par des logiciels informatiques (mFold®) puis éliminées.

- Liste des primers utilisés pour les expériences de différenciation

<b>Genes symbols</b>	<b>Primers sequences (5'&gt;3')</b>	<b>Amplicons size (bp)</b>	<b>Accession number</b>
<i>ACAN</i>	F: ACTCTGGGTTTTTCGTGACTCT R: ACACTCAGCGAGTTGTCATGG	81	NM_013227
<i>ALPL</i>	F: CGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT R: GATTTCCCAGCGTCTTGCC	239	NM_000478.4

<i>COL1A1</i>	F: AACCAAGGCTGCAACCTGGA R: GGCTGAGTAGGGTACACGCAGG	80	NM_000088
<i>COL2A1</i>	F: AGACTTGCGTCTACCCCAATC R: GCAGGCGTAGGAAGGTCATC	180	NM_001844
<i>COL10A1</i>	F: CATAAAAGGCCCACTACCCAAC R: ACCTTGCTCTCCTCTTACTGC	91	NM_000493
<i>GAPDH</i>	F: CTTTGTCAAGCTCATTTCTGGTA R: GGCCATGAGGTCCACCA	70	NM_002046
<i>HPRT1</i>	F:TGTTGGATTTGAAATTCCAGACAAG R: CTTTTCCAGTTTACTAATGACACAA	104	NM_000194.2
<i>IHH</i>	F: CCTCAGTTGATGCTGCTAAATTC R: AACAGTCTCTGGATGTGTCTTG	164	NM_002181.3
<i>MMP-13</i>	F: CAGGAATTGGTGATAAAGTAGAT R: CTGTATTCAAACGTATGGGTC	85	NM_002427
<i>MSX2</i>	F: GCACCCTGAGGAAACACAAGA R: CGAGGAGCTGGGATGTGGTA	67	NM_002449
<i>RUNX2</i>	F: AACCCACGAATGCACTATCCA R: CGGACATACCGAGGGACATG	75	NM_001024630
<i>SOX9</i>	F: AGCGAACGCACATCAAGAC R: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG	85	NM_000346.3
<i>SNAIL1</i>	F: TCGGAAGCCTAACTACAGCGA R: AGATGAGCATTGGCAGCGAG	140	NM_005985
<i>SP7</i>	F: ACTCACACCCGGGAGAAGAA R: GGTGGTCGCTTCGGGTAAG	67	NM_152860
<i>TWIST1</i>	F: TGCAGCTATGTGGCTCACGA R: CCCACGCCCTGTTTCTTTGA	366	NM_000474.3

- Liste des primers utilisés pour les diagnostics moléculaires

- Séquençage direct de l'ADNc du *COL3A1* :

Amplicon	Primer F 5'>3'	Primer R 5'>3'	Length (bp)	Annealing T (°C)
1	GGCAGGGAACAACCTTGATGGT	GGCATGATTCACAGATTCCAGG	518	62°C
2	GGAGAATGTTGTGCAGTTTGCC	TCCATCGAAGCCTCTGTGTCC	566	62°C
3	ACCTCCAGGTATCAAAGGTCC	GCCTTTACCACCAGGACTACC	451	62°C
4	GGACAAAGAGGAGAACCTGGA	CTGGTCGACCACTTCTCCTT	595	62°C
5	GGTCTGCTGGAGAGCGTGG	CCAGGGCCACCTCGTTCTCC	289	62°C
6	GACCAGGAAGTGATGGGAAAC	CTCCTCTTTCTCCAGGCATTC	569	62°C
7	TGTGGACCTCCTGGATTGGCA	ATCCTTGCTGGAGAACCGCT	598	62°C
8	AAAGGTGAACGTGGCAGTCCT	ACCAGGAGAGCCATTTTACC	544	62°C

9	GCTGGTGAACCTGGAAGAGAT	GAGCCCTCAGATCCTCTTTCA	511	62°C
10	CAAAGATGGAACCAGTGGACA	AAGTTCAGGATTGCCGTAGCT	589	62°C
11	AACATGCATAAGTGCCAATCC	GTCACCTGCACTGGTTGACAA	589	62°C

- Séquençage direct de l'ADNg du *COL3A1*

Location	Primer F	Primer R	Length (bp)	Annealing T (°C)
exon 1	5'-AAGTGAGGGAAGCCAAACTT-3'	5'-CAGTTC AACGTTTCACAATC-3'	391	53
exons 2-3	5'-GTTAATAGTCCTAACAGAGTAAC-3'	5'-TCTGTTGTTTGGTGCCATTA-3'	705	53
exon 4	5'-ATGATTGTGAATCACCAGGA-3'	5'-GAGAACAGATACAAAGAACTC-3'	280	53
exon 5	5'-CTATTTGTCTCCTTGCCACA-3'	5'-CTTTTCCAACCTTAGTAGGG-3'	240	53
exons 6-7	5'-GTCATTGCTTTGAAGCATGG-3'	5'-AGAAAACAAAGGTAGGTTC-3'	704	53
exon 8	5'-GTAAGTTGATATAATAGAGG-3'	5'-TGAGTCTTCTCCGCAGTCA-3'	472	50
exons 9-10	5'-TACATGAGCACCTACGTATT-3'	5'-GTTAGGCAAGTAAACATAGC-3'	364	50
exon 11	5'-CAGTATGAAATATCTTCAAC-3'	5'-ATATCTGAATTGGTTACCAT-3'	369	50
exons 12-13	5'-CCTCTTTTGTA AAAATAGTAAC-3'	5'-ATTTCTTTTAACTATAGCC-3'	438	50
exon 14	5'-CAACTCACTTGAGTCAGAATT-3'	5'-TGGTCAACAGAGATGCTAAT-3'	286	53
exon 15	5'-ATGTGCTCACTTATTTACTAG-3'	5'-GAATAGGGCTTTAAAGACAT-3'	270	53
exon 16	5'-GCTAAGTGAGTAGAAGTGGT-3'	5'-AGCCATATTGAAGCACATGC-3'	254	53
exons 17-18	5'-CGAACTATTTGCATTACTAT-3'	5'-TGATGGAATTA AACTATAACC-3'	399	50
exons 19-21	5'-CGAATCCTCCCTGTGTTTCA-3'	5'-CCCATTTGTGGTGCTAGCATT-3'	651	53
exons 19-21i	5'-TTCAGGGTGAGGCTGGTATT-3'	5'-TAACCAGATCTGTTGCAGTA-3'		
exon 22	5'-GTTCAAATGACGTCCTCTCT-3'	5'-TGCCTTGCCCTTCTTCTGTC-3'	253	50
exons 23-24	5'-ACCTAACAACTGACTTCTTT-3'	5'-TTTGACCATTTCTTACTCC-3'	481	50
exons 23-24i	5'-CATACTATATATATAGCATGC-3'	5'-TCAAGGATAGGCCAACAT-3'		
exons 25-27	5'-GTTATTGCCCTTTGAGGATT-3'	5'-TGACAGTCAGATATGCCGTG-3'	679	50
exons 28-29	5'-CTATAAGCCATGTTTGAGGT-3'	5'-ATTGCTCTATAACCTGCTGA-3'	553	53

exons 30-31	5'-AACCAGACTAAGTATCCAAG-3'	5'-TGTTGCTTTAGGAATCCATCT-3'	565	53
exon 32	5'-GGCTGATTTTCACTGAAGAT-3'	5'-GACTGTCCCATATGACATAT-3'	166	53
exons 33-34	5'-GAGTTATCCCCAAAGAGGCT-3'	5'-GCTACTGTCTGTATGGGGTT-3'	450	50
exon 35	5'-CTCTGCACATTTCTGCTTA-3'	5'-CCTATAGGGAATGAGCAGCT-3'	290	50
exon 36	5'-TCAACTCCTTCCATCTGAAG-3'	5'-CCATTAGAACACTTAGGACT-3'	335	53
exons 37-38	5'-TCTCAGCACCAGCAATCTAA-3'	5'-GCTCTTTCTGAAGTGATGA-3'	552	53
exons 39-40	5'-GAGAACTTACACATTGCTAC-3'	5'-GTGATCTCTGAAGGCTACCA-3'	565	53
exon 41	5'-TTCCCATAGCAGGCATAGTT-3'	5'-AAGAAGTTTGCTATGTGGCC-3'	370	53
exons 42-43	5'-AATTATATTGCCCTGCTGAG-3'	5'-GAAGGAAATAGACAAACAAG-3'	380	53
exon 44	5'-CTTCCAATAATTGCATGCATAC-3'	5'-TCCTACACTGTAGAATGAGT-3'	247	53
exons 45-47	5'-TGGGGGATTTTTTAGCTGAT-3'	5'-AGTGGATGCATTGCGTCTCT-3'	869	50
exon 48	5'-CTTGGACTAGCAATGTATTCTT-3'	5'-CCCATTCTAATCTAAGCAGC-3'	441	53
exon 49	5'-GCAGACACATTAGCAGTCAA-3'	5'-GCATGCCATCACTTCAGTA-3'	434	53
exon 50	5'-ACACATACTACATGAATCCC-3'	5'-ACATTCCCTGCAATGAATCA-3'	480	53
exon 51	5'-CTTGTTAAGTCAGAGTTGTC-3'	5'-TACAATCTGTGTTTCTGACC-3'	653	53

#### II.4.6. PCR

La PCR correspond à une succession de cycles de température permettant l'amplification spécifique du gène cible. La première étape correspond à l'initiation de la PCR par dénaturation/activation des enzymes à une température de 95°C pendant 3 minutes. Suite à cette activation, la première étape d'un cycle correspond à la séparation des brins d'ADN à une température de 95°C pendant 10 à 30 secondes. La seconde étape correspond à l'hybridation des amorces avec le gène cible (annealing), elle se réalise à une température inférieure au T<sub>m</sub> des amorces pendant 15 à 30 secondes. Cette température est comprise généralement entre 50 et 65°C. La troisième étape est celle de la polymérisation du brin complémentaire par l'intermédiaire de la Taq polymérase (extension). Elle se fait à 72°C pendant 15 à 60 secondes en fonction de la taille de l'amplicon à répliquer (1 minute par kilobase). La Taq polymérase est une enzyme isolée au sein de la bactérie *Thermus aquaticus* ayant des propriétés de résistance thermique

exceptionnelles lui permettant de survivre aux cycles de températures de la PCR sans perdre son potentiel enzymatique. Ces trois étapes forment un cycle de PCR qui sera répété 30 à 40 fois. A la fin de chaque cycle, la fluorescence du Sybr green est détectée de manière proportionnelle au nombre de copies amplifiées et donc d'ARNm initialement présent dans l'échantillon testé. La PCR se termine par une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Des modifications peuvent être apportées à ce protocole classique. Il s'agit par exemple d'ajouter une étape « touch down » qui consiste en une diminution progressive par soustraction de 2 degrés des températures d'annealing des premiers cycles. Dans un touchdown, les températures des premiers cycles sont très élevées (classiquement 70°C) de façon à augmenter la spécificité de la PCR et à n'amplifier que les fragments d'intérêt. En effet, les fragments les plus spécifiques sont amplifiés en premier ce qui augmente leur quantité et rend improbable l'amplification de brins non voulus. Pour la qPCR, on utilise fréquemment des protocoles à deux étapes où l'étape d'annealing se confond avec celle d'élongation. Cela est rendu possible par les propriétés sans cesse améliorées des Taq polymérase et par la petitesse des amplicons (usuellement 80 à 250 pb).

#### II.4.7. Efficacité des primers

L'efficacité des primers correspond à la capacité de ces derniers de permettre une amplification adéquate du gène cible. En effet, à chaque cycle, la quantité d'ADN doit théoriquement être multipliée par deux. On évalue l'efficacité des amorces en réalisant des PCR avec des volumes d'ADN de dilution différentes. Ces dilutions sont de 1, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80. La différence de quantification entre la première et la seconde dilution doit donc être de 3,33 cycles (ou slope, correspond à l'opposé de la pente de la courbe quantité), puis de un cycle entre les dilutions suivantes. L'efficacité est donc calculée par la formule suivante :  $E = 10^{[-\frac{1}{slope}]}$ . L'efficacité doit être comprise entre 1,85 et 2,1.

#### II.4.8. Spécificité des primers

La spécificité des primers est évaluée sur gel d'agarose. En effet, la migration des amplicons sera proportionnelle à leur taille mesurée en paire de bases (pb). En outre, les gels d'agaroses permettent d'évaluer la présence d'amplicons non spécifiques, qui

présenteront une taille inadéquate comparée à l'amplicon d'intérêt. Le gel d'agarose est préparé comme suit :

Préparation du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1mMEDTA) pH : 8,2. Pour la préparation d'un litre de solution stock 50X de tampon TAE, il faut :

- 242 g de TriBase
- 57,1 mL d'acide acétique glacial pur
- 100 mL d'EDTA 0,5 M
- Qsp d'eau distillée pour 1 L
- Adjuster le pH a 8,2

Le gel d'agarose est réalisé à 1,2 % (m:v) dans le tampon TAE puis chauffé au micro-onde jusqu'à frémissement puis refroidi. Le Sybr green est ensuite ajouté à la solution puis le gel coulé. Les échantillons d'ADN sont versés dans les puits avec du tampon de migration (1 :6). Ce dernier est constituée de 50% de glycérol, 10 mM EDTA et 1% de bleu de bromophénol. L'électrophorèse se réalise à raison de 20 mV par cm de gel. Après migration, le gel est révélé par lampe U.V.

Lors des PCR quantitative, des contrôles négatifs sont systématiquement ajoutés :

-Nested reverse-transcriptase NRT : l'échantillon d'ARN a subi les mêmes conditions mais sans reverse transcriptase pour vérifier la non amplification d'ADN parasite (pseudogènes, mauvaise purification d'ARN,...)

-H<sub>2</sub>O : échantillon où l'ADNc a été remplacé par de l'eau, il permet de vérifier l'absence de dimers et de self-dimers.

#### II.4.9. Analyse des résultats

Les résultats s'évaluent de manière semi-quantitative. L'expression de chaque gène cible est rapporté a un gène de référence qui ne doit pas varier selon les conditions de l'expérience (GAPDH, beta-actine,...). Les valeurs quantitatives sont fournies par le nombre de cycles nécessaires pour obtenir une phase plateau pour chaque gène. Le ratio simple entre gènes de références et gènes cibles est utilisé pour une comparaison à un

instant t. Pour suivre une évolution de l'expression d'un gène par rapport à un contrôle, on utilisera la formule de Pfaffl :  $\frac{(E_{cible})^{\Delta Ct(\text{contrôle}-\text{échantillon})}}{(E_{ref})^{\Delta Ct(\text{contrôle}-\text{échantillon})}}$  (130), simplifiée en  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

## II.5. Transfection des micromasses par ARN interférant

La transfection des cellules par ARN interférant (ARNi) permet de diminuer de manière transitoire la synthèse de protéines en bloquant la traduction d'ARNm cibles grâce à une séquence nucléique complémentaire. Lors de nos expériences, nous avons utilisé la lipoféctamine comme agent de la transfection des ARNi (RNAi max kit, Invitrogen, Life Technology). Les cellules ont été transfectées lorsqu'elles étaient entre 60 et 80% de confluence. La durée de l'incubation a été de 12 heures, puis les cellules ont été décollées et comptées. Une partie d'entre elles a été utilisée pour des différenciations chondrocytaires en micromasses. L'autre partie des cellules a été utilisée pour contrôler la transfection par qPCR. Le gène cible était SOX9. Les sondes d'ARNi utilisées sont les suivantes :

Sens: 5'-AGGCAACUCGUACCCAAAUUU-3';

Anti-sens: 5'-AUUUGGGUACGAGUUGCCUUU-3'.

Les expériences ont été réalisées en duplicate sur deux souches provenant de deux donneurs différents. Les pelletes ont été maintenues en culture chondrocytaire pendant deux semaines et deux temps d'arrêt ont été réalisés aux jours 7 et 14 pour analyses histologiques.

## II.6. Expériences *in vivo*

L'étude *in vivo* a pour but d'évaluer la capacité des CSG à former des structures osseuses. L'expérience est réalisée sur des souris nude (c'est-à-dire avec un système immunitaire déficient) et fait intervenir 4 types cellulaires : des fibroblastes dermiques et gingivaux servant de contrôles négatifs, des CSM de la moelle osseuse servant de contrôle positif et des CSG étant les cellules cibles de l'étude.

Après décollement, les cellules sont centrifugées puis comptées. Pour chaque transplant,  $2.10^6$  cellules sont utilisées. Les cellules sont remises en suspension dans 1 ml de milieu de culture (sans sérum) puis mélangées avec le support ostéoinducteur qui

correspond à de l'hydroxyapatite/phosphate tricalcique avec une centrifugation de 50 tours/minute pendant 30 minutes.

Pour chaque souris, 4 transplantations sont réalisées au niveau dorsal et laisser *in situ* pendant une période de deux mois. Au terme de cette période, les souris sont été sacrifiées et les transplants récoltés, puis fixés dans le formaldéhyde et mis en paraffine pour analyses histologiques.

## **II.7. Analyses histologiques**

### **II.7.1. Méthodes de fixation**

Trois types de fixation/conservation des tissus/cellules ont été utilisés en fonctions des marquages souhaités.

- **Fixation simple**

Pour les colorations à même la boîte de Pétrie, les cellules sont fixées au formaldéhyde 4% pendant 15-20 minutes après rinçage au PBS.

- **Fixation à froid**

Les cellules/tissus sont rincés au PBS puis incorporés dans un milieu de fixation par congélation (OCT ou cryogel) pendant 30 minutes à température ambiante. Le bloc est ensuite transféré à -20°C pendant 20 minutes puis à -80 °C ou dans l'azote liquide. Les coupes sont réalisées dans un cryostat à -23 °C puis fixées dans l'acétone pur préalablement refroidi à -20°C. Cette technique permet une meilleure préservation des sites antigéniques et est donc plus favorable pour l'immunohistochimie.

- **Mise en paraffine**

La mise en paraffine permet de fixer et de conserver la morphologie des tissus ainsi traités. Cette technique n'est cependant pas recommandée pour la réalisation d'immunohistologie avec fluorescence en raison de la dégradation partielle des sites antigénique par le formaldéhyde. Les étapes sont les suivantes :

1. 2 rinçages au PBS à 4°C pendant 10-20 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu

2. 2 bains à alcool/PBS (1:1) à 4°C ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
3. bains à alcool 70°C à température ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
4. 2 bains à alcool 85°C à température ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
5. 2 bains à alcool 95° à température ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
6. 2 bains à alcool 100°C à température ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
7. 2 bains au xylène à température ambiante pendant 10-30 minutes en fonction de l'épaisseur du tissu
8. Mise en paraffine liquide durant toute la nuit à 55 °C afin de laisser évaporer le xylène. Ne pas couvrir l'échantillon.
9. Changement de paraffine et conservation à température ambiante

#### II.7.2. Colorations classiques

- **Coloration hématoxyline-éosine**

L'hématoxyline (Mayer) va colorer les noyaux en violet bleu et l'éosine le cytoplasme et la matrice extra cellulaire en rose.

Protocole :

1. Déparaffiner et réhydrater les coupes dans l'eau distillée.
2. Hématoxyline pendant 3-4 minutes
3. Rinçage à l'eau courante
4. Traitement à l'éthanol acide 0,3% HCl quelques secondes
5. Rinçage à l'eau courante
6. Bain d'eau lithinée pendant 1 minute
7. Rinçage à l'eau courante
8. Éosine Y 30 minutes (pour de la culture cellulaire)
9. Rinçage à l'eau courante, puis déshydratation et montage en résine

- **Coloration picrosirius red**

Cette coloration permet de visualiser les fibres de collagènes en rouge. Le protocole est le suivant :

1. Déparaffiner et réhydrater les coupes dans l'eau distillée.
2. Traitement à l'acide polymolbique(5%) pendant 10 minutes
3. Rinçage à l'eau courante

4. Coloration au picrosirius red pendant 1h00-1h30
5. Rinçage à l'eau courante, puis déshydratation et montage en résine

Les lames peuvent ensuite être visualisées en visible, mais également en lumière polarisée. Dans ce cas la lumière polarisée va être déviée de manière différentielle en fonction du diamètre des fibres de collagène. On obtient un dégradé de couleurs vert, jaune et rouge. La coloration peut également être appréciée par l'utilisation de la fluorescence. En effet, une excitation par une longueur d'onde de 510 nm (spectre d'excitation de la rhodamine) permet d'activer l'autofluorescence du rouge picrosirius et permet une imagerie plus fine des fibres de collagène avec diminution du fond de coloration.

- **Coloration Oil Red O**

La coloration Oil Red O permet de visualiser les inclusions lipidiques en rouge. On l'utilise pour contrôler les différenciations adipocytaires.

Solution mère : 0,5 % (m/v) d'oil red o dans de l'isopropanol pur

Solution de travail : 60% de solution mère avec 40% d'eau distillée. Laisser reposer 1h avant utilisation et filtrer au moment de l'emploi

Protocole :

1. Fixation à l'alcool isopropylique à 60 % 1 min
2. Colorer dans la solution de travail d'Oil Red O 10 min
3. Rincer à l'alcool isopropylique à 60 % 30 s
4. Rincer délicatement à l'eau distillée
5. Montage

- **Coloration à l'Alizarin Red S et sa quantification**

La coloration à l'Alizarin Red S permet de détecter la minéralisation des tissus ou de cultures cellulaire par liaisons du colorant aux dépôts de calcium. La coloration se sature en rouge proportionnellement à la minéralisation. Les étapes sont les suivantes :

1. Rinçage au PBS sans calcium ou à l'eau distillée
2. Fixation au para formaldéhyde 4% pendant 20 minutes
3. Rinçage au PBS sans Calcium ou à l'eau distillée
4. Coloration pendant 20 minutes à l'ARS 40mM (pH4, 1) à température ambiante et sous agitation.
5. 4 rinçages à l'eau distillée de 5 minutes chacun

Les colorations sont ensuite séchées et conservées à -20 °C pour quantification ultérieure. L'extraction d'Alizarin Red S permet de quantifier la minéralisation des cultures ostéoinduites. Cette technique a été décrite par Gregory, CA en 2004 (131). Le protocole est le suivant : •

1. Incubation de la coloration dans une solution à 10% acide acétique (800 µL pour un puits d'une boîte 6 puits) pendant 30 minutes à température ambiante
2. Détachement de la couche cellulaire à l'aide d'un gratte-cellule puis transfert dans un eppendorf de 1,7 mL et vortex pendant 30 secondes.
3. La suspension est recouverte de 500 µL d'huile minérale et chauffée pendant 10 minutes à 85°C puis plongée dans la glace pendant 5 minutes
4. Centrifugation à 12 000g pendant 15 minutes
5. 500 µL du surnageant est transféré dans un nouveau eppendorf et 200 µL d'hydroxyde d'ammonium 10% est ajouté afin de neutraliser l'acidité.
6. Pour chaque échantillon, 3 aliquots de 150 µL sont déposés dans une boîte 96 puits pour être mesuré par spectrométrie. La lecture se fait par absorbance à 405 nm de longueur d'onde.

#### • **Coloration au Bleu d'Alcian**

Le Bleu Alcian colore les protéoglycanes de la matrice en bleu ciel. On l'utilise pour la coloration des pelletes en différenciation chondrogénique. C'est un colorant basique qui s'emploie selon deux pH différents. A pH≈2,3, il colore tous les protéoglycanes. A pH=1, il colore les protéoglycanes sulfatés.

Protocole :

Solution : 2% (m/v) de Bleu Alcian dans 1% acide acétique/dH<sub>2</sub>O

1. Déparaffinage des coupes et réhydratation dans de l'eau distillée
2. Coloration à l'alcian blue pendant 30-40 minutes
3. Rinçage à l'acide acétique 3% puis à l'eau
4. Déshydratation et montage en résine

#### • **Coloration Toluidine Blue**

C'est un colorant basique important, générant des colorations métachromatiques, c'est-à-dire colorant différents éléments histologiques du bleu-violet en fonction de leur pH. Il permet notamment de visualiser les GAG/protéoglycanes en violet et les noyaux en bleu

Solution mère: Toluidine blue O (Sigma) 1 g dans 100 mL d'éthanol 70%

Solution de chlorure de sodium (1%) (m/v): Sodium chloride 0,5 g dans 50 mL d'eau distillée. Préparer la solution à chaque emploi. Ajuster le pH à 2-2,5 à l'acide acétique glacial ou à l'acide hydrochlorique.

Solution de travail: Toluidine blue solution mère: 5 ml dans 45 mL de solution de chlorure de sodium (1%) (m/v), pH 2.3

Protocole:

1. Déparaffiner et réhydrater les coupes dans l'eau distillée
2. Colorer à la toluidine blue pendant 2-5 minutes.
3. Laver trois fois dans l'eau distillée
4. Déshydrater rapidement les coupes dans l'alcool (la coloration est amoindrie par l'alcool) et monter les lames après nettoyage au xylène (2x3minutes).

### II.7.3 Immunohistochimie

- **Immunohistochimie en lumière visible**

Pour les différentes protéines cibles, nous avons utilisé le même protocole. Seules les concentrations en anticorps primaire peuvent varier. Elles sont comprises entre 1/50 et 1/100. Il est intéressant de réaliser une gamme de ces anticorps primaires pour évaluer la meilleure concentration à utiliser. Les contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'anticorps primaire.

1. Déparaffinage des lames et réhydratation.
2. Démasquage des sites spécifiques à la pepsine 1mg/mL à pH2 pendant 15 minutes à température ambiante. (laisser refroidir 10 minutes)
3. 3 rinçages au PBS.
4. Inhibition des peroxydases endogènes par de l'eau oxygénée 0,3% pendant 30 minutes.
5. 3 rinçages au PBS.
6. Blocage des sites non spécifiques au PBS/BSA 1mg/mL pendant 30 minutes.
7. Incubation de l'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA 1mg/mL au 1/75<sup>ème</sup> pendant toute la nuit à 4°C.
8. 3 rinçages au PBS/BSA 1mg/mL.
9. Incubation de l'anticorps primaire biotynilé Vectastain® ABC Mouse IgG 1 heure à température ambiante.
10. 3 rinçages au PBS/BSA 1mg/mL.

11. Incubation de l'immunoperoxidase Vectastain® ABC kit pendant 30 minutes à température ambiante. La solution doit être préparée au moins 30 minutes avant son utilisation.
12. 3 rinçages au PBS/BSA 1mg/mL.
13. Incubation avec le substrat de la peroxydase Vector® VIP ou DAB pendant 1-15 minutes. Arrêter la réaction en fonction de la coloration souhaitée.
14. 3 rinçages au PBS.
15. Contre-coloration à l'hématoxyline pendant 3 minutes.
16. Rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes.
17. Déshydratation et montage en résine.

Les anticorps utilisés ont été les suivants : Cadherine-11 (R&D systems, MAB1790), Collagène de type II, IV et X (Hybridoma Bank-Université de Iowa). Pour la mesure de la prolifération, un marquage au Ki67 (Dako M0722) a été réalisé.

- **Immunohistochimie à fluorescence**

Bien que pour cette technique, il est plus favorable de réaliser les marquages sur des coupes fixées à froid, la fluorescence peut tout de même être effectuée sur des coupes mise en paraffine. Le protocole est sensiblement identique que pour l'immunohistochimie à coloration visible. Le protocole est le suivant :

1. Déparaffinage des lames et réhydratation.
2. Démasquage des sites spécifiques à la pepsine 1mg/mL à pH2 pendant 15 minutes à température ambiante. (laisser refroidir 10 minutes)
3. 3 rinçages au PBS.
4. Blocage des sites non spécifiques au PBS/BSA 1mg/mL pendant 30 minutes.
5. Incubation de l'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA 1mg/mL pendant toute la nuit à 4°C.
6. 3 rinçages au PBS/BSA 1mg/mL.
7. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome
8. 3 rinçages au PBS/BSA 1mg/mL.
9. 3 rinçages au PBS.
10. Contre-coloration au DAPI pendant 3 minutes.
11. Rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes.
12. Montage en milieu aqueux

Les anticorps utilisés dans ce protocole sont les suivants : la  $\beta$ -tubuline, l' $\alpha$ -SMA (ABCAM, ab5694) et la nestine. Ils ont été utilisés au 1/100.

- **Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline**

L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée à partir du kit VECTOR Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Vector Laboratories) suivant le protocole du fabricant.

- **Mesure de l'apoptose**

L'apoptose a été mesurée à partir du kit apoptag® (milipore) suivant le protocole du fabricant. Ce qui marque les cellules apoptotiques sans distinguer le type d'apoptose (induction endogène ou exogène).

#### II.7.4. Histologie par microscopie électronique à balayage.

Les coupes de pelletes chondrocytaires mise en paraffine ont été réhydratées, puis rincées par du PBS et incubée dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant une heure. Après rinçages, les sphères ont été incubées avec du tétroxyde d'osmium à 0,5 % pendant 20 minutes. Les morceaux de coupes ont été fixes sur des porte-échantillons et peints à l'argent (Canemco-Marivac, St. Laurent, QC, Canada). Les images ont été obtenues par le microscope électronique à balayage Helios NanoLab 650 Dual Beam (FEI, Hillsboro, OR, USA).

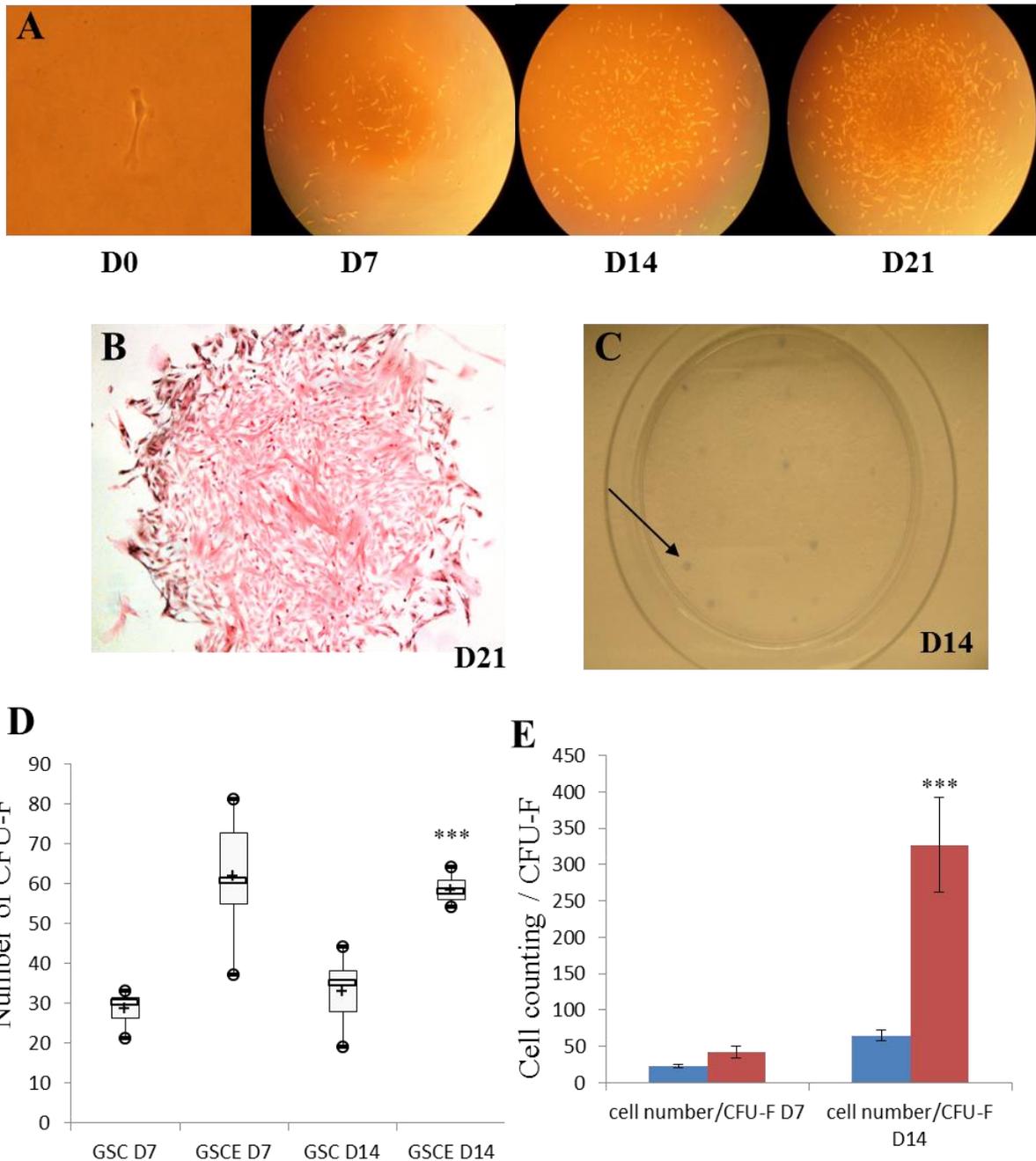
### **III. RÉSULTATS**

#### **III.1. Génération de colonies fibroblastiques (CFU-F)**

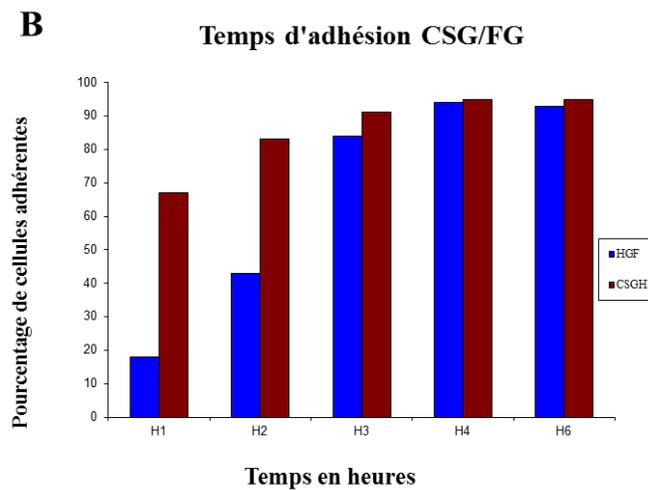
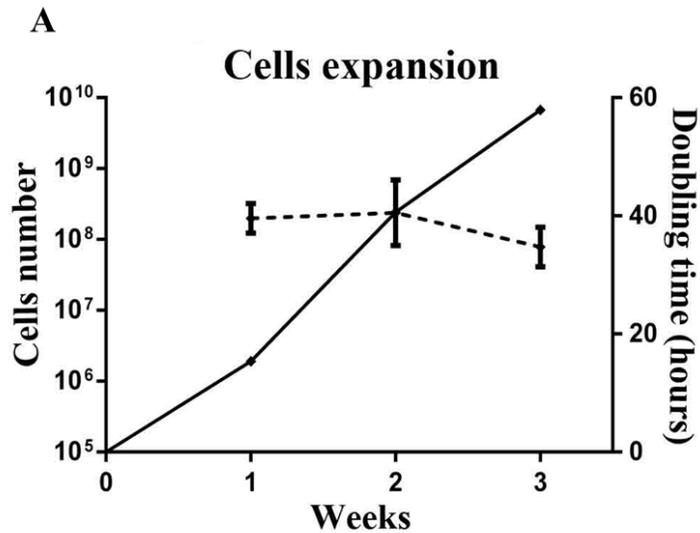
Nous avons pu montrer que les fibroblastes gingivaux avaient la capacité de former des colonies fibroblastiques (CFU-F) lorsqu'elles étaient ensemencées à basse concentration ( $< 50$  cellules/cm<sup>2</sup>). Après dilution, les fibroblastes meurent par absence de contact (anoikis) et seules survivent les cellules clonogéniques. Les CFU-F forment des « spots » concentriques (Figure 12A) dont la densité cellulaire est décroissante du centre vers la périphérie. Les colonies ont été comptées à J14, chaque colonie étant composée d'au moins 50 cellules (Figure 12B et 12C). A partir d'une mise en culture de 1 200 fibroblastes gingivaux sur 5 souches, nous avons obtenu en moyenne 35 CFU-F par boîte de pétrie 60 mm. On estime donc à 2,9%, en moyenne, le nombre de cellules capables de former des CFU-F à partir de l'ensemble des fibroblastes gingivaux (Figure 12D). Pour la suite des expériences, l'ensemble des colonies a été groupé et les cellules nommées cellules souches gingivales (CSG). Lorsqu'à partir de ces CSG, nous générons à nouveau des CFU-F, ils sont en moyenne plus nombreux (60 contre 35) avec un nombre plus important de cellules par spot (327 contre 65) (figure 12E)

#### **III.2. Prolifération, adhésion des CSG**

Les CSG présentent un potentiel de prolifération très important. En effet, leur temps de doublement tourne en moyenne autour de 37 heures (Figure 13A). Cette vitesse de prolifération permet d'obtenir un nombre très important de cellules dès les premiers passages. Cette vitesse de prolifération est comparable entre les FG et les CSG. En revanche, les CSG adhèrent plus rapidement aux boîtes de Pétri que les FG (Figure 13B).



**Figure 12.** Génération de CFU-F à partir de fibroblastes gingivaux. (A) Formation d'un «spot» à partir d'une cellule isolée. (B) Coloration à l'éosine d'un CFU-F à J21 et d'une boîte de Pétrie au Bleu de Toluidine montrant une culture de CFU-F à J14 (C). (D) Lorsque les CFU-F (GSCE pour cellule souche gingivales enrichies) sont regroupés et à nouveau ensemencés à densité clonogénique, ils sont capables de générer une quantité plus importante de CFU-F que les fibroblastes gingivaux. (E) Les GSCE (rouge) génèrent des CFU-F de densité cellulaire plus importante à J14 que les fibroblastes gingivaux (bleu). \*\*\* P < 0,001

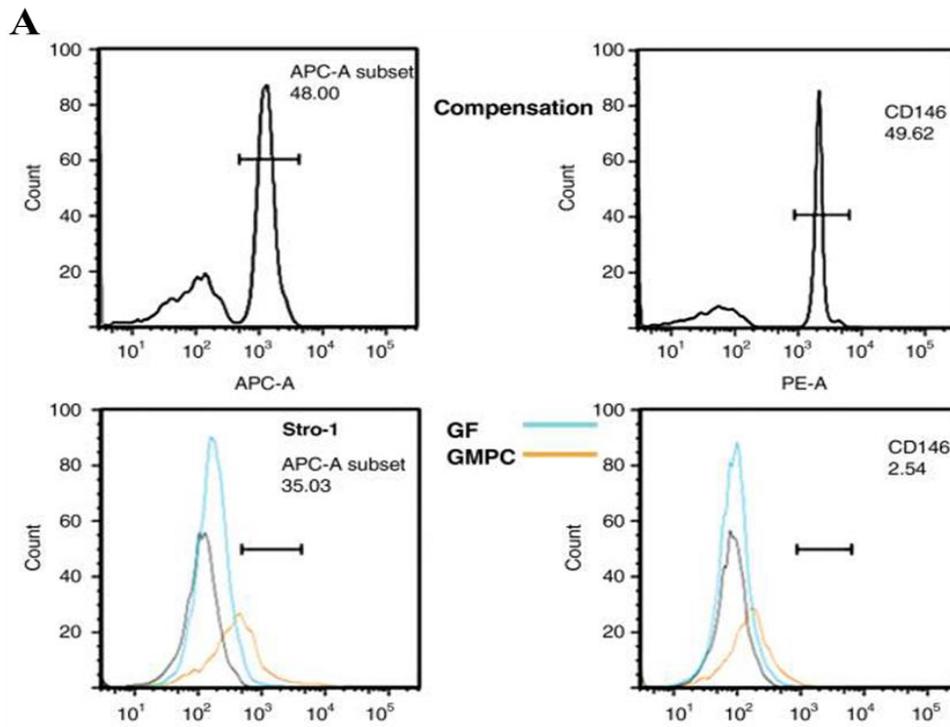


**Figure 13. Prolifération et adhésion des FG et CSG. (A) Prolifération sur 3 semaines des CSG et leur temps de doublement en heures. (B) Comparaison de la vitesse d'adhésion entre les FG (HGF) et les CSG (CSGH) au cours des 6 premières heures après leur ensemencement.**

### III.3. Caractérisation membranaire par cytométrie en flux des CSG

Les marqueurs de surface classiquement utilisés pour caractériser les CSMMO ont été évalués. Nous avons comparé les FG avec des CSG et des CSMMO utilisées comme contrôle positif. Les résultats se montrent similaires entre les trois souches. Les marqueurs hématopoïétiques (CD29, CD45, CD117, CD200, HLA-DR) sont négatifs pour les trois souches et les marqueurs mésodermiques positifs (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105). Cependant, la proportion de 3 marqueurs est différente. Il s'agit du

CD271 qui est positif pour 80% des CSMMO alors qu'il est négatif pour les FG et les CSG.



**B**

	BMMSC	GF	GMPC
CD29	100%	100%	100%
CD34	0%	0%	0%
CD44	99%	100%	100%
CD45	0%	0%	0%
CD73	100%	100%	100%
CD90	100%	100%	100%
CD105	100%	100%	100%
CD117	0%	0%	0%
CD146	80%	1-15%	3-17%
CD200	0%	0%	0%
CD271	11%	0%	0%
HLA-DR	0%	0%	0%
STRO-1	80%	7%	35%

Figure 14. Caractérisation des marqueurs membranaires des CSG par cytométrie en flux.

Le CD146, utilisé comme marqueur des péricytes est positif dans 1 à 15% des FG et dans 3 à 17% des CSG contre 80% pour les CSMMO. Enfin STRO-1 qui est un marqueur retrouvé au niveau des précurseurs ostéoblastiques est plus exprimé dans les CSG que dans les FG (35% contre 7%) mais reste bien moins exprimé que dans les CSMMO (80%) (Figure 14).

#### **III.4. Caractérisation crête neurale des GSC**

Afin de confirmer l'origine crête neurale de nos cellules, nous avons réalisé des PCR en ciblant des marqueurs spécifiques de cette origine embryonnaire. Les gels d'agarose montrent que les CSG sont positives pour SNAIL1, TWIST1 et SOX9 (Figure 15A). Par ailleurs, cultivée dans les conditions adéquates (cf. Matériels et méthodes), les cellules sont capables de former des neurosphères (Figure 15B). Ces dernières peuvent être remises en culture par adhésion. Dans ce cas, les cellules des neurosphères prolifèrent et colonisent la boîte de Pétrie. Plusieurs milieux ont été testés afin d'évaluer la méthode la plus efficace pour obtenir des neurosphères (Figure 15C). Le milieu contenant du bFGF et de l'EGF s'est avéré être le meilleur selon un score établi prenant en compte à la fois le nombre et le diamètre des neurosphères (cf. Matériels et méthodes) (Figure 15D). Lorsque les cellules sont cultivées en neurosphère, elles expriment le filament intermédiaire nestine alors que ni les CSG ni les FG ne l'expriment lorsqu'ils sont cultivés en monocouche dans un milieu contenant du sérum (Figure 15E). L'ensemble de ces résultats confirme l'origine crête neurale des cellules issues de nos prélèvements.

#### **III.5. Sécrétion de MMPs**

L'analyse des sécrétions de MMPs par zymographie montre que les CSG et les FG sécrètent les mêmes MMPs. Que ce soit en prolifération en monocouche ou en gel de collagène, les deux populations cellulaires sécrètent de la MMP-2 sous forme zymogène et active. Cependant, la forme active est davantage sécrétée dans les cultures

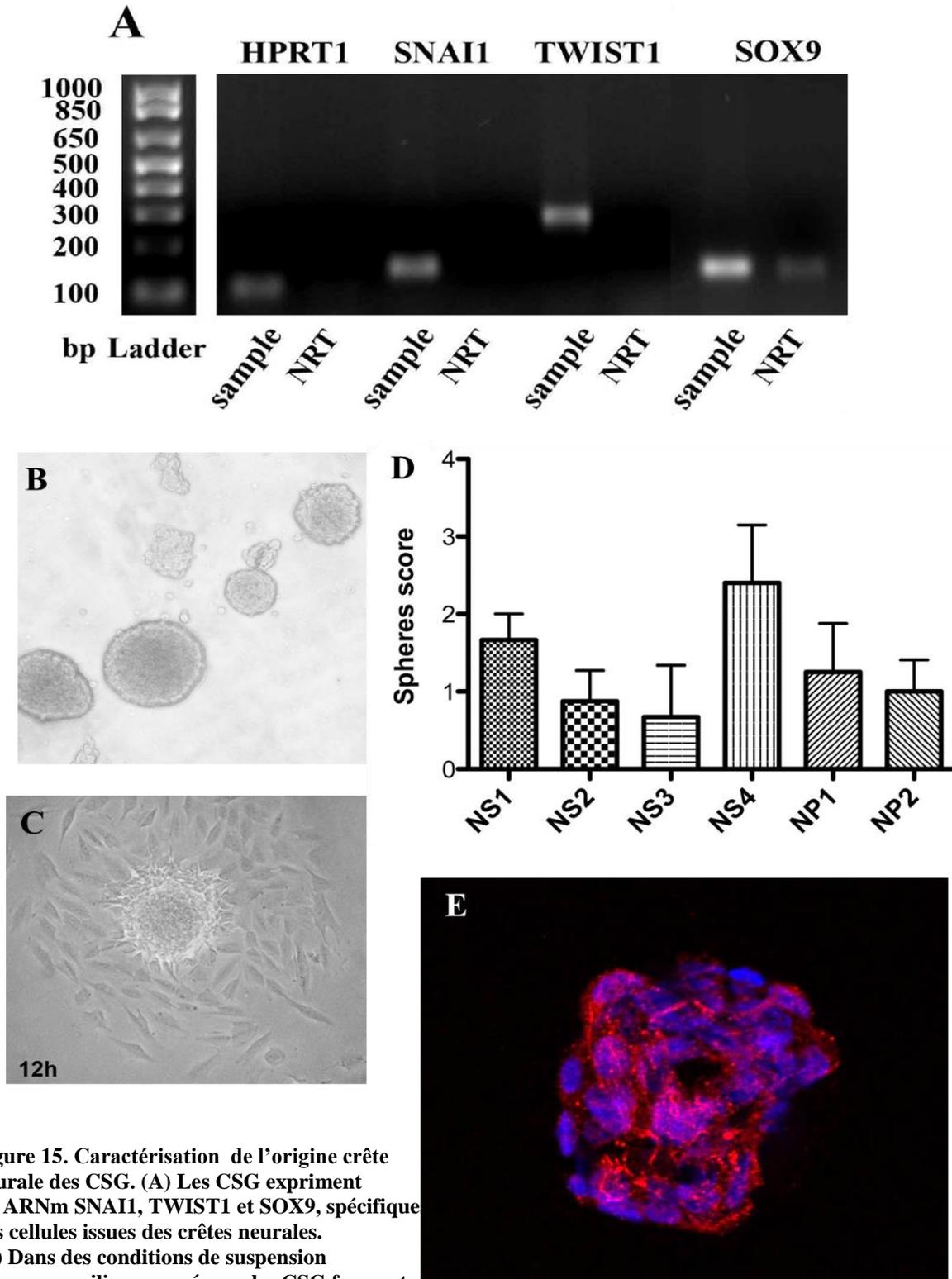
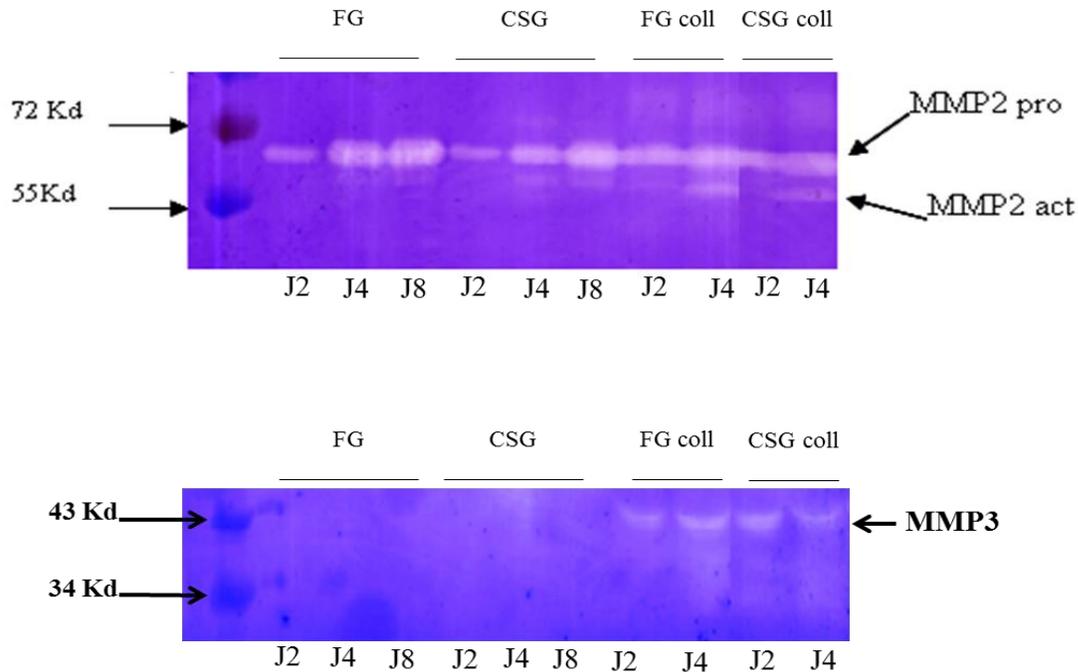


Figure 15. Caractérisation de l'origine crête neurale des CSG. (A) Les CSG expriment les ARNm SNAI1, TWIST1 et SOX9, spécifiques des cellules issues des crêtes neurales. (B) Dans des conditions de suspension et avec un milieu sans sérum, les CSG forment des neuro-sphères. (C) Lorsqu'elles sont remises en culture avec du sérum, les neurosphères adhèrent et voient leurs cellules coloniser la boîte de culture. (D) Plusieurs milieux de cultures ont été testés et évalués selon un score arbitraire. Le milieu NS4 est le plus efficace dans nos conditions (cf. Matériels et méthodes). (E) Les neurosphères expriment la nestine alors que les CSG cultivées en monocouche ne l'expriment pas. (échelle: 20µm)

en gel de collagène (Figure 16A). Les CSG et les FG sécrètent également la stromélysine-1 (MMP-3) mais uniquement en gel de collagène (Figure 16B). Nous n'avons pu mettre en évidence de sécrétion de collagénase (MMP-1) lors de nos expériences.



**Figure 16. Zymogrammes de milieux de culture comparant les sécrétions de FG et CSG en culture simple ou en gel de collagène. (A) Zymogramme de gélatine détectant les formes zymogènes et actives de la MMP-2. (B) Zymogramme de caséine détectant la MMP-3.**

### III.6. Multipotence

La multipotence est une caractéristique majeure des cellules souches. Nous avons donc évalué la possibilité de se différencier dans trois lignages les CSG, à savoir en adipocytes, en ostéocytes et en chondrocytes.

#### III.6.1. Différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire se fait sur culture en monocouche pendant 3 à 5 semaines. Soumises à ces conditions, les cellules changent de phénotype avec un cytoplasme contenant des vacuoles lipidiques se répartissant dans le cytoplasme. Ces vacuoles sont visibles au microscope optique et prennent une coloration rouge à l'Oil Red O (Figure 17A-C). Au cours de cette différenciation, les cellules expriment de la

lipoprotéine lipase (LPL) tant au niveau des ARNm (Figure 17D) qu'au niveau des protéines (Figure 17E).

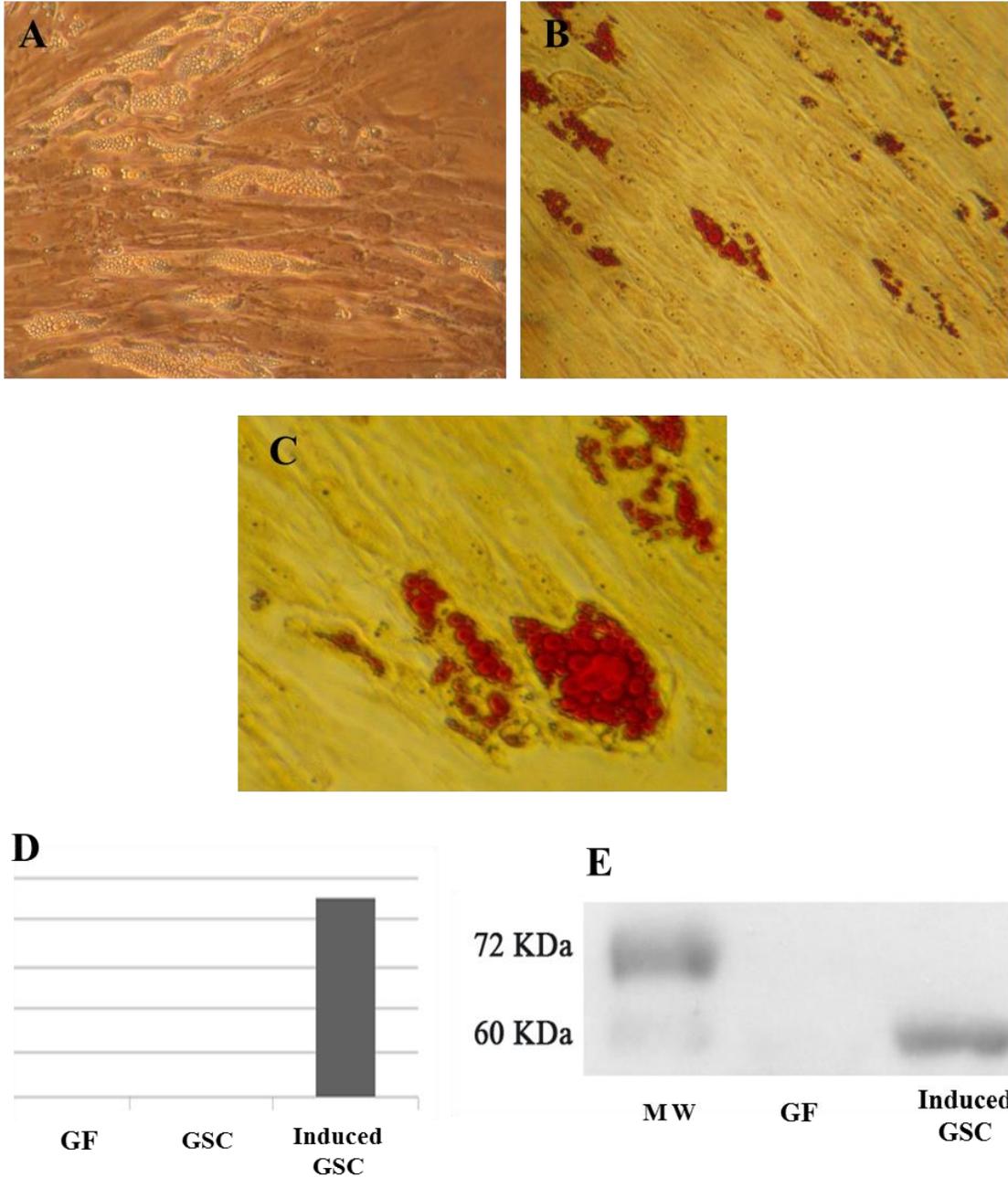


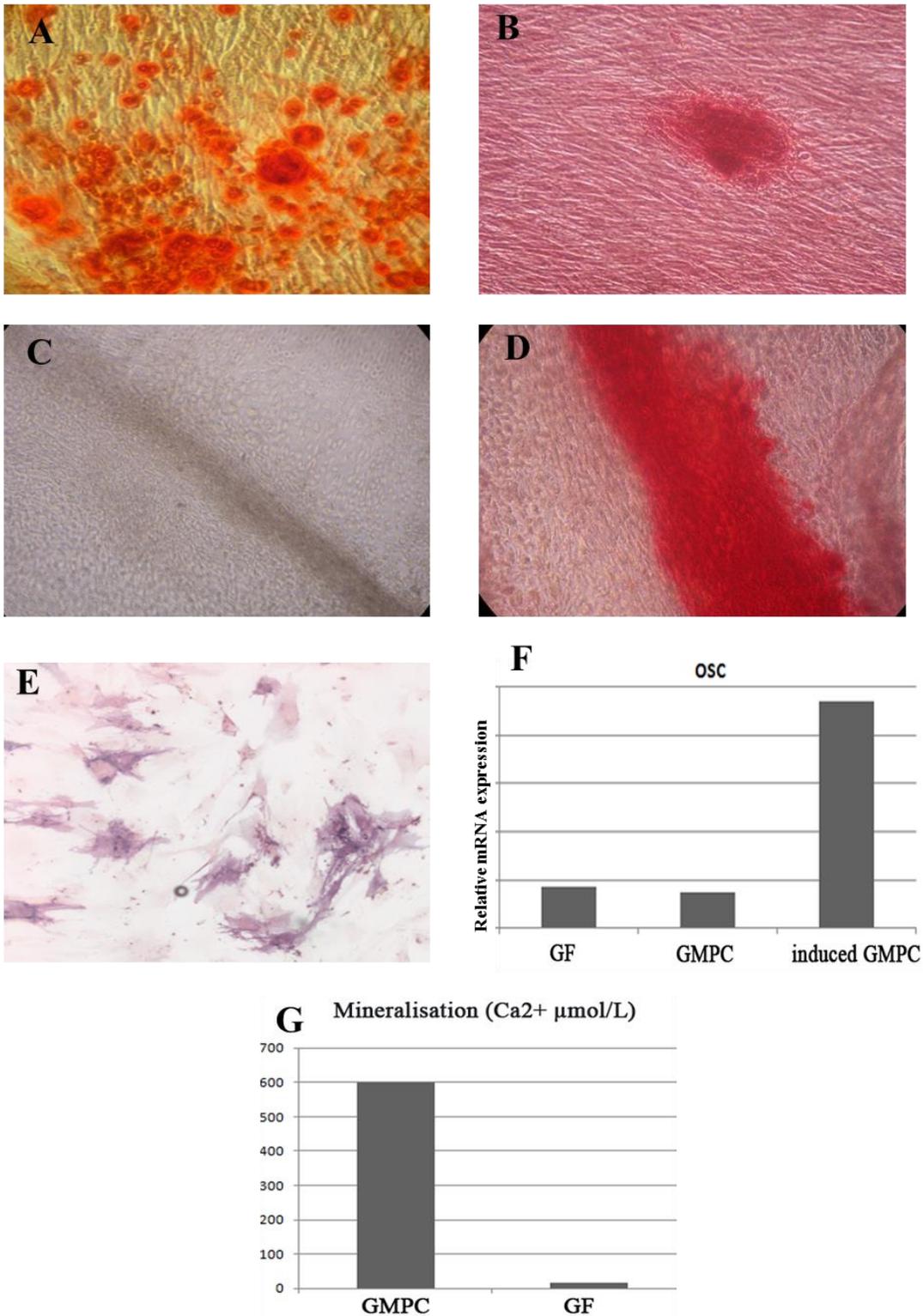
Figure 17. Différenciation adipocytaire des CSG. (A-C) Les CSG différenciées présentent un phénotype modifié avec l'apparition de vacuoles lipidiques visibles au microscope à contraste de phase et positives à la coloration Oil Red O, ces vacuoles se répartissent autour du noyau cellulaire. (D) qPCR de la LPL. (E) Western blot de la LPL.

### III.6.2. Différenciation ostéogénique

- **Expériences *in vitro***

Afin d'évaluer la capacité de différenciation en ostéoblastes, les CSG ont été cultivées en monocouche avec un milieu ostéoinducteur pendant 3 à 5 semaines (cf. Matériels et méthodes). Cette méthode mime *in vitro* une différenciation osseuse de type membraneuse puisqu'elle procède par minéralisation directe sans intermédiaire cartilagineux, comme c'est le cas pour la différenciation de type endochondrale. Deux séries d'expériences ont été réalisées suivant ce protocole. La première faisait intervenir des FG et CSG provenant de la gencive marginale. La seconde faisait intervenir 3 souches issues de la gencive palatine. Dans tous les cas, les CSG ont la capacité de se différencier en ostéocyte. Les cellules produisent une matrice contenant des nodules minéralisés positifs à la coloration ARS (Figure 18A). Ces derniers se constituent, soit sous forme concentrique dans des zones de forte densité cellulaire (Figure 18B), soit sous forme de travées de type «hill and valley» (Figure 18C, D). Par ailleurs les cellules expriment l'alcaline phosphatase (ALPL), enzyme nécessaire à la libération d'ions phosphates qui sont eux même nécessaires à la production des nodules minéralisés (Figure 18E). Nous avons également montré que la synthèse d'ARNm du gène ostéocalcine (OSC) était largement augmentée (Figure 18F). Lors de la première série d'expériences, les fibroblastes ne se différenciaient pas contrairement au GSC, comme le montre la quantification de la concentration de calcium par spectrométrie de masse de la coloration ARS (Figure 18G).

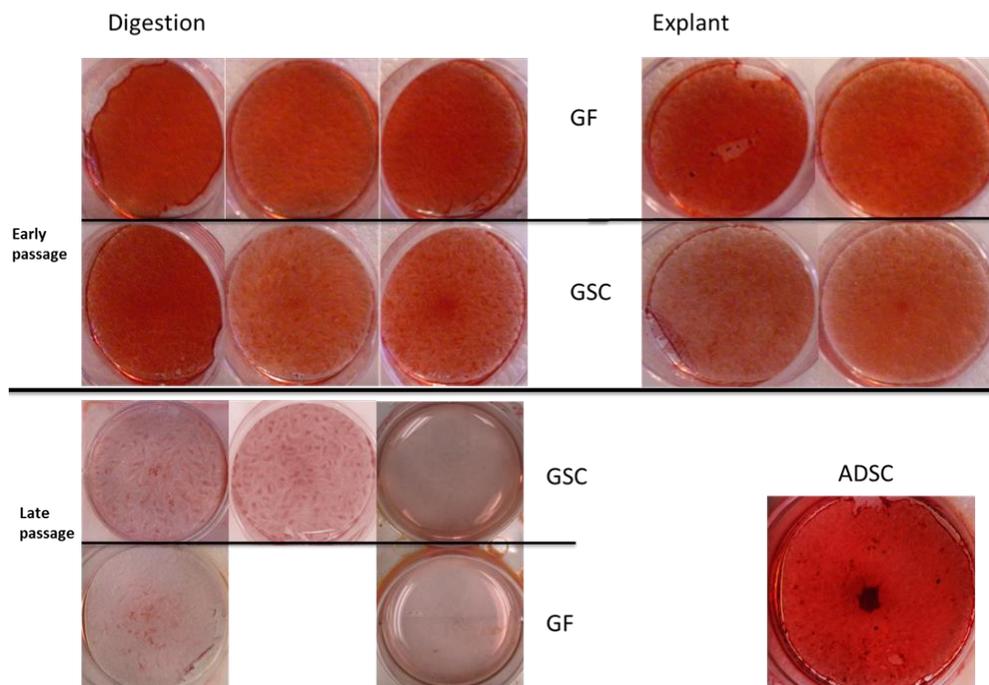
Lors de la seconde série d'expériences où les FG et GSC ont été isolés à partir de biopsie de gencive palatine, les résultats sont sensiblement différents. Dans cette série d'expériences, les biopsies ont été divisées en deux afin de tester deux protocoles d'isolation cellulaire : le premier par explant comme dans la série d'expériences précédentes et le second par digestion enzymatique (cf. Matériel et méthode). Le but de tester les deux protocoles étaient d'évaluer si la méthode d'isolation cellulaire avait une influence sur les propriétés de multipotence. Après avoir suivi les protocoles de différenciation ostéogénique avec vitamine D, les colorations à l'ARS ne montrent pas de différences entre les lignées sélectionnées par digestion enzymatique et celles issues du



**Figure 18.** Différenciation ostéocytaire des CSG en culture deux dimensions. (A) Les cellules différenciées produisent des nodules calcifiés qui prennent la coloration ARS (grossissement x50). (B) Gros plan de nodule (grossissement x200). (C, D) Les cellules différenciées peuvent produire des structures en forme de “hill and valley” qui prennent la coloration ARS (grossissement x50 (C) et 200 (D)). (E) Marquage de l’activité de la phosphatase alcaline des CSG après différenciation. (F) qPCR de l’ostéocalcine. (G) Quantification par spectrométrie de masse de la quantité de calcium déposé.

protocole par explant. En revanche, nous avons pu constater dans cette série d'expériences que les FG et les GSC se différenciaient de manière comparable et que par ailleurs, la différenciation était très largement diminuée lorsque les souches vieillissaient ( $P > 6$ ), avec tout de même une meilleure différenciation des GSC (Figure 19).

Au cours de la différenciation, nous avons évalué la cinétique génétique de plusieurs gènes clés de l'ostéodifférenciation. L'expression génique a été évaluée par PCR quantitative aux jours 0, 4, 7, 14 et 21. Deux souches de FG et deux souches de GSC issues du même patient ont été comparées. Les quatre souches montrent des profils de régulation génétique similaires avec cependant de grandes variations entre les souches. Certains gènes sont surexprimés précocement comme l'ALPL (J4), RUNX2 et MSX2 (J4 et J7) et d'autres plus tardivement OSX (J21). Par ailleurs, SOX9, qui est un gène maître de la différenciation cartilagineuse et un inhibiteur de RUNX2 (121) n'est pas régulé de manière significative (Figure 20). Les souches vieilles montrent une dérégulation de la cinétique génique avec notamment une absence de surexpression d'OSX aux jours tardifs qui peut expliquer l'absence de minéralisation. De manière intéressante, les cellules souches adipeuses montrent une minéralisation plus précoce que les GSC. Cette minéralisation prématurée est sous-tendue par une activation dès le jour 14 d'OSX.



**Figure 19. Coloration à l'ARS des différenciations ostéocytaires. Comparaison des différenciations entre fibroblastes isolés par digestion et par enzymes, entre FG et CSG, entre passages précoces ( $P \leq 2$ ) et passages tardifs ( $P \geq 5$ ) et avec une lignée de cellules souches adipeuses.**

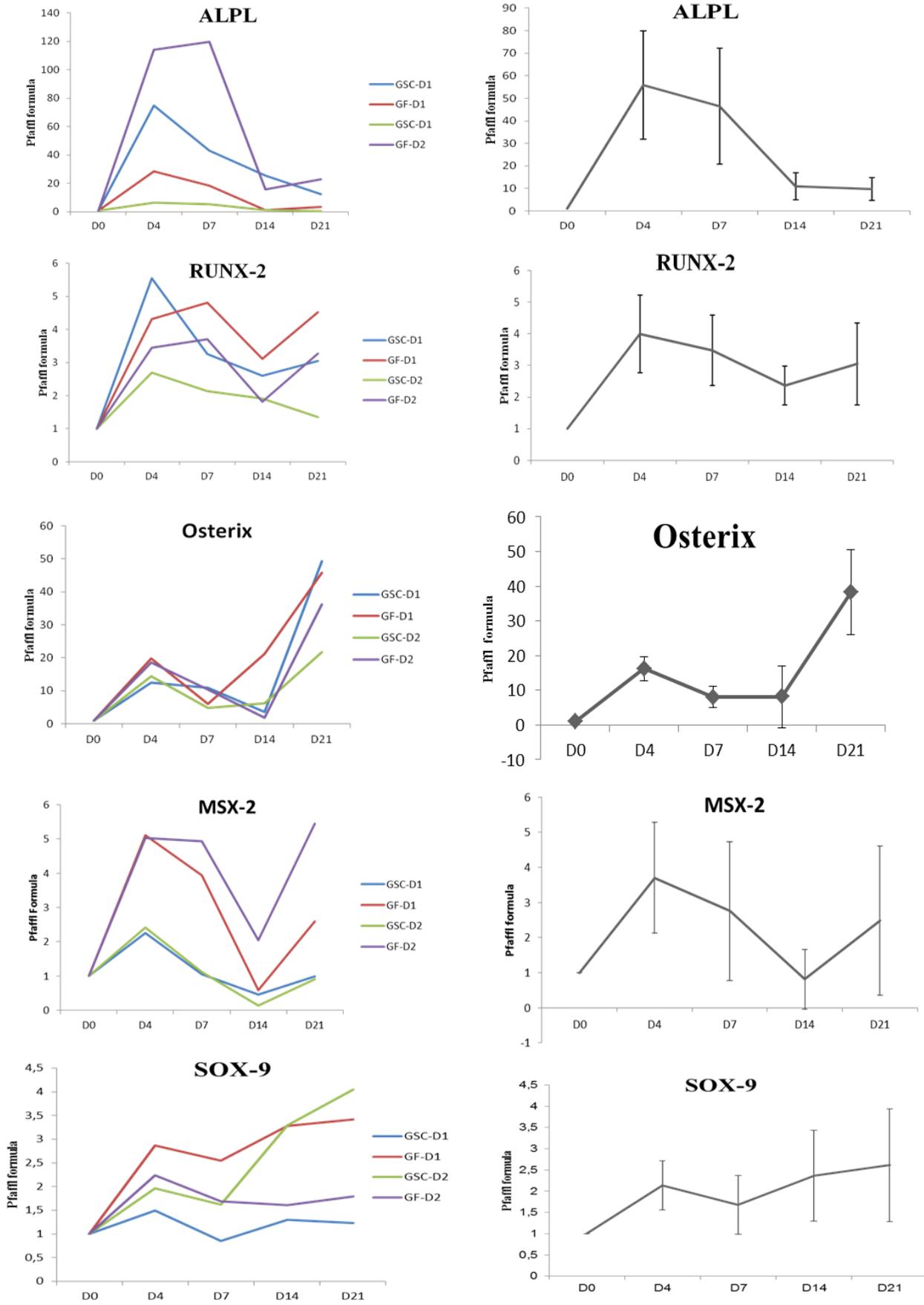
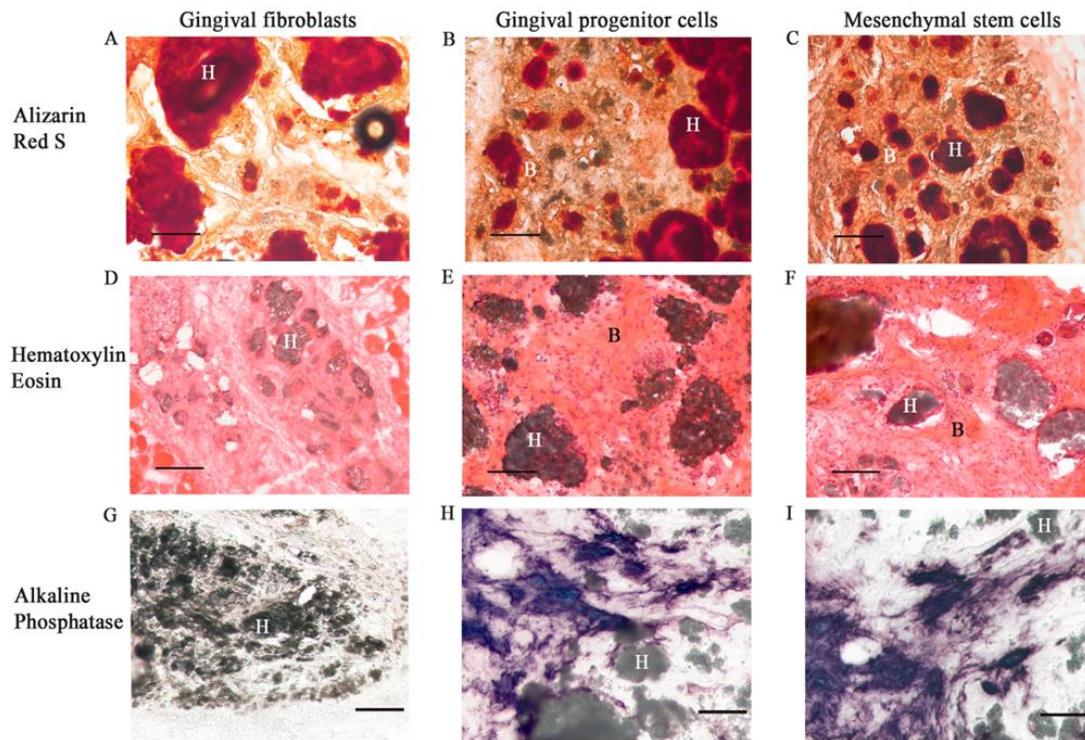


Figure 20. Étude de l'expression génique durant la différenciation osseuse de type intramembranaire.

- **Expériences *in vivo***

Afin d'évaluer la capacité des CSG à produire *in vivo* un tissu osseux, nous avons injecté en sous cutané de souris immunodéficientes des CSG, des FG et des CSM. Après deux mois *in situ*, les greffons ont été récoltés et analysés par histologie. Les coupes colorées à l'ARS montrent une minéralisation de la matrice autour des fragments du vecteur. Les colorations à l'hémalum-éosine montrent une matrice plus basophile à certains endroits au sein des CSG et des CSM. Par ailleurs, l'activité de la phosphatase alcaline est très prononcée dans les greffons contenant des CSM et des CSG mais pas dans ceux contenant des FG. Ces résultats démontrent la capacité des CSG à générer une matrice calcifiée *in vitro*. Pourtant, nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation d'un tissu osseux clairement défini (Figure 21).

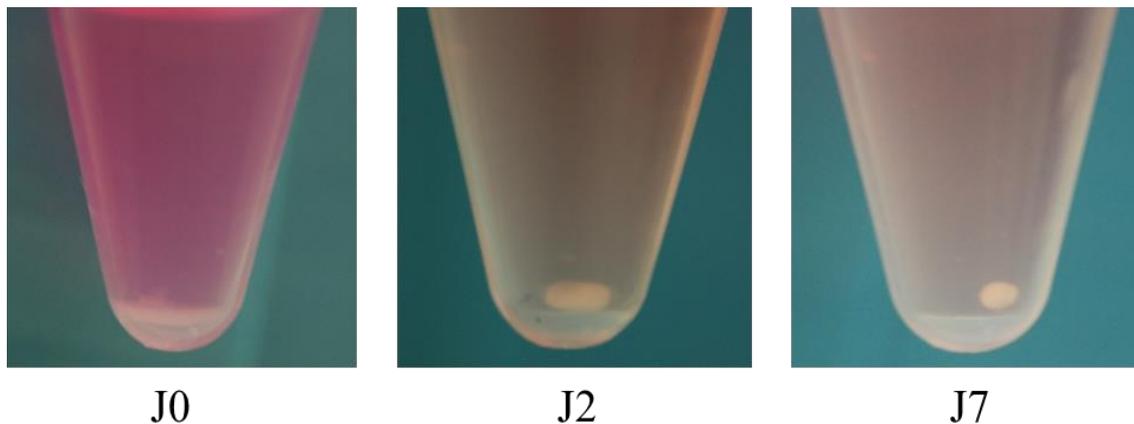


**Figure 21.** Étude *in vivo* du comportement des FG, des CSG et des CSM, différenciées en ostéoblastes et injectées en sous cutané dans des souris immunodéficientes. Après deux mois *in vivo*, l'analyse histologique des prélèvements montre une minéralisation de la matrice extracellulaire pour les CSG et les CSM (A-F) ainsi qu'une activité de la phosphatase alcaline (G-I). Cependant la formation d'un véritable tissu osseux calcifié n'a pas été mise en évidence.

### III.6.3. Différentiation chondro/endochondrale

La voie de différenciation endochondrale est la voie alternative à l'ossification de type intramembraneuse. Par étapes successives, elle fait intervenir une différenciation chondrocytaire des cellules, produisant une matrice cartilagineuse qui va servir de support à une minéralisation et à la formation d'un tissu osseux. Pour reproduire *in vitro* ces processus complexes de différenciation, les trois souches issues de prélèvements palatins ont été cultivées sous forme de micromasses (ou pelletes ou sphères) afin de maximiser les contacts entre les cellules. Elles ont été successivement soumises à deux types de milieux, le premier induisant une chondrodiffférenciation, le second induisant la différenciation terminale des chondrocytes par des conditions d'hypoxie (cf. Matériel et méthodes). Par ailleurs, le choix du contenant a été important car il ne devait pas permettre l'adhésion des cellules et maintenir les pelletes en suspension. Ainsi, des tubes de polypropylène (Falcon®) ont été utilisés, leur surface étant inerte.

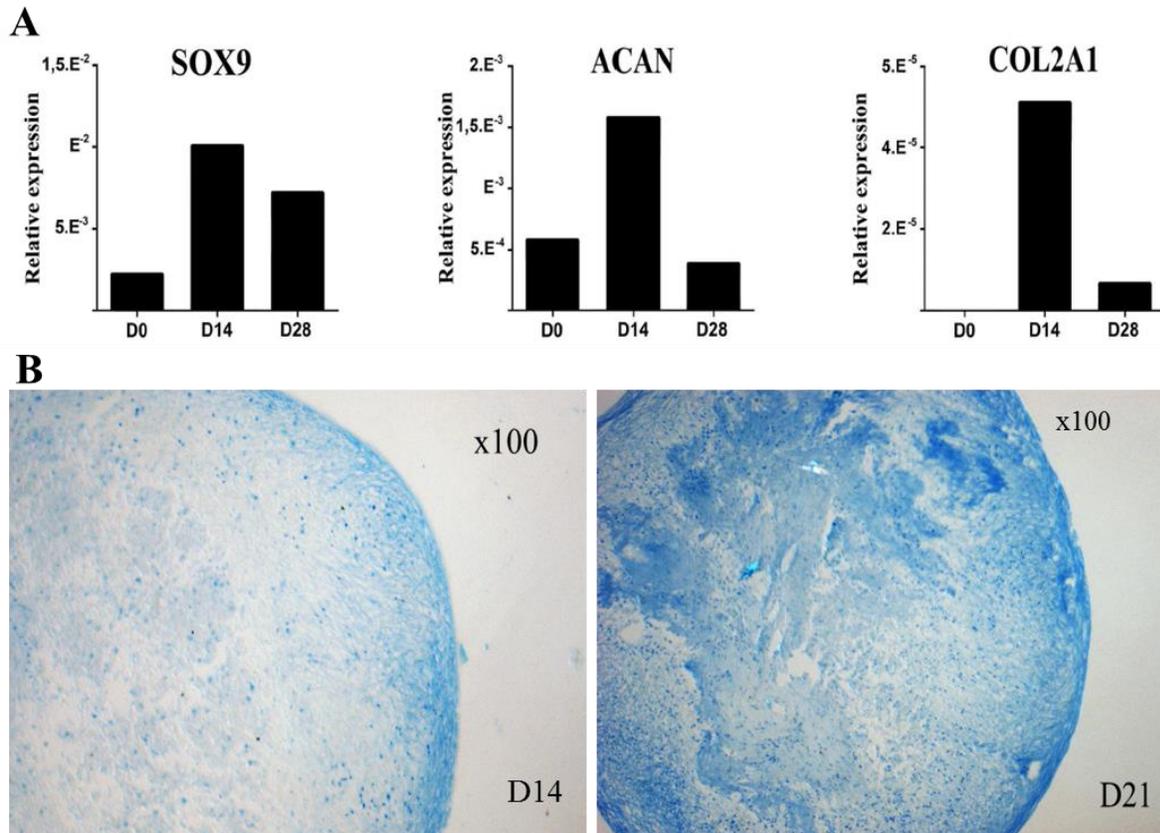
Soumises à une centrifugation de 5 minutes à 500g, les cellules forment un culot à l'extrémité du tube qui, sous l'effet du milieu chondroinducteur va se contracter et former une masse sphérique en l'espace d'une semaine environ (Figure 22).



**Figure 22.** Photographies des tubes de polypropylène contenant les CSG induites pour une différenciation en chondrocytes. Après centrifugation, les cellules forment un culot à l'extrémité du tube (J0) qui sous l'influence du milieu va se contracter pour former un disque (J2) puis une micromasse sphérique (J7) sans adhérer au tube.

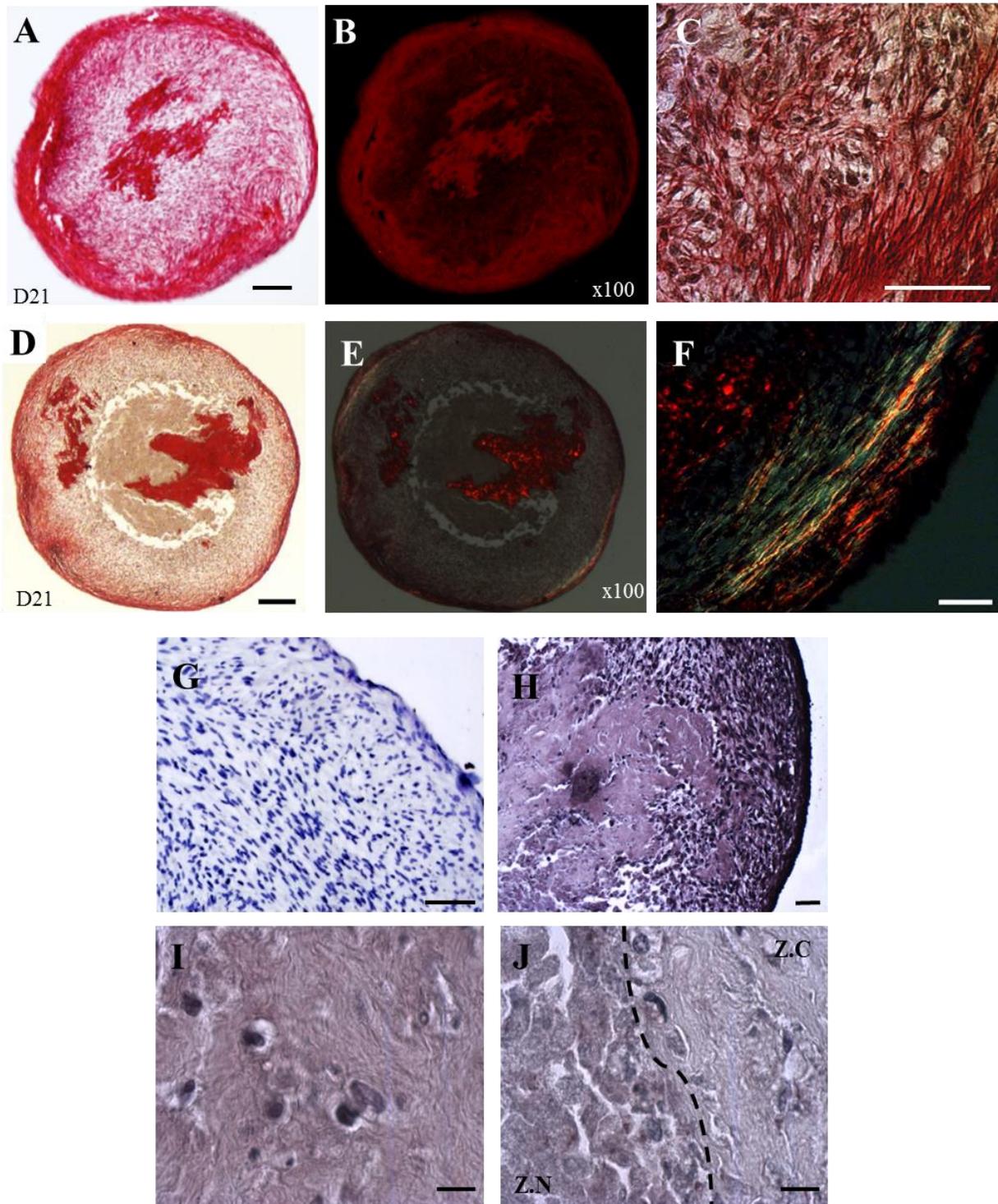
Deux temps d'arrêt ont été réalisés aux jours 14 et 21, correspondant à la fin de la première phase de différenciation. Les prélèvements ont été utilisés d'une part, pour une analyse des ARNm (jour 14) et d'autre part, pour une analyse histologique (principalement jour 21, et jour 14). Plusieurs gènes clés de la différenciation chondrocytaire ont été étudiés. On observe une augmentation de la synthèse d'ARNm du gène SOX9 qui est le facteur de transcription central de cette différenciation. Celui-ci est exprimé initialement et sa synthèse est multipliée par quatre environ (Figure 23A). L'ARNm du collagène de type II (COL2A1) est également détecté à ce jour alors qu'il ne l'est pas au jour 0. Ce collagène, majoritaire dans le cartilage, est spécifique de ce tissu. La synthèse d'ARNm de l'aggrécan (AGG) est également augmentée quatorze jours après l'induction (Figure 23A). Ce gène code pour ce protéoglycane spécifique du cartilage. D'autres gènes ont été étudiés à ce temps d'arrêt, ils correspondent aux gènes impliqués dans la voie de différenciation endochondrale, ils seront détaillés par la suite. A ce stade, seul un faible dépôt de protéoglycanes sulfatés a été observé situé à la périphérie du prélèvement tandis que le centre est composé d'un tissu de type « nécrotique » (ce terme sera employé par facilité d'emploi, bien que la nécrose soit un processus biologique à part entière) (Figure 23B).

Au jour 21, les micromasses présentent un aspect inhomogène. Les zones périphériques et centrales présentent une forte affinité à la coloration Bleue Alcian (à pH 1) témoignant d'un important dépôt de protéoglycanes sulfatés (Figure 23B). Les colorations au Rouge Sirius montrent un fort dépôt dans les zones similaires à celles contenant les protéoglycanes (Figure 24A-C). Dans les régions centrales, ces zones matricielles côtoient des zones de type « nécrotique » persistantes. Sous lumière polarisée, les colorations Rouge Sirius mettent en évidence l'alignement des fibres de collagènes dans les zones périphériques tandis que les fibres présentes au niveau central montrent un réseau extrêmement dense, sans alignement (Figure 24D-F). Le marquage immunohistologique du collagène de type II corrobore cette topographie avec une intensité importante dans les zones centrales et périphériques (Figure 24G, H). A fort grossissement, on aperçoit des cellules au phénotype chondrocytaire avec des noyaux volumineux encapsulés dans une matrice riche en collagène de type II. Sur certaines sections histologiques, ces zones typiquement cartilagineuses sont en contact avec les zones de type « nécrotique » (Figure 24 I, J).



**Figure 23. Différenciation chondrocytaire des CSG. (A) L'analyse par qPCR montre que les gènes clés de la différenciation chondrocytaire (SOX9, ACAN et COL2A1) sont surexprimés au jour 14. Lors de la seconde phase de différenciation, ces gènes sont inhibés plus ou moins fortement. (B) Coloration au Bleu Alcian des micromasses. Les dépôts de protéoglycanes sont restreints à la périphérie au jour 14 tandis qu'ils se répandent dans le centre des sphères sous forme de plages volumineuses au jour 21.**

Après trois semaines de culture avec un milieu de différenciation chondrocytaire, les conditions ont été modifiées en utilisant un milieu induisant la différenciation terminale des chondrocytes. Ce milieu contient notamment de la L-thyroxine pour induire de manière chimique une hypoxie et du  $\beta$ -glycérophosphate pour la minéralisation de la MEC ; le TGF- $\beta_3$  est supprimé et la concentration en dexaméthasone est divisée par cent (cf. Matériels et méthodes). Les cellules sont cultivées pendant deux semaines dans ce milieu. Deux temps d'arrêts ont été réalisés : au jour 28, soit une semaine après la permutation de milieu, pour l'analyse des ARNm, et au jour 35 pour l'analyse histologique des micromasses.



**Figure 24.** Analyse du réseau de collagène au jour 21 après induction de la différenciation chondrocytaire. (A-F) Coloration au Rouge Picrosirius. Les micromasses montrent un réseau de collagène dense au niveau périphérique et central. Notez l'hyper densité de la zone centrale. (B) La coloration Rouge Sirius est visible en fluorescence (cf. Matériels et méthodes) mais aussi en lumière polarisée (E, F). (F) Les fibres de collagènes en périphérie montrent un réseau parallèle à la surface des sphères. La présence de couleurs différentes témoigne de la variabilité des diamètres des fibres et donc des types de collagènes. (G-J) Immunohistologie du collagène de type II. (G) Contrôle négatif. (H) La distribution du collagène de type II est comparable à celle révélée par la coloration au Rouge Picrosirius. (I) Fort grossissement de la zone centrale montrant des chondrocyte encapsulés dans la matrice cartilagineuse riche en collagène de type II. (J) Ces zones typiquement cartilagineuse côtoient des zones de type « nécrotique ». (z.n: zone nécrotique; z.c: zone cartilagineuse) (échelle: A, D: 100µm; C, E-H: 50 µm; I, J: 10 µm)

Plusieurs gènes associés à cette phase de différenciation ont été analysés. Les facteurs de transcription Indian HedgeHog (IHH), de RUNX2, essentiels pour cette phase de maturation sont surexprimés à ce temps d'arrêt alors que SOX9, induit dans la première phase de différenciation, l'est moins dans cette phase. La synthèse d'ARNm d'éléments spécifiques de la MEC des chondrocytes (pré-)hypertrophiques est également surexprimée. Ainsi, le collagène de type X (COL10A1), le collagène de type I (COL1A1) et la MMP-13 voient leur synthèse augmenter tandis que le COL2A1 et l'ACAN sont inhibés. Enfin, la synthèse du Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) est elle aussi augmentée (Figure 25). Le gène OSX a un comportement plus difficile à interpréter. En effet, il est surexprimé au jour 14, lors de la première phase d'induction chondrogénique et réprimé lors de la seconde phase d'induction ce qui est l'inverse de ce à quoi l'on pouvait attendre (Figure 26).

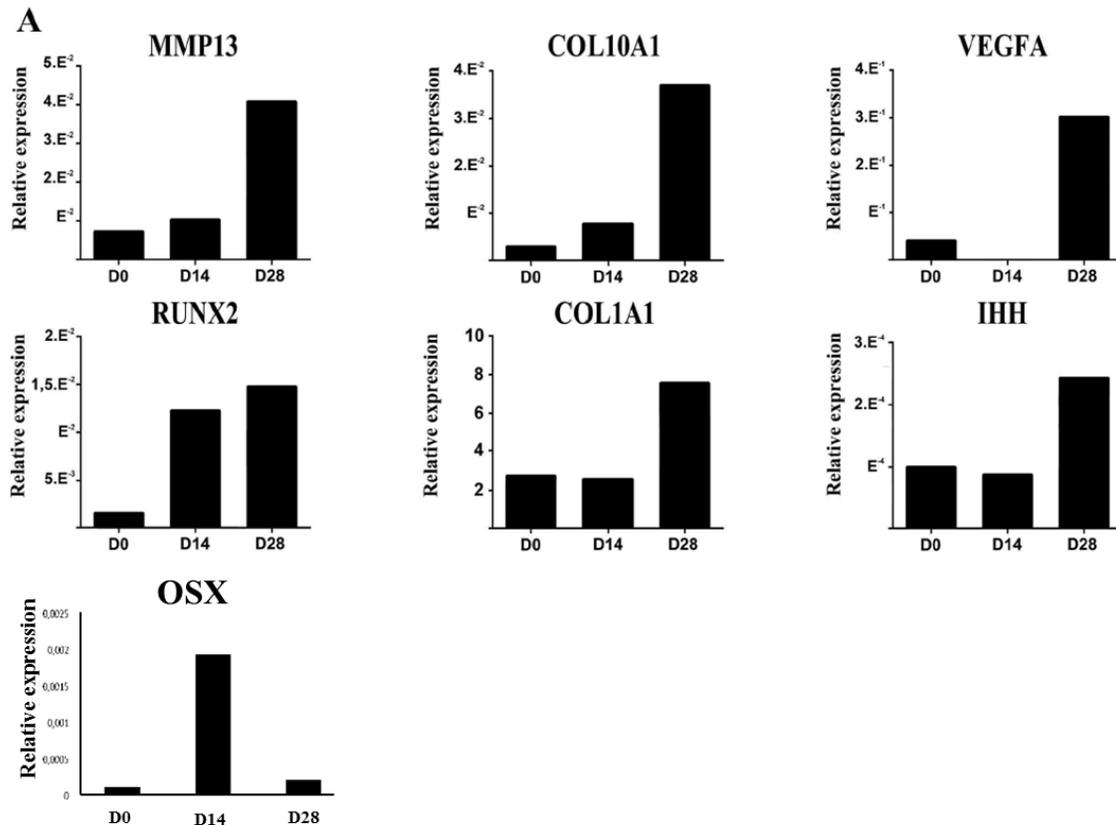
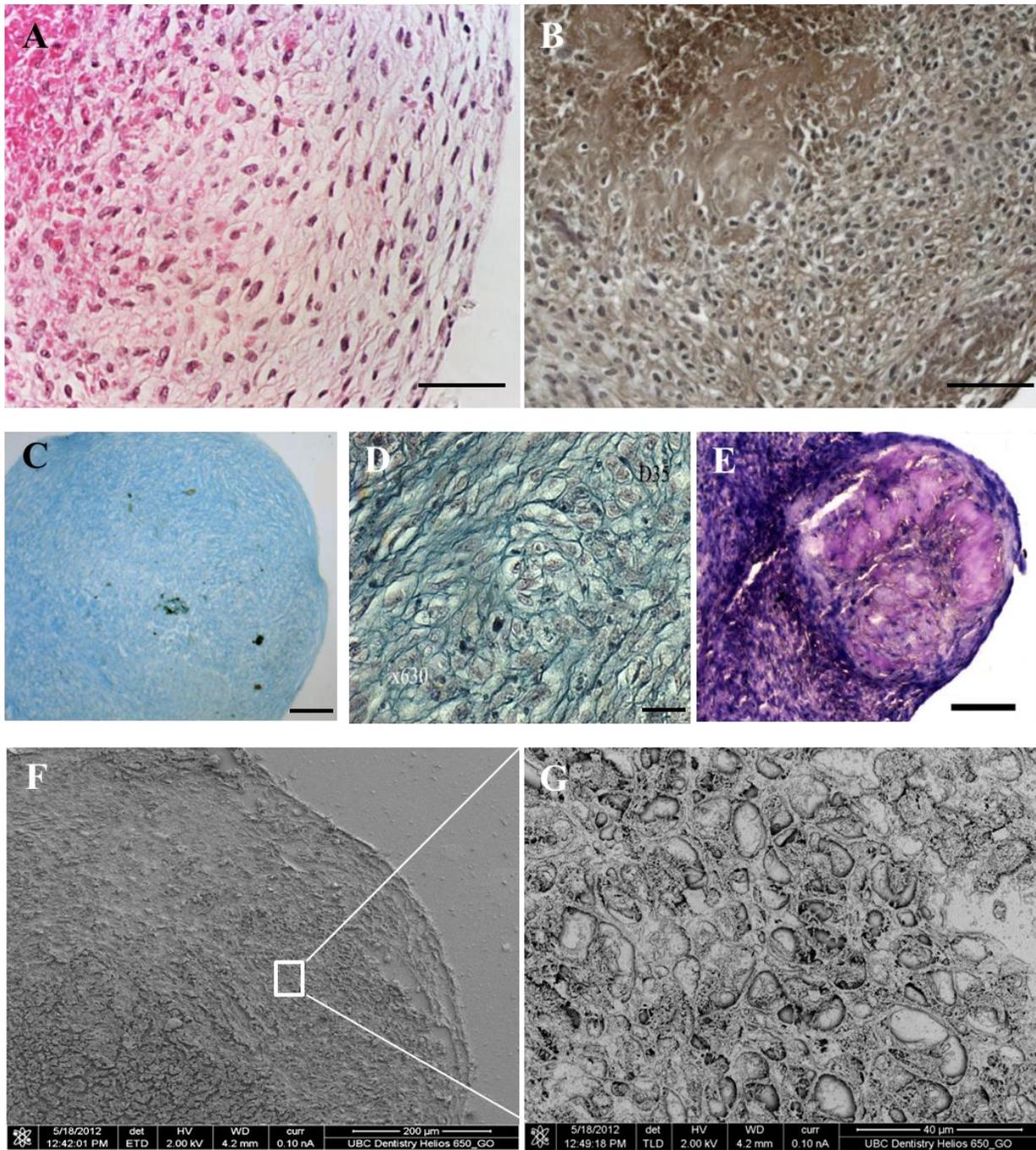


Figure 25. Étude de la synthèse des ARNm spécifiques de la voie de différenciation endochondrale par qPCR.

Au niveau histologique, les coupes ont été réalisées au jour 35, soit deux semaines après le changement de milieu. A ce jour, les cellules présentent un phénotype profondément modifié. Une grande partie de celles-ci a un aspect arrondi, parfois hypertrophique avec un volume nucléaire très augmenté (Figure 26A). L'aspect des sphères reste inhomogène avec la persistance de zones de type « nécrotique » et de zones cartilagineuses riches en protéoglycanes comme le montre la coloration au Bleu de Toluidine (Figure 26E) et de l'acide hyaluronique (Figure 26B). Les coupes au microscope électronique à balayage (MEB) mettent en évidence l'hypertrophie des cellules en forme de logettes entourées d'éléments matriciels (Figure 26F et G). Ces éléments correspondent à des protéoglycanes (coloration Bleu Alcian) (Figure 26C et D), et à des fibres de collagènes. L'immunohistologie des collagènes montre que ce réseau est composé de collagène de type II et de collagène de type X spécifique des chondrocytes (pré)hypertrophiques. Le marquage du type II fait apparaître des fibres fines correspondant à la structure de ce collagène : fibrillaire. Le type X, lui présente un marquage plus diffus, compatible avec sa structure mixte : globulaire principalement et fibrillaire (Figure 27).

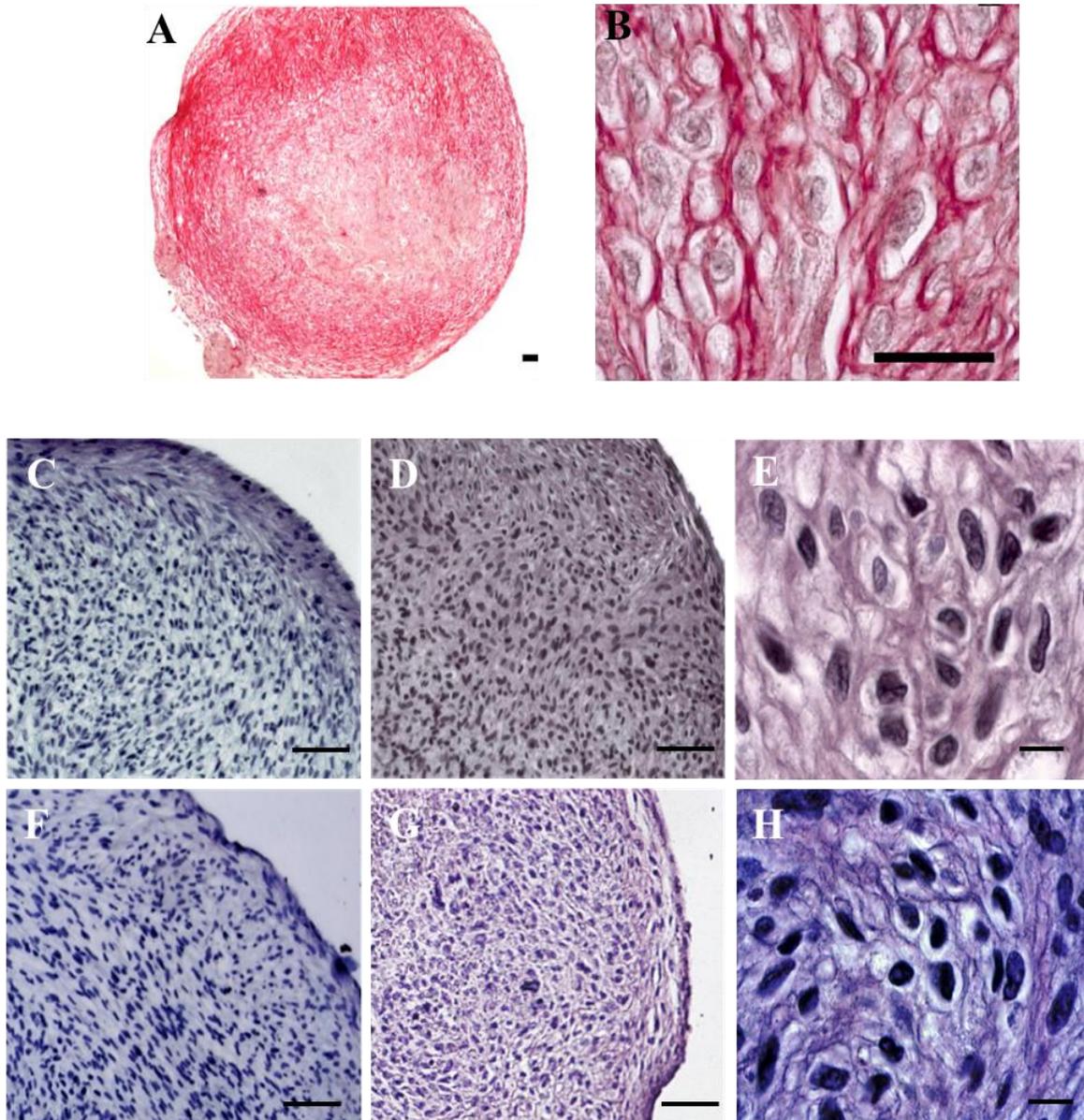
Ces résultats montrent que nous avons réussi à conduire nos cellules jusqu'à un stade (pré)hypertrophique ; cependant malgré l'adjonction de  $\beta$ -glycérophosphate, aucun dépôt minéralisé dans la matrice extra cellulaire n'a pu être mis en évidence. En effet, les colorations ARS et Von Kossa sont restées négatives. De même, aucune activité de la phosphatase alcaline n'a pu être détectée.

Au cours de ces expériences, plusieurs éléments ont retenu notre attention. Il s'agit tout d'abord de la présence en périphérie de cellules semblant présenter un phénotype particulier. Afin d'évaluer ce phénotype, nous avons réalisé, à partir du MEB, des grossissements important de cette zone. Les images montrent la présence d'une couche cellulaire perpendiculaire à la couche inférieure. Cette dernière est orientée différemment de la couche sous-jacente. Selon les coupes, les cellules de la couche externe forment des contacts étroits entre elles ou alors plus lâches (Figure 28A-D).



**Figure 26. Histologie des sphères au jour 35 après différenciation chondrocytaire. Après deux semaines de conditions d'hypoxie, le phénotype des cellules est profondément modifié. (A) La coloration hématoxyline-éosine montre des cellules de type (pré)hypertrophiques. (B) La matrice entourant ces cellules est riche en acide hyaluronique comme le montre le marquage à l'HABP. Notez la présence de zones cartilagineuses typiques au centre de la micromasse. (C) La coloration au Bleu Alcian montre la distribution des GAG. (D) La même coloration à fort grossissement. Les GAG se distribuent autour des cellules. (E) Coloration au Bleu de Toluidine. Notez la métachromasie de la zone cartilagineuse. (F) Vue réalisée par MEB. (G) A fort grossissement, on peut apercevoir les logettes formées par les cellules hypertrophiques. La MEC forme un réseau entourant ces cellules. (échelle: A: 50µm; B, C: 100 µm; D: 10 µm; E: 50 µm)**

Ces premiers résultats ont été confirmés par des colorations à l'hématoxyline. Cette coloration montre que les noyaux de la couche superficielle sont arrondis et s'orientent à 90° par rapport aux noyaux de la couche sous-périphérique qui présentent un aspect allongé (Figure 28E). Par ailleurs, cette orientation différentielle est corroborée au niveau du cytosquelette par marquage de la  $\beta$ -tubuline en immunofluorescence (Figure 28F).

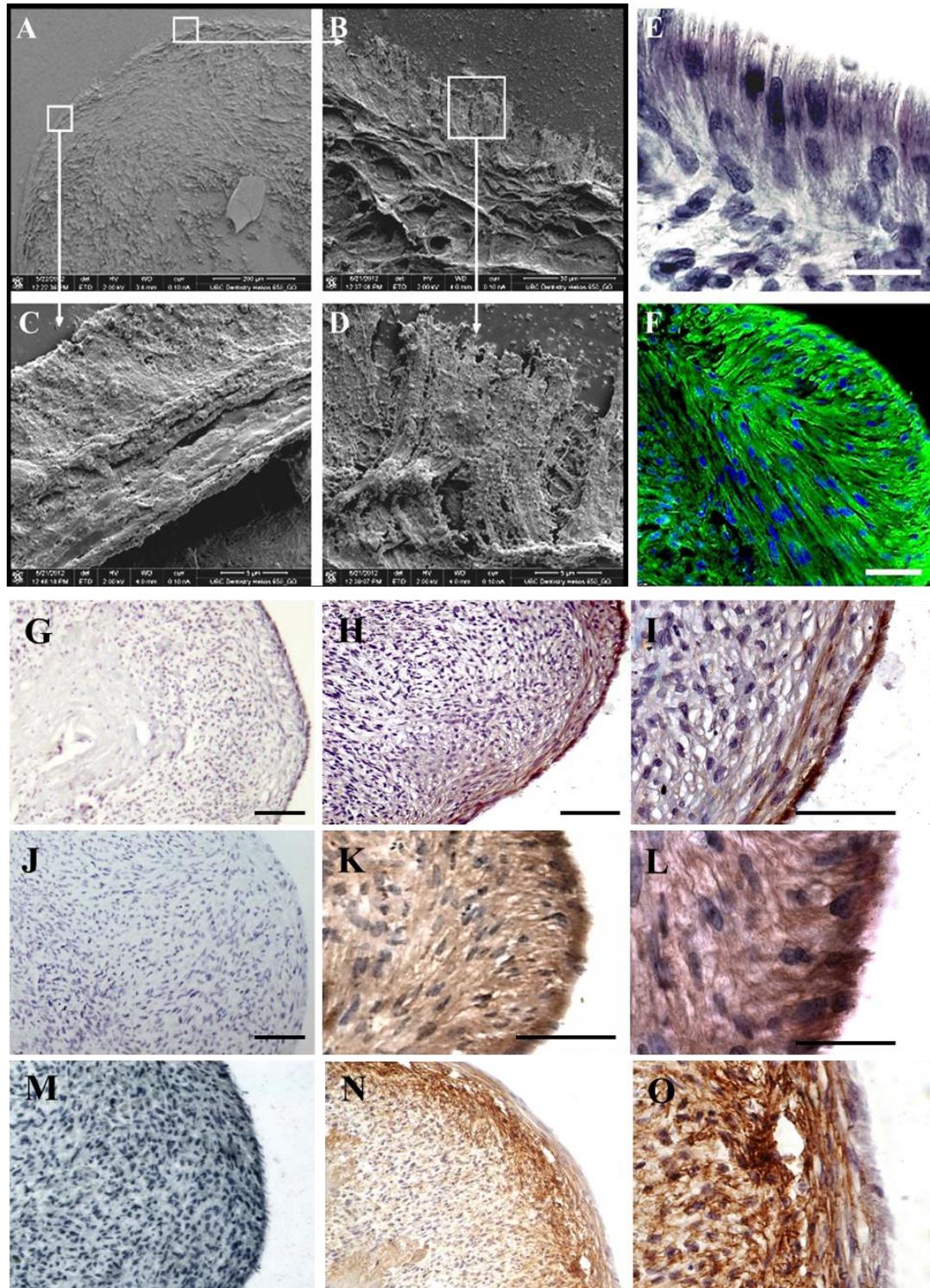


**Figure 27.** Analyse du réseau de collagène au jour 35 après différenciation chondrocytaire. (A, B) Coloration au Rouge Picrosirius. Les fibres de collagène forment un réseau maillé autour des cellules hypertrophiques. (C-E) Immunohistologie du collagène de type X. (C) Coloration au jour 21, avant induction de la différenciation terminale. Les micromasses sont très faiblement positives en périphérie. (D) Le collagène de type X est largement distribué dans les pelletes au jour 35. (E) A fort grossissement le marquage est diffus, compatible avec la structure en partie globulaire du collagène de type X. (F-H) Immunohistologie du collagène de type II. (F) Contrôle négatif. (G) Le collagène de type II persiste à ce temps d'arrêt. (H) A fort grossissement, le marquage montre un réseau fibrillaire<sup>92</sup> entourant les cellules. (échelle: A: 200  $\mu$ m; B: 20  $\mu$ m; C,D,F,G: 50  $\mu$ m; E,H: 10 $\mu$ m)

Étant donné le phénotype de ces cellules et le fait que les sphères ont été soumises à des conditions de chondrogénèse, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules correspondaient à des synoviocytes de type fibroblastique. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un marquage de la cadhérine-11 (OB-cadherin, CDH-11). En effet, cette cadhérine est spécifique de ce type de synoviocytes et est nécessaire à la formation de la membrane synoviale des articulations synoviales (132). Le marquage est très intense au niveau de la couche externe et est positif également au niveau de la couche sous-périphérique (Figure 28G-I). Ces cellules sont positives à la CDH-11 dès le quatorzième jour et se retrouvent au jour 21. Cependant, au jour 35, la couche périphérique est drastiquement diminuée. Ces cellules sécrètent une grande quantité d'acide hyaluronique (Figure 28J-L). Par ailleurs, le collagène de type IV, que l'on retrouve *in vivo* au niveau de la pseudo-membrane basale séparant la membrane synoviale du cartilage est positif au niveau de la couche sous-périphérique (Figure 28M-O).

Si la couche périphérique est principalement composée d'une monocouche cellulaire, dans certaines zones, on peut retrouver trois à cinq strates cellulaires. Dans ces zones nous avons pu mettre en évidence que de nombreuses cellules étaient positives à l' $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA) concordant avec un phénotype synoviocyte myofibroblastique (Figure 29). Ce phénotype est retrouvé en physiopathologie dans les cas de dégénérescence articulaire (cf. discussion).

Ces résultats surprenant manifestent la capacité des CSG à s'organiser, à répondre à des signaux de manière différentielle au sein des sphères. Cette étonnante plasticité permet à la couche la plus périphérique de se polariser, d'acquérir un phénotype différent de la couche sous-périphérique, lui-même différent de la couche sous-jacente. Afin de mieux comprendre les événements précoces qui permettent la compartimentation de ces micromasses ainsi que le rôle du gène SOX9 dans cette compartimentation, nous avons repris les expériences en inhibant, sur deux souches, ce gène par ARN interférant (ARNi) et en les comparant avec les mêmes souches non modifiées (mock). La quantification de la synthèse des ARNm 24 heures après la transfection montrent une diminution de l'ordre de 60% (Figure 30A). Nous avons réalisé deux temps d'arrêts aux jours 7 et 14.



**Figure 28. Différenciation en synoviocytes de type fibroblastique des CSG au jour 21. (A-B) Vue au MEB de la périphérie des micromasses. La couche cellulaire la plus externe est orientée perpendiculairement à la couche sous-périphérique. Les cellules de cette couche sont soit jointives (C) soit forment des contacts plus lâches entre elles. (E) La coloration à l'hématoxyline confirme les résultats obtenus par le MEB et montre une orientation différentielle des noyaux selon les couches. (F) L'immunohistologie de la  $\beta$ -tubuline corrobore les précédentes colorations par la mise en évidence de l'orientation du cytosquelette. (G-I) Immunohistologie de CDH-11. (J-L) Immunohistologie de l'acide hyaluronique. (M-O) Immunohistologie du collagène de type IV. (G, J, M) Contrôles négatifs. Notez la forte coloration de CDH-11 au niveau de la couche cellulaire externe. La coloration de l'AH est plus diffuse mais plus intense pour la couche externe. Le collagène de type IV se distribue dans la couche sous-périphérique. (échelle: E: 10  $\mu$ m; L: 25  $\mu$ m; F-O: 50,  $\mu$ m)**

Au premier temps d'arrêt, nous avons pu observer que la régionalisation des pellettes étaient déjà mise en place. Notamment, la zone de type « nécrotique » est déjà clairement délimitée (Figure 30B). Sur des coupes sériées, nous avons pu mettre en évidence que cette zone n'était pas restreinte aux centres des micromasses mais est également présente près de la périphérie. Les micromasses inhibées pour le gène SOX9, de même diamètre que les pellettes mock, elles, ne présentaient pas de régions centrales de type « nécrotique ». L'ensemble de ces résultats nous a poussé à réévaluer notre interprétation de ces zones. Alors que jusqu'à maintenant, l'hypothèse la plus probable pour expliquer ces régions de type « nécrotique » était le manque de nutriment provoquant la mort cellulaire, nous avons émis l'idée selon laquelle des processus d'apoptose interviendraient dans cette région. Les marquages à l'apoptag® ont confirmé cette hypothèse : de nombreuses cellules étaient marquées. Par ailleurs des cellules au sein de la zone intermédiaire étaient également marquées mais pas en périphérie des micromasses. Les pellettes qui ont été inhibées pour le gène SOX9 ne présentaient pas de cellules apoptotiques, suggérant son rôle dans les morts cellulaires programmées. Nous avons par la suite évalué la présence de cellules prolifératives dans les pellettes (Figure 30C). Le marquage au Ki67 est positif au niveau

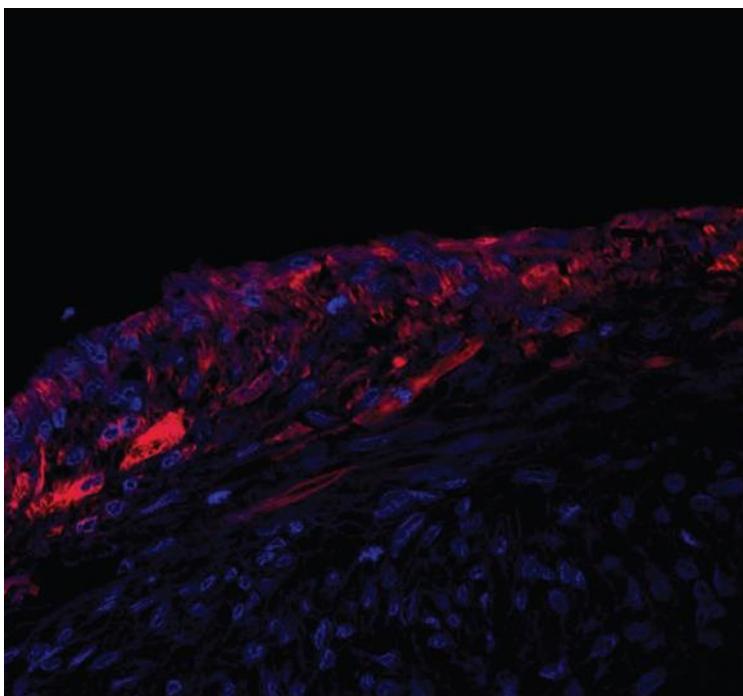


Figure 29. Immunohistologie de l'ASMA. Dans certaines zones de la couche synoviale, le nombre de strates cellulaires est augmenté et contient dans ce cas des cellules positives à l'ASMA. (échelle: 25µm)

de la périphérie et dans les zones intermédiaire, de manière radiale, et négative dans le centre des sphères mock (Figure 30D). Pour les pellettes inhibée en SOX9, ce marquage est également positif et se répartit à la périphérie ainsi qu'au centre des pellettes. Ces marqueurs d'apoptose et de prolifération ont été retrouvés au jour 7 mais pas au jour 14, mettant en évidence la précocité des processus de compartimentation au cours de cette différenciation.

Etant donné que le TGF- $\beta$  est un puissant inducteur de la différenciation chondrogénique mais également myofibroblastique, nous avons voulu évaluer la présence de ces cellules dans nos micromasses. Au jour 14, les pellettes contrôles ne montraient pas de marquage à l'ASMA alors que les pellettes où le gène SOX9 est inhibé montraient un fort marquage pour cet anticorps (Figure 30E, F). De manière surprenante, dans ces mêmes pellettes, certaines zones montraient la présence de cellule arrondies avec phénotype évocateur de chondrocytes préhypertrophiques sans que des dépôts de matrice cartilagineuse ne puissent être mis en évidence. Ce phénotype n'a pu être retrouvé dans les micromasses mock au même temps d'arrêt. Seul les pellettes soumises à des conditions d'hypoxie ont présenté un phénotype similaire (Figure 30G, H). Ces résultats témoignent du rôle central de SOX9 dans la différenciation chondrocytaire des CSG, orientant leur différenciation cellulaire mais également dans l'organisation des tissus.

### **III.7. Utilisation du fibroblaste gingival comme outil de diagnostic moléculaire**

La facilité de prélèvement de la gencive, sa quasi innocuité algique et esthétique en font un tissu propice pour des analyses moléculaires. En effet, certaines pathologies nécessitent un prélèvement cellulaire afin de retrouver une mutation génétique et ainsi établir un diagnostic de certitude de la maladie. Au cours d'une étude clinique concernant les manifestations orales de la maladie d'Ehlers-Danlos de type vasculaire (25), nous avons été amenés à réaliser deux biopsies gingivales afin de retrouver des mutations qui n'avaient pu être détectée par ADNg dans l'une et qui avait été détectée dans l'autre au niveau intronique et qui ne pouvait pas expliquer la dysfonction de la protéine.

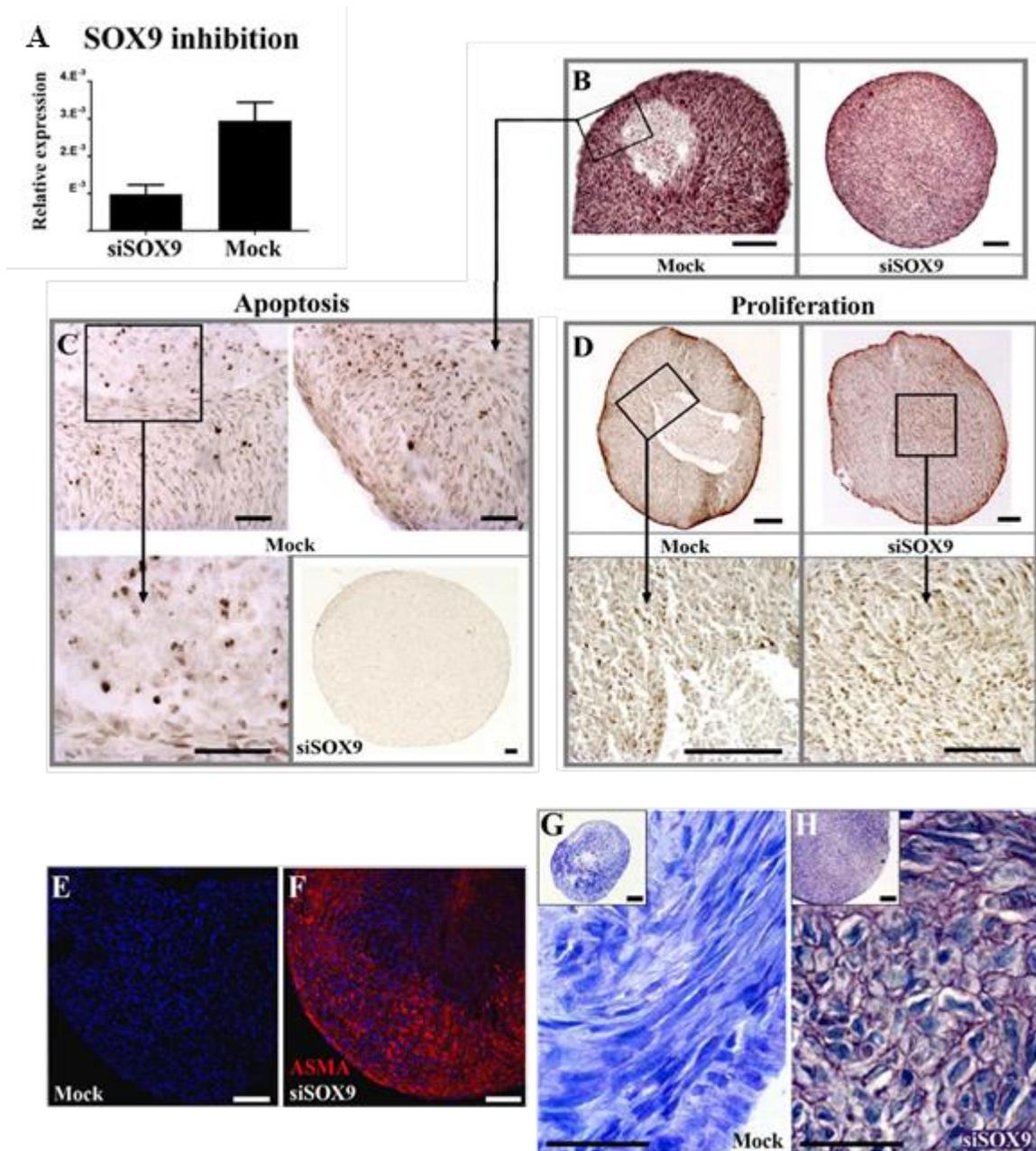
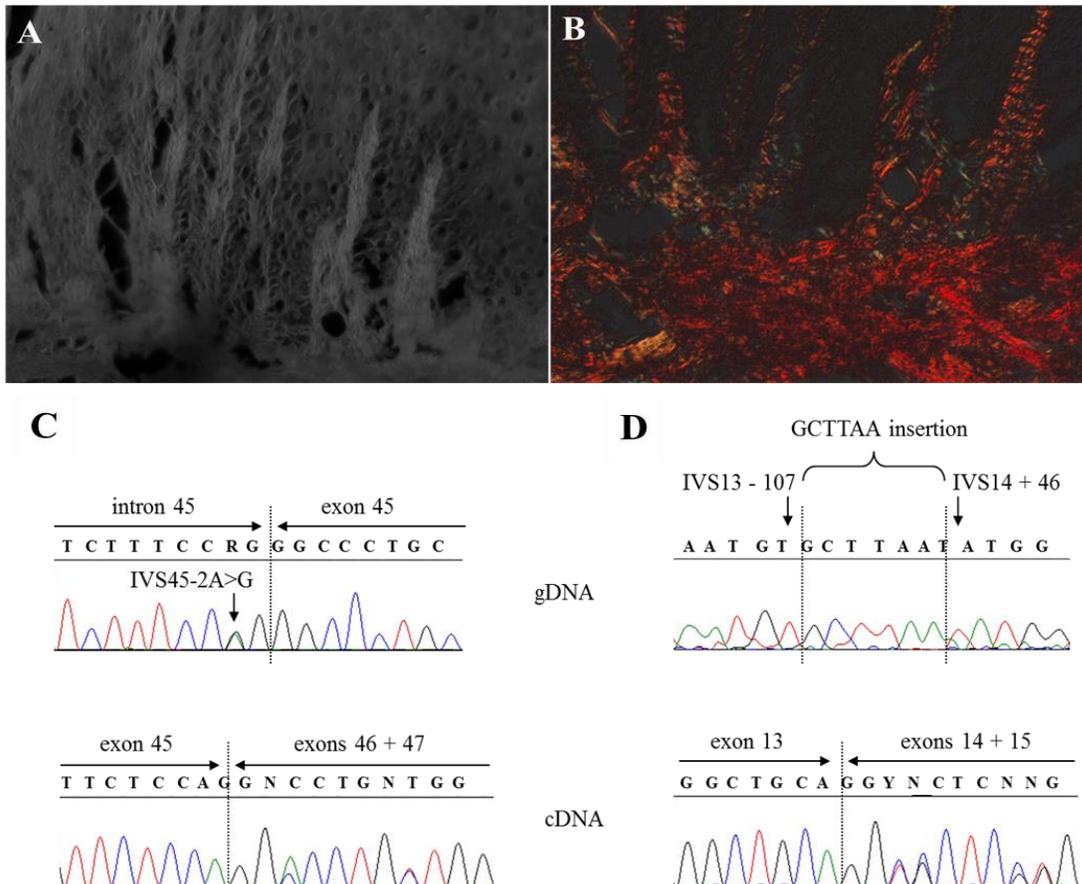


Figure 30. Rôle de SOX9 dans la régulation de la morphogénèse des micromasses cartilagineuses. (A) qPCR de l'expression de SOX9 après inhibition par ARNi. (B) Les colorations à l'hématoxyline-éosine montrent la présence d'une compartimentation dès le jour 7 avec l'apparition d'une zone de type « nécrotique ». (C) Le test TUNEL au jour 7 montre l'abondance de cellules apoptotiques dans les zones de type « nécrotique » tandis que les pelletes inhibées pour le gène SOX9 sont négatives. (D) Evaluation de la prolifération par marquage au Ki67 au jour 7. Les pelletes sont positives en périphérie mais les zones de type « nécrotique » ne présentent pas de cellules prolifératives. Les micromasses modifiées sont positives à la périphérie mais également au centre. (E, F) Les pelletes inhibées pour le gène SOX9 présentent une grande quantité de cellules myofibroblastiques comme l'indique le marquage à l'ASMA alors que les pelletes contrôles en sont dépourvues (jour 14). (G, H) La coloration au Bleu de Toluidine révèle la présence de cellules de type préhypertrophique dans les micromasses modifiées, ce qui n'est pas le cas pour les sphères contrôles. (échelle: B, D, E and F: 100  $\mu$ m; C, G and H: 50  $\mu$ m).

Par séquençage génétique de la première, nous avons pu mettre en évidence que la mutation retrouvée sur l'ADNg intronique était en fait responsable du saut de l'exon 46 conduisant à la délétion de 18 aminoacides au niveau de la protéine. Pour la seconde mutation, nous avons pu retrouver une mutation rare correspondant à une délétion hétérozygote de 54 paires de bases concernant l'intron 14 et d'une partie de l'intron 13 résultant en la perte de 15 aminoacides (p.Ala319\_Gly333del). De plus, nous avons identifié l'insertion de 6 paires de bases au niveau de l'exon 45(45delinsGCTTAA) (Figure 31). Cette mutation n'avait pu être détectée sur l'ADNg car elle concernait la séquence correspondante à la sonde. Ces résultats montrent l'intérêt du FG pour le diagnostic des maladies rares.



**Figure 31. Analyses histologique et moléculaire de patients atteints de la maladie d'Ehlers-Danlos de type vasculaire. (A, B) Le réseau de collagène est visualisé par la fluorescence (A) et par la lumière polarisée (B) de la coloration au Rouge Picrosirius. (Grossissement: x125). (C, D) Électrophorégramme du *COL3A1* sur l'ADN génomique (ADNg) et complémentaire (ADNc) de deux patients. (C) Premier patient, en haut: la mutation IVS45-2A>G dans le site accepteur d'épissage de l'intron 45 est détectée sur l'ADNg. En bas: Conséquence de la mutation sur l'ARNm: le séquençage direct de l'ADNc montre le saut de l'exon 46 (54 paires de bases) conduisant à la perte de 18 aminoacides de la protéine (p.Ala1124\_Pro1141del). (D) Second patient, en haut: mutation IVS13-106\_IVS14+45delinsGCTTAA, détectée sur l'ADNg. En bas: conséquence de la mutation sur l'ARNm: le séquençage direct de l'ADNc montre le saut de l'exon 14 conduisant à une perte de 15 aminoacides de la protéine (p.Ala319\_Gly333del).**

## IV. DISCUSSION

- La gencive contient des cellules souches mésenchymateuses

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que les CSG présentait des propriétés communes aux cellules souches adultes. Leur capacité à former des CFU-F, à présenter des marqueurs de cellules souches, à pouvoir se différencier dans divers lignages, sont autant de preuves de leur potentiel souche. Par ailleurs, la détection de marqueurs spécifiques des crêtes neurales, la possibilité de les cultiver en neurosphères et l'expression de la nestine lorsqu'elles sont dans ces conditions confirment leurs origines embryonnaires. Nous avons ainsi montré que le tissu conjonctif gingival contenait des cellules souches adultes multipotentes dérivées des crêtes neurales.

Au cours de cette thèse, des travaux issus d'autres laboratoires ont montré des résultats similaires. Du côté de leur multipotence, plusieurs expériences sur des modèles animaux ont été réalisées. Elles montrent que ces cellules peuvent aider à la régénération de tissus parodontaux (133) ainsi que des tissus osseux sur des modèles de défauts mandibulaires. Dans cette dernière étude, il est intéressant de noter que les CSG injectées avec un support d'hydroxyapatite/phosphate tricalcique étaient capables de former un véritable tissu osseux seulement au sein de la mandibule alors qu'une simple matrice minéralisée était produite dans des injections sous-cutanées (134). Ces résultats se rapprochent de nos observations.

Il a par ailleurs été mis en évidence que ces cellules présentait des propriétés immunomodulatrices très intéressantes. Elles ont ainsi montré une amélioration dans la symptomatologie des colites induites (135), des mucites chimio-induites (136), de l'inflammation associée à la cicatrisation de plaies cutanées (137) et dans des modèles d'ostéoarthrites expérimentales (138). Ces capacités anti-inflammatoires agissent tant au niveau du système inné qu'adaptatif. Dans les modèles de cicatrisation cutanée, il par exemple été montré que les CSG favorisaient l'activation des macrophages de type 2, ayant un rôle anti-inflammatoire par leur sécrétion d'IL-10 (137). Sur le système adaptatif, elles ont montré qu'elles étaient capables de synthétiser des facteurs immunosuppresseurs, tel que l'IDO ou encore la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) qui réduisent la prolifération des lymphocytes (135). Sur les modèles de d'arthrites induites chez la

souris, la transfusion de CSG diminue la sévérité de la maladie en affaiblissant le taux de synthèse de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL-17 ou l'IFN- $\gamma$  et en augmentant le nombre de cellules T régulatrices FoxP3+, et ceci tant au niveau de la rate et des nœuds lymphatiques qu'au niveau du liquide synoviale des articulations atteintes (138).

- Différenciation chondro/endochondrale des GSC

Au cours de ces expériences de différenciation chondro/endochondrale, nous avons pu mettre en évidence que nos sphères étaient capables de s'organiser entre elles, offrant une compartimentation précoce des différentes zones. Ainsi, la capacité à former une couche cellulaire périphérique polarisée avec un phénotype synoviocytaire n'avait jamais été décrite auparavant. La couche sous-périphérique, orientée perpendiculairement à celle la plus superficielle, mime la zone sub-intimale du synovium. Le centre de nos sphères montre la formation de zones typiquement cartilagineuses. La capacité à se différencier, à partir d'un seul type cellulaire, dans de multiples lignages appartenant à l'articulation, démontre la grande plasticité cellulaire des CSG.

Cette capacité de différenciation multiple est en partie liée aux conditions de cultures. L'utilisation de cellules à des passages précoces est déterminante. Par ailleurs, l'absence totale de contact entre les cellules et les tubes à essais est capitale pour obtenir une différenciation de la couche cellulaire périphérique. En effet, lorsque les micromasses formaient des contacts, même faibles, avec le tube, la polarisation de la couche externe était absente. Ces constats semblent indiquer que la polarisation est liée en partie à une situation spatiale qui autorise les cellules de la couche périphérique à des contacts cellules-cellules sur une partie restreinte de leur surface.

Au cours du développement, les articulations se forment dans les zones de cartilages primordiaux appelées anlagen (119, 139). Dans ces territoires présomptifs, une partie des chondrocytes se dédifférencient reprenant une forme allongée et remplaçant la synthèse du collagène de type II par du type I. Ces cellules indifférenciées prolifèrent et forment une interzone. Les cellules de cette interzone vont par la suite se différencier en synoviocytes et sécréter le liquide synovial contenant notamment de l'acide hyaluronique. Ces sécrétions vont permettre de générer la cavité synoviale (139). Il reste encore de nombreuses zones d'ombre sur les mécanismes moléculaires sous-tendant ces

processus de différenciation. Il semble néanmoins acquis que la cadhérine-11 est indispensable à la formation et à la maintenance du tissu (132). A l'âge adulte, le tissu synovial contient des CSM (140, 141). Ces cellules ont un potentiel de prolifération contrairement aux chondrocytes articulaires et peuvent se différencier en chondrocyte afin de maintenir l'homéostasie du cartilage. C'est par ailleurs au niveau des synoviocytes de type fibroblastique que s'initie les processus d'ostéoarthrites et d'arthrites inflammatoires (142). Dans ce processus pathologique, les cellules inflammatoires vont initier une modification du phénotype synoviocytaire, devenant plus nombreux, agressifs et infiltrant les tissus cartilagineux. Au cours de ce processus, certains d'entre eux acquièrent un phénotype myofibroblastique (143). Ce double potentiel, régénératif/pathologique est une caractéristique que l'on retrouve au niveau de l'ensemble des CSM. Il est intéressant de noter que dans notre modèle de différenciation, la plupart des cellules prolifératives se situent au niveau de la couche synoviocytaire et que dans certaines zones de cette couche, des épaissements ont été retrouvés avec la présence de cellules de type myofibroblastique. Ces observations montrent qu'il reste encore à améliorer le protocole afin de stabiliser la différenciation synoviocytaire. Une autre limite de notre modèle est l'absence de synoviocytes de type macrophagique qui normalement participent à la constitution de la membrane synoviale.

Au cours de ces expériences de différenciation en micromasses, nous avons pu mettre évidence certains processus mimant ceux intervenant dans la chondrogenèse native ou reproduite dans les expériences de différenciation utilisant des CSE ou des iPS (144, 145). Ainsi, l'alignement des fibres de collagène, parallèles entre elles et à la surface des sphères est caractéristique des cartilages natifs et est retrouvé également lors de la différenciation chondrogénique des iPS (127). La présence de cellules apoptiques au cours des premiers jours de différenciation a déjà été décrite dans ce même type de différenciation utilisant des CSE (146).

Les expériences de différenciation durant lesquelles le gène SOX9 a été inhibé, ont montré le rôle capital de ce facteur de transcription dans les processus de différenciation et de compartimentation des microsphères. Le fait d'avoir obtenu de nombreux myofibroblastes après deux semaines d'induction montre que l'effet du facteur TGF- $\beta$ , puissant inducteur dans la différenciation des cellules dérivées des crêtes neurales

(147) est modulé en fonction des conditions de culture et de la synthèse de facteurs de transcription. Il serait intéressant d'étudier si cette différenciation se réaliserait dans les mêmes conditions avec des cellules dérivées d'autres feuillets primordiaux, par exemple avec des CSMMO.

Un autre élément intéressant mis en évidence par cette expérience est la présence de cellules au phénotype préhypertrophique dès le jour 14. Cette différenciation se présente comme si une étape de la chondrogenèse avait été outrepassée. Dans une étude *in vivo*, avec des souris invalidées pour le gène SOX9, après condensation des cellules mésenchymateuse, ces modèles murins présentaient de graves défauts dans l'élaboration des os (120). Elles présentent un faible contingent de cellules chondrocytaires hypertrophiques capables de produire une matrice minéralisée réduite. Ces résultats montrent une certaine similitude avec nos expériences *in vitro*. Cependant, dans cette étude, ces graves modifications morphotypiques s'accompagnent d'une augmentation de l'apoptose. Or dans nos expériences, nous avons une diminution du nombre de cellules apoptotiques. Il n'est pas impossible que la différence d'origine embryonnaire de ces deux types de cellules explique leur comportement différent. Cependant d'autres études sont nécessaires afin d'élucider ces comportements.

Une autre donnée importante apportée par les expériences de différenciation endochondrale est la capacité évidente des CSG de pouvoir suivre un programme de chondrogénèse aboutissant à une différenciation en chondrocytes hypertrophiques, capables de synthétiser du collagène de type X. Il nous semble que c'est la première fois que des travaux mettent en évidence une telle différenciation à partir de cellules adultes dérivées des crêtes neurales. Il est intéressant de noter que cependant, même en présence de facteurs favorisant la minéralisation de la matrice extra-cellulaire ( $\beta$ -glycérophosphate), aucun dépôt minéralisé ni même d'activité phosphatase-alkaline n'ont pu être mis en évidence malgré un protocole identique à celui utilisé pour les CSMMO (128). Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord et comme mentionné ci-dessus, l'origine embryonnaire peut nécessiter des protocoles quelque peu différents qui permettraient une telle minéralisation. Il est également concevable que malgré la capacité de nos cellules à reproduire l'ensemble des processus développementaux de la différenciation endochondrale, la dernière étape de

cette différenciation ne puisse être accomplie par les CSG. Les résultats de PCR ont montré que le gène *OSX* avait une régulation incohérente au regard des étapes de différenciation normalement induites par les milieux utilisés. En effet, une surexpression intervient au jour 14 lors de la chondroinduction initiale tandis que son expression est inhibée lors de la phase d'induction endochondrale, l'inverse était attendu. L'aberration de cette cinétique peut être à l'origine de ce défaut de différenciation terminale. Ces interprétations sont appuyées par le constat d'une absence de minéralisation dans nos cultures d'ostéodifférenciation en monocouche parallèle à une absence de surexpression du gène *OSX*, lorsque les cellules sont utilisées à des passages tardifs. Par ailleurs, des données clinico-biologiques récentes ont montré que les patients porteurs d'une mutation du gène *FAM20A* présentaient des calcifications pathologiques de la gencive (148). L'activité de ce gène, à priori inhibiteur de minéralisation, à l'état normal pourrait empêcher la différenciation terminale des CSG induites. Malgré l'incapacité des CSG à minéraliser leur matrice environnante dans les conditions d'hypoxie, elles ont montré leur faculté à synthétiser du VEGF. Cette synthèse pourrait permettre *in vivo* la vascularisation des greffons ectopiques préalable à une minéralisation secondaire par l'invasion des ostéoblastes.

Les résultats que nous avons obtenus avec les souches palatines sont particulièrement probants avec des différenciations très efficaces. Des études provenant d'autres équipes ont mis en évidence la présence d'une niche à cellules souches gingivales au niveau du palais. Cette niche est décrite au niveau des rugosités du palais et de la papille rétroincisive et plus particulièrement au niveau des corpuscules de Meisner et des complexes de Meckel qui sont des structures cellulaires à l'interface entre le tissu conjonctif et l'épithélium (149, 150). Ces cellules présentent, des marqueurs de cellules souches embryonnaires tel *Klf4*, *c-Myc*, *Oct4A*, *Sox2* (ARNm) et des marqueurs de crête neurale notamment *p75<sup>NTR</sup>*. Elles peuvent être cultivées en suspension sous forme de neurosphères et se différencier dans des lignées mésodermiques et ectodermiques. Par ailleurs, lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée de souris immunodéficientes, elles sont capables de former des tératomes avec des tissus dérivant des feuilletts embryonnaires neuroectodermique et mésodermiques (150). La capacité qu'ont montrée nos cellules à s'organiser au sein des sphères, à se différencier dans différents types

cellulaires d'un même organe et notamment à former une ligne cellulaire polarisée de phénotype synoviocytaire sont autant d'observations qui vont dans le sens des études citées ci-dessus.

- Perspectives

Il est évident que d'autres études sont à envisager pour améliorer la compréhension des CSG et des cellules souches adultes en général. La suite logique des expériences de différenciation chondro/endochondrale serait de tester *in vivo* leur capacité à former des tissus cartilagino-osseux dans des sites hétérotopiques. Il serait intéressant également de voir si ces cellules différenciées permettent de restaurer des défauts ostéoarticulaires et selon quels mécanismes. Un autre axe de recherche est également envisageable : ayant montré qu'il était possible de mimer *in vivo* la chondrogenèse à partir de ces cellules, et que par ailleurs, nous avons montré que les FG pouvaient servir d'outils aux diagnostics moléculaires, il pourrait être intéressant d'étudier le comportement de ces cellules dans ces protocoles de différenciation en utilisant des cellules de patients atteints de mutations génétiques affectant la morphogénèse cartilagineuse comme dans le cas des chondrodysplasies ou encore des dysplasies campoméliques. Des aberrations pourraient être mises en évidence et des traitements pharmacologiques, cellulaires ou génétiques pourraient être évalués.

L'étude de la niche gingivale en tant que source de cellules multipotentes, voire pluripotente doit être également poursuivie. Le nombre accru de publications concernant ces cellules montre l'intérêt croissant pour cette dernière en vue d'applications thérapeutiques. Leur multipotence certes, mais également leur facilité de prélèvement, leur rapide propagation *in vitro*, leur stabilité chromosomique et leur fort pouvoir immunosuppresseur en font une cellule d'avenir dans l'arsenal thérapeutique au cours des décennies à venir. Il faut cependant encore améliorer la localisation de cette niche, les méthodes de prélèvements, d'expansion *in vitro* et la fiabilité/efficacité de leur différenciation pour atteindre les objectifs d'une thérapie cellulaire efficace.

## RÉFÉRENCES

1. Carrel A, Ebeling AH. Age and Multiplication of Fibroblasts. *J Exp Med*1921 Nov 30;34(6):599-623.
2. Carrel A, Ebeling AH. The Multiplication of Fibroblasts in Vitro. *J Exp Med*1921 Sep 30;34(4):317-37.
3. Carrel A, Ebeling AH. The Fundamental Properties of the Fibroblast and the Macrophage : I. The Fibroblast. *J Exp Med*1926 Jul 31;44(2):261-84.
4. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 20002000 Oct;24:28-55.
5. Fournier BP, Larjava H, Hakkinen L. Gingiva as a Source of Stem Cells with Therapeutic Potential. *Stem Cells Dev*2013 Aug 14.
6. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 20002000 Oct;24:127-52.
7. Gabbiani G. The biology of the myofibroblast. *Kidney Int*1992 Mar;41(3):530-2.
8. Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol*1996 Sep;15(4):251-61.
9. Murakami S, Hino E, Shimabukuro Y, Nozaki T, Kusumoto Y, Saho T, et al. Direct interaction between gingival fibroblasts and lymphoid cells induces inflammatory cytokine mRNA expression in gingival fibroblasts. *J Dent Res*1999 Jan;78(1):69-76.
10. Saho T, Kishida T, Hirano H, Hashikawa T, Shimabukuro Y, Murakami S. Induction of CD13 on T-lymphocytes by adhesive interaction with gingival fibroblasts. *J Dent Res*2003 Nov;82(11):893-8.
11. Sundararaj KP, Samuvel DJ, Li Y, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, Huang Y. Interleukin-6 Released from Fibroblasts Is Essential for Up-regulation of Matrix Metalloproteinase-1 Expression by U937 Macrophages in Coculture: CROSS-TALKING BETWEEN FIBROBLASTS AND U937 MACROPHAGES EXPOSED TO HIGH GLUCOSE. *J Biol Chem*2009 May 15;284(20):13714-24.
12. Bateman JF, Boot-Handford RP, Lamande SR. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat Rev Genet*2009 Mar;10(3):173-83.
13. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol*2011 Jan;8(1):42-54.
14. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*2000 Oct;43(10):2230-9.
15. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 20002010 Feb;52(1):163-206.
16. Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res*2007 Sep 1;75(4):640-8.
17. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*2002 Oct 1;99(20):12877-82.
18. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*2006 Jul;2(7):e119.
19. McKeown ST, Hyland PL, Locke M, Mackenzie IC, Irwin CR. Keratinocyte growth factor and scatter factor expression by regionally defined oral fibroblasts. *Eur J Oral Sci*2003 Feb;111(1):42-50.

20. Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2003 Feb;38(1):90-6.
21. Guo F, Carter DE, Leask A. Mechanical tension increases CCN2/CTGF expression and proliferation in gingival fibroblasts via a TGFbeta-dependent mechanism. *PLoS One* 2011;6(5):e19756.
22. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000 1997 Feb;13:91-120.
23. Chavrier C, Couble ML, Magloire H, Grimaud JA. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. *J Periodontol* 1984 May;19(3):221-9.
24. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):1852-6.
25. Ferre FC, Frank M, Gogly B, Golmard L, Naveau A, Cherifi H, et al. Oral phenotype and scoring of vascular Ehlers-Danlos syndrome: a case-control study. *BMJ Open* 2012;2(2):e000705.
26. Chavrier C, Couble ML, Magloire H, Grimaud JA. Immunohistochemical localization of type I, III and IV collagen in healthy human gingiva. *J Biol Buccale* 1981 Sep;9(3):271-7.
27. Narayanan AS, Engel LD, Page RC. The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. *Coll Relat Res* 1983 Jul;3(4):323-34.
28. Svoboda EL, Shiga A, Deporter DA. A stereologic analysis of collagen phagocytosis by fibroblasts in three soft connective tissues with differing rates of collagen turnover. *Anat Rec* 1981 Apr;199(4):473-80.
29. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 2000 Oct;24:9-27.
30. Larjava H, Hakkinen L, Rahemtulla F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. *Biochem J* 1992 May 15;284 ( Pt 1):267-74.
31. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991 Mar 8;64(5):867-9.
32. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol* 2000 Sep-Oct;18(5):499-511.
33. Page RC, Ammons WF. Collagen turnover in the gingiva and other mature connective tissues of the marmoset *Saguinus oedipus*. *Arch Oral Biol* 1974 Aug;19(8):651-8.
34. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000 2006;40:29-49.
35. Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart DA, Larjava H, et al. Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model. *J Dermatol Sci* 2009 Dec;56(3):168-80.
36. Wong JW, Gallant-Behm C, Wiebe C, Mak K, Hart DA, Larjava H, et al. Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound Repair Regen* 2009 Sep-Oct;17(5):717-29.
37. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res* 2003 Aug;82(8):621-6.
38. Schrementi ME, Ferreira AM, Zender C, DiPietro LA. Site-specific production of TGF-beta in oral mucosal and cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2008 Jan-Feb;16(1):80-6.

39. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, et al. Expression of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 and TGF- $\beta$  in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem* 2009 Jun;57(6):543-57.
40. Oudhoff MJ, Kroeze KL, Nazmi K, van den Keijbus PA, van 't Hof W, Fernandez-Borja M, et al. Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB J* 2009 Nov;23(11):3928-35.
41. Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, et al. Gingivae Contain Neural-crest- and Mesoderm-derived Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res* 2013 Sep;92(9):825-32.
42. Lemos DR, Paylor B, Chang C, Sampaio A, Underhill TM, Rossi FM. Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. *Stem Cells* 2012 Jun;30(6):1152-62.
43. Bronson RE, Argenta JG, Siebert EP, Bertolami CN. Distinctive fibroblastic subpopulations in skin and oral mucosa demonstrated by differences in glycosaminoglycan content. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988 Nov;24(11):1121-6.
44. Narayanan AS, Page RC, Meyers DF. Characterization of collagens of diseased human gingiva. *Biochemistry* 1980 Oct 28;19(22):5037-43.
45. Pedlar J. Biochemistry of glycosaminoglycans in the skin and oral mucosa of the rat. *Arch Oral Biol* 1984;29(8):591-7.
46. Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T. Tropoelastin expression by periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 2002 Mar;81(3):198-202.
47. Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontal Res* 2002 Feb;37(1):23-8.
48. Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Gene expression and accumulation of fibrillin-1, fibrillin-2, and tropoelastin in cultured periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 2002 Nov;81(11):771-5.
49. Gogly B, Godeau G, Gilbert S, Legrand JM, Kut C, Pellat B, et al. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. *Clin Oral Invest* 1997 Sep;1(3):147-52.
50. Csiszar A, Wiebe C, Larjava H, Hakkinen L. Distinctive molecular composition of human gingival interdental papilla. *J Periodontol* 2007 Feb;78(2):304-14.
51. Irwin CR, Picardo M, Ellis I, Sloan P, Grey A, McGurk M, et al. Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing. *J Cell Sci* 1994 May;107 ( Pt 5):1333-46.
52. Bordin S, Page RC, Narayanan AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science* 1984 Jan 13;223(4632):171-3.
53. Hakkinen L, Larjava H. Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. *J Dent Res* 1992 Dec;71(12):1901-7.
54. Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(3):165-75.
55. Hassell TM, Gilbert GH. Phenytoin sensitivity of fibroblasts as the basis for susceptibility to gingival enlargement. *Am J Pathol* 1983 Aug;112(2):218-23.
56. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008 Apr 10;2(4):313-9.
57. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008 Feb 22;132(4):567-82.
58. Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells* 2006 Aug;24(8):1841-51.
59. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces

- rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*2004 Jul 15;77(2):192-204.
60. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.
  61. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*2004 Apr 8;428(6983):664-8.
  62. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*1981 Jul 9;292(5819):154-6.
  63. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
  64. Kieffer E, Kuntz S, Viville S. [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Med Sci (Paris)*2010 Oct;26(10):848-54.
  65. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*2005 Oct 1;118(Pt 19):4495-509.
  66. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*2006 Aug 25;126(4):663-76.
  67. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*2007 Nov 30;131(5):861-72.
  68. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*2007 Dec 21;318(5858):1917-20.
  69. Qiang B, Hamamah S, De Vos J. [Induced pluripotent stem cells: youthful indiscretions]. *Med Sci (Paris)*2011 Oct;27(10):805-7.
  70. Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*2009 Sep 3;461(7260):86-90.
  71. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*2008 Nov 7;322(5903):945-9.
  72. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*2008 Nov 7;322(5903):949-53.
  73. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*2009 Apr 9;458(7239):766-70.
  74. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*2009 May 8;4(5):381-4.
  75. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulal W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*2010 Aug;28(8):848-55.
  76. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*2010 Sep 16;467(7313):285-90.
  77. Lapasset L, Milharet O, Lemaitre JM. [Could the cell memory of a previous life be erased by reprogramming towards pluripotency?]. *Med Sci (Paris)*2010 Nov;26(11):902-3.
  78. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsel-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*2011 Apr;29(4):313-4.

79. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*2007;25:745-85.
80. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*2008 Dec 4;3(6):625-36.
81. Boisset JC, Robin C. [Endothelial origin for hematopoietic stem cells: a visual proof]. *Med Sci (Paris)* Oct;27(10):875-81.
82. Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*2010 Mar 4;464(7285):116-20.
83. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*2009 Feb 12;457(7231):887-91.
84. Boisset JC, Robin C. [Endothelial origin for hematopoietic stem cells: a visual proof]. *Med Sci (Paris)*2011 Oct;27(10):875-81.
85. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*2012 Jan 26;481(7382):457-62.
86. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*2003 Oct 23;425(6960):841-6.
87. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*1974 Apr;17(4):331-40.
88. Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*2009 Jan 22;457(7228):490-4.
89. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*2007 Oct 19;131(2):324-36.
90. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*2010 Aug 12;466(7308):829-34.
91. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*2010 Apr 8;464(7290):852-7.
92. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*1997 Apr 4;276(5309):71-4.
93. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*1999 Apr 2;284(5411):143-7.
94. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*2002 Jul 4;418(6893):41-9.
95. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*2005 Feb 15;105(4):1815-22.
96. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*2008 Sep;8(9):726-36.
97. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells*2008 Jan;26(1):212-22.

98. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*2009 Jul 2;5(1):54-63.
99. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*2010 Aug 3;107(31):13724-9.
100. Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med*2011 Dec;17(12):1594-601.
101. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*2008 Feb 22;132(4):598-611.
102. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*2006;8(4):315-7.
103. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*2008 Sep 11;3(3):301-13.
104. Le Douarin NM, Dupin E. The neural crest in vertebrate evolution. *Curr Opin Genet Dev*2012 Aug;22(4):381-9.
105. Hall BK. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev*2000 Jan-Feb;2(1):3-5.
106. Milet C, Monsoro-Burq AH. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol*2012 Jun 1;366(1):22-33.
107. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*2012 Feb;22(2):288-304.
108. Calloni GW, Le Douarin NM, Dupin E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proc Natl Acad Sci U S A*2009 Jun 2;106(22):8947-52.
109. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Widera D. Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev*2011 Sep;8(3):658-71.
110. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.
111. d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, De Angelis GC, Laino L, et al. Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. *Eur Cell Mater*2011;21:304-16.
112. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*2001 Sep;3(9):778-84.
113. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*2004 Nov;6(11):1082-93.
114. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, et al. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. *Biomaterials*2010 Jun;31(18):4855-63.
115. Durand E, Fournier B, Couty L, Lemitre M, Achouh P, Julia P, et al. Endoluminal gingival fibroblast transfer reduces the size of rabbit carotid aneurysms via elastin repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*2012 Aug;32(8):1892-901.

116. de Crombrugge B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol*2001 Dec;13(6):721-7.
117. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*2002 Jan 11;108(1):17-29.
118. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*1997 May 30;89(5):755-64.
119. Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol*2010;90:291-317.
120. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugge B. The transcription factor *Sox9* has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox5* and *Sox6*. *Genes Dev*2002 Nov 1;16(21):2813-28.
121. Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, et al. Dominance of *SOX9* function over *RUNX2* during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*2006 Dec 12;103(50):19004-9.
122. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*2003 May 15;423(6937):332-6.
123. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. *MMP-9*/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*1998 May 1;93(3):411-22.
124. Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, et al. Critical roles for collagenase-3 (*Mmp13*) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A*2004 Dec 7;101(49):17192-7.
125. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med*2000 Mar 9;342(10):673-80.
126. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet*1998 Apr 28;77(1):31-7.
127. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, et al. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*2010 Apr 20;107(16):7251-6.
128. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*2008 May;58(5):1377-88.
129. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*1986;51 Pt 1:263-73.
130. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*2001 May 1;29(9):e45.
131. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*2004 Jun 1;329(1):77-84.
132. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*2007 Feb 16;315(5814):1006-10.
133. Fawzy El-Sayed KM, Paris S, Becker ST, Neuschl M, De Buhr W, Salzer S, et al. Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol*2012 Sep;39(9):861-70.

134. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev*2011 Dec;20(12):2093-102.
135. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*2009 Dec 15;183(12):7787-98.
136. Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, Hill C, Wilder-Smith P, Krasieva TB, et al. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells Dev*2011 Apr 10;21(6):937-47.
137. Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*2010 Oct;28(10):1856-68.
138. Chen M, Su W, Lin X, Guo Z, Wang J, Zhang Q, et al. Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis Rheum*2013 May;65(5):1181-93.
139. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today*2003 May;69(2):144-55.
140. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*2001 Aug;44(8):1928-42.
141. Kurth TB, Dell'accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in the adult knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum*2011 Jan 11.
142. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*2010 Jan;233(1):233-55.
143. Kasperkovitz PV, Timmer TC, Smeets TJ, Verbeet NL, Tak PP, van Baarsen LG, et al. Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial tissue heterogeneity: evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis. *Arthritis Rheum*2005 Feb;52(2):430-41.
144. Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, Sun H, Sanchez-Adams J, Leong KW, et al. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*2012 Nov 20;109(47):19172-7.
145. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol*2010 Nov;28(11):1187-94.
146. Yamashita A, Krawetz R, Rancourt DE. Loss of discordant cells during micro-mass differentiation of embryonic stem cells into the chondrocyte lineage. *Cell Death Differ*2009 Feb;16(2):278-86.
147. Shah NM, Groves AK, Anderson DJ. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell*1996 May 3;85(3):331-43.
148. Wang SK, Aref P, Hu Y, Milkovich RN, Simmer JP, El-Khateeb M, et al. FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genet*2013;9(2):e1003302.
149. Widera D, Zander C, Heidbreder M, Kasperek Y, Noll T, Seitz O, et al. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells*2009 Aug;27(8):1899-910.
150. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, et al. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*2010 May;28(5):984-95.

## ANNEXES

Liste des publications:

### Soumise:

**1. Formation of cartilage and synovial tissues by human gingival stem cells.**

F. Ferré, H. Larjava, L. Loison-Robert, G. Owen, A. Berdal, H. Chérifi, B. Gogly, L. Häkkinen, B. Fournier.

### Publiées:

**1. Oral phenotype and scoring of vascular Ehlers-Danlos syndrome: a case-control study.**

Ferré FC, Frank M, Gogly B, Golmard L, Naveau A, Chérifi H, Emmerich J, Gaultier F, Berdal A, Jeunemaitre X, Fournier BP. *BMJ Open*. 2012 Apr 5;2(2):e000705. Print 2012.

**2. Gingival fibroblasts inhibit activity of metalloproteinase: A path toward cell therapy?**

Gogly B, Fournier BP, Ferre FC, Naveau A. *Joint Bone Spine*. 2011 Sep 29.

**3. Inhibition of elastin and collagen networks degradation in human skin by gingival fibroblast. In vitro, ex vivo and in vivo studies.**

B Gogly, FC Ferré, H Cherifi, A Naveau, BP Fournier. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. PP.4-14, Pub. Date: 2011-03-28.

**4. Phenotypic Study of Human Gingival Fibroblasts in a Medium Enriched With Platelet Lysate.** Naveau A, Lataillade JJ, Fournier BP, Couty L, Prat M, Ferre FC, Gourven M, Durand E, Coulomb B, Lafont A, Gogly B. *J Periodontol*. 2010 Nov 8.

**5. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue.**

Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep;16(9):2891-9.



---

Les capacités de cicatrisation de la gencive en font un modèle de régénération tissulaire naturelle. Ces capacités sont liées en grande partie à l'activité des fibroblastes. Composante cellulaire principale du tissu conjonctif gingival, ils sont au cœur de la régulation des réponses inflammatoires et des processus de cicatrisation. Nous avons supposé que ce tissu pouvait contenir des cellules souches, pouvant expliquer en partie, ces capacités de réparation. Au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules souches mésenchymateuses aux propriétés communes avec les cellules souches adultes dérivées des crêtes neurales. Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules souches et des crêtes neurales. Par ailleurs, elles présentent des capacités d'auto-renouvellement et de multipotence. Elles sont, en effet, capables de se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la différenciation chondro/endochondrale. La culture des cellules, sous forme de sphères en suspension, a permis de mettre en évidence leurs capacités de différenciation en tissus cartilagineux et articulaires. Elles s'organisent spontanément en plusieurs types cellulaires différents, générant notamment des chondrocytes hypertrophiques et des synoviocytes selon leur localisation au sein des sphères et du milieu de culture utilisé. Le comportement de ces cellules soumises à ces conditions a permis de montrer leurs facultés à reproduire, *in vitro*, des processus proches de ceux retrouvés au cours du développement. Ces résultats permettent une meilleure compréhension des phénomènes de différenciation des cellules souches adultes, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour des applications en thérapie cellulaire articulaire et osseuse.

The healing capacity of the gingiva makes it a model of natural tissue regeneration. These capabilities are largely related to the fibroblast activity. They are the main cellular component of the gingival connective tissue and they regulate inflammatory responses and healing process. We hypothesized that this tissue could contain stem cells, which could explain, in part, these repair capabilities. In this thesis, we were able to demonstrate the presence of mesenchymal stem cells with properties shared with the neural crest-derived adult stem cells. These cells express specific markers of stem cells and neural crest. Moreover, they do have the capacity to self-renew and multipotency. They are, indeed, able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. We have particularly focused on the chondro / endochondral differentiation. When cultivated as micromasses cultures in suspension, cells were able to differentiate into cartilage and joint tissues. They organize themselves spontaneously into several different cell types, including hypertrophic chondrocytes and synoviocytes depending on their location within the micromasses and the culture medium used. The behavior of these cells under these conditions has shown their ability to replicate *in vitro*, close to those found during the development process. These results allow a better understanding of adult stem cells differentiation, opening new perspectives for applications in joint and bone cell therapy.

---

**Mots clés français:** fibroblaste gingival, cellules souches, crêtes neurales, différenciation

**Mots clés anglais:** gingival fibroblast, stem cells, neural crest, differentiation

---

**Laboratoire:**

Centre de recherché des Cordeliers  
INSERM U872 – Laboratoire de physiopathologie orale moléculaire  
15, rue de l'école de médecine. 75 006 Paris