



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2011

FACULTE DE PHARMACIE

**L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire et en
ingénierie tissulaire : nouvelle approche thérapeutique ?
Application à l'ingénierie du cartilage**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 27/09/2011

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Loïc REPPEL**
né le 22 Novembre 1985 à Nancy (54)

Membres du Jury

Président : M. Pierre LABRUDE, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy.

Juges : Mme Danièle BENSOUSSAN, Praticien Hospitalier, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de Nancy.

Mme Céline HUSELSTEIN, Maître de Conférences-HDR, Faculté de Médecine de Nancy.

M. Didier MAINARD, Professeur, Faculté de Médecine de Nancy.

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTSSection
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ♣	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN ♣	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☞	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☞	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☞ En attente de nomination

**Discipline du Conseil National des Universités :*

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHECAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur Pierre Labrude,

Professeur de physiologie, orthopédie et maintien à domicile, à la faculté de Pharmacie de Nancy.

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Je tiens également à vous remercier pour la qualité de vos enseignements dispensés au cours de mes études de Pharmacie.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

A mes directeurs de thèse,

Madame le Docteur Danièle Bensoussan,

Praticien Hospitalier, Docteur en Pharmacie, à l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, au CHU de Nancy.

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour l'étendue de vos connaissances, dans le domaine de la thérapie cellulaire, que vous m'avez apportée.

Que ce travail témoigne de ma sincère reconnaissance et de mon dévouement.

Madame le Docteur Céline Huselstein,

Maître de conférences, habilitées à diriger des recherches, à la faculté de Médecine de Nancy.

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser un stage d'initiation à la recherche qui m'a donné l'envie de poursuivre dans cette voie. Je tiens également à vous remercier pour votre disponibilité et votre soutien tout au long de ces deux dernières années.

Veillez trouver dans cet ouvrage le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A mon juge,

Monsieur le Professeur Didier Mainard,

Professeur de chirurgie orthopédique et traumatologique, à la faculté de Médecine de Nancy.

Pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaire (UMR CNRS-UHP 7561). Aussi, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Monsieur le Docteur Jacques Magdalou**, directeur de l'unité, et à **Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz**, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche. Je remercie également **Monsieur le Professeur Patrick Menu** pour la confiance qu'il m'a accordée.

Aux personnels et étudiants du laboratoire,

Monique, Ghislaine, Brigitte, Karine, Dominique, Sébastien, Natalia, Jessica, Naceur, et mon ami Tunay.

Pour votre disponibilité et votre sympathie.

Aux attachés de recherche clinique du service d'Hématologie et de Médecine interne, du CHU de Nancy,

Nicole, Murielle, Virginie, Isabelle,

Pour votre sympathie et les connaissances que vous m'avez apportées.

A la pharmacie Durand à Champigneulle,

Madame Durand, Marie-Christine, Sandra,

Pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes stages officinaux en troisième et quatrième année.

Soyez assurées de ma profonde reconnaissance.

A mes parents,

Pour m'avoir donné l'opportunité et les moyens de réaliser ces belles études de Pharmacie, pour votre amour, votre soutien et vos nombreux encouragements, notamment à la veille des examens et pendant les longues semaines de révisions qui n'ont pas toujours été faciles.

A mes deux sœurs, Chloé et Manon,

Pour leur soutien et leurs encouragements.

A mes grands-mères,

Pour votre soutien et votre amour.

A tout le reste de la famille

A mes amis,

Noémie, Benjamin, Karim, Maxime, John, Romain, Paul-Edouard, Fathi,
Pour tous les bons moments passés ensemble et pour votre présence qui m'a permis de franchir les étapes avec plus de sérénité.

A mes partenaires sportifs et amis,

Manu, Philippe, Cédric, Mathieu,
Pour les séances de décompression en vélo ou sur les terrains de badminton.

A mes collègues de fac,

Virginie, Marie, Géraldine, Jean-Sébastien, Steven..., pour les bons moments passés ensemble.

SOMMAIRE

<i>Liste des abréviations</i>	14
<i>Table des figures</i>	17
<i>Liste des tableaux</i>	20

INTRODUCTION GENERALE.....	21
----------------------------	----

Partie I: Les différentes cellules souches humaines

I. Les cellules souches totipotentes.....	26
II. Les cellules souches pluripotentes	26
A. Les cellules souches embryonnaires.....	27
1. Définition	27
2. Mode d'obtention des cellules souches embryonnaires.....	28
3. Caractérisation des cellules souches embryonnaires	29
4. Intérêts des cellules souches embryonnaires.....	29
5. Limites des cellules souches embryonnaires	32
B. Les cellules souches pluripotentes induites	34
1. Définition	34
2. La reprogrammation de cellules somatiques adultes	34
3. Domaines d'applications potentiels des cellules iPS	37
III. Les cellules souches multipotentes.....	39
A. Les cellules souches hématopoïétiques	39
1. Définition	39
2. Identification des CSH	40
3. Caractérisation des CSH	41
4. Localisation et domiciliation des CSH chez l'adulte	42
5. Différentes sources de CSH	44
6. Utilisation clinique des CSH.....	46
B. Les cellules souches mésenchymateuses	47
1. Définition et identification des CSM	47
2. Localisation et source des CSM.....	48
3. Caractérisation des CSM.....	48
4. Effet immunomodulateur des CSM	51

5.	Paramètres en faveur de l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire et tissulaire.	54
6.	Risques potentiels de l'utilisation des CSM à des fins thérapeutiques	55
IV.	Les cellules souches unipotentes	56
A.	Définition.....	56
B.	Les hépatocytes.....	56
C.	Les cellules souches de la lignée germinale	57
D.	Les cellules souches épithéliales	57
V.	Conclusion.....	59

Partie II: Aspects réglementaires de l'utilisation des cellules souches humaines à des fins thérapeutiques et de recherches

I.	La recherche sur les CSE humaines	62
A.	Les grandes lignes de la loi.....	62
B.	Obtention de lignées de CSE en France	64
C.	Etats des lieux des législations étrangères	65
II.	L'utilisation clinique des CSH	66
A.	Conditions du don de CSH	66
B.	Conditions d'autorisation des établissements de santé.....	67
III.	Les cellules souches du sang placentaire	70
A.	Le statut juridique	70
B.	Le Réseau Français de Sang Placentaire	71
C.	Prélèvement et don de sang placentaire.....	71
IV.	L'utilisation des CS humaines en recherche	73
A.	Don à la recherche de produits du corps humains	73
B.	L'utilisation des CS en recherche clinique	74
1.	Le consentement du patient.....	74
2.	Procédures d'autorisation.....	75
3.	Constitution et évaluation du dossier	76
C.	L'utilisation des CS en recherche fondamentale	77
1.	Prélèvement de cellules à des fins scientifiques	77
2.	Conservation et préparation de cellules à des fins scientifiques.....	77
V.	Conclusion.....	79

Partie III: Utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire: exemple d'application dans le cartilage

I.	Le cartilage articulaire	83
A.	Structure, physiologie et physiopathologie	83
B.	Fonctions du cartilage.....	86
C.	Lésions du cartilage	87
D.	Contexte socio-économique	87
II.	Traitements actuels des lésions cartilagineuses	88
A.	Traitements pharmacologiques.....	88
B.	Traitements chirurgicaux.....	90
1.	Forages de Pridie et microfractures	90
2.	La mosaïcoplastie.....	91
3.	La thérapie cellulaire : transplantation de chondrocytes autologues	92
C.	Conclusion	95
III.	Utilisation des CS en thérapie cellulaire: application au cartilage.....	95
A.	Modèles animaux.....	96
B.	Utilisation clinique des CSM dans les lésions cartilagineuses	97
1.	CSM et essais cliniques	97
2.	CSM et lésions cartilagineuses	100
3.	Conclusions et perspectives	103
IV.	Utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage	104
A.	L'ingénierie tissulaire	104
1.	Définition générale.....	104
2.	L'ingénierie tissulaire du cartilage.....	105
B.	Le choix de la source cellulaire	106
1.	Les cellules natives ou chondrocytes	106
2.	Cellules plus précoces : les CSM.....	106
C.	Le choix du biomatériau	107
1.	Nature des biomatériaux	108
2.	Principaux mode de fabrication	109
3.	Matrice simple ou mixte, monophasique	110
4.	Biomatériaux stratifiés, multiphasiques.....	110
D.	Fonctionnalisation du biomatériau	112
1.	Fonctionnalisation par voie biochimique	112
2.	Fonctionnalisation par voie mécanique.....	113

Partie IV expérimentale: Biomatériaux stratifiés sous contraintes mécaniques: nouvelle approche dans l'ingénierie du cartilage

I. Hypothèse et objectifs de travail	115
II. Matériel et Méthodes	116
A. Culture cellulaire	116
1. Isolation des CSM humaines de la moelle osseuse.....	116
2. Culture en monocouche	116
3. Passage et congélation/décongélation des cellules	117
B. Ensemencement des CSM dans un biomatériau stratifié.....	117
C. Compression dynamique intermittente	119
D. Méthodologies analytiques	120
1. Cytométrie en flux	121
2. RT-PCR quantitative.....	123
3. Microscopie confocale	125
4. Histologie : analyse de la synthèse matricielle	127
E. Analyses statistiques.....	128
III. Résultats.....	128
A. Validation du modèle de culture.....	128
1. Morphologie du biomatériau stratifié et répartition des cellules au sein du biomatériau.....	128
2. Viabilité cellulaire.....	130
3. Cycle cellulaire	131
B. Caractérisation des cellules	132
1. Immunophénotypage.....	132
2. Expression des facteurs de transcription.....	134
C. Evaluation de la synthèse matricielle	135
1. Expression de gènes d'intérêt	135
2. Analyse de la synthèse matricielle	137
IV. Discussion et perspectives	140
A. Discussion.....	140
B. Conclusion et perspectives	144
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	146
Références bibliographiques	151
Annexe.....	164

Liste des abréviations

ABM :	Agence de la Biomédecine
ACT :	Advanced Cell Technology
AFSSaPS :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AINS :	Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens
Alg :	Alginate
AMP :	Assistance Médicale à la Procréation
ARS :	Agence Régionale de Santé
BMPs :	Bone Morphogenetic Proteins
BSA :	Albumine de Sérum Bovin
CD :	Cluster de Différenciation
CDI :	Compression dynamique intermittente
CFU-F:	Fibroblasts Colony-Forming Unit
CFU-S:	Colony Forming Unit in Spleen
CMF :	Cytométrie en Flux
Col :	Collagène
COMP :	Cartilage Oligo Matrix Protein
CPP :	Comité de Protection des Personnes
CS :	Cellule Souche
CSC :	California Stem Cell
CSE :	Cellule Souche Embryonnaire
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM :	Cellule Souche Mésenchymateuse
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMLA:	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO :	Dimethyl Sulfoxide
EBMT :	European group for Blood and Marrow Transplantation
FACT:	Foundation for the Accreditation of Cell Therapy

FCH :	Facteur de Croissance Hématopoïétique
FDA:	Food and Drug Administration
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FITC:	Fluorescein Isothiocyanate
G-CSF:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GVHD:	Graft versus Host Disease
GvL:	Graft-versus-Leukemia
HA:	Acide Hyaluronique
Hap:	Hydroxyapatite
HBSS:	Hank's Balanced Salts Solution
HES:	Hématoxyline-Eosine-Safran
HLA :	Human Leucocyte Antigen
IDO :	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN-γ :	Interféron- γ
IL :	Interleukine
IMF:	Intensité Moyenne de Fluorescence
IP:	Iodure de Propidium
iPS :	Cellule souche Pluripotente Induite
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
ISCT :	International Society for Cellular Therapy
JACIE:	Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT
Klf4:	Krüppel-like factor 4
MEC :	Matrice Extracellulaire
MMP :	Métalloprotéase
MPa :	MégaPascal
MPE :	Multicouche de Polyélectrolytes
NK :	Cellules Natural Killer
Oct4 :	Octamer-binding transcription factor 4
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PE :	Phycoérythrine

PGs :	Protéoglycannes
PGE2 :	Prostaglandines E2
PLL :	Poly-L-Lysine
RFGM :	Registre France Greffe de Moelle
RFSP :	Réseau Français de Sang Placentaire
RT :	Rétro Transcription
RT-PCRq :	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative
SCF :	Stem Cell Factor
SDF-1 :	Stroma Derived Factor-1
SIOS:	Schéma Interrégional d'Organisation Sanitaire
Sox2 :	SRY-box2
SSEA :	Stage Specific Embryonic Antigens
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TGF-β :	Transforming Growth Factor-β
TGI:	Tribunal de Grande Instance
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor-α
TSG-6:	TNF-Stimulated gene 6 protein
UTCT:	Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus

Table des figures

Figure 1: Deux propriétés essentielles des cellules souches	25
Figure 2: Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire.	28
Figure 3: Utilisation potentielle des CSE humaines comme produit de thérapie cellulaire à des fins de médecine régénératrice.	30
Figure 4: Principe du clonage à visée thérapeutique.	33
Figure 5: Principe de la reprogrammation de cellules somatiques adultes.	35
Figure 6: Trois stratégies utilisées dans la reprogrammation de cellules somatiques adultes.	36
Figure 7: Domaines d'applications potentiels des cellules iPS.....	38
Figure 8: Potentiel de différenciation des cellules souches hématopoïétiques.....	40
Figure 9: La CSH dans le microenvironnement médullaire (niche hématopoïétique).	44
Figure 10: Evolution de la répartition des sources de greffons de CSH allogéniques.	45
Figure 11: Culture de cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse.....	47
Figure 12: La multipotence des CSM.....	50
Figure 13: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative.	52
Figure 14: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée.	53
Figure 15: Représentation schématique des essais cliniques utilisant des CSM par phases cliniques.	55
Figure 16: Localisations de cellules souches au sein de différents tissus épithéliaux.....	57
Figure 17: Représentation du renouvellement de l'épiderme humain par les kératinocytes souches.	58
Figure 18: Procédures pour les essais cliniques de thérapie cellulaire.....	76
Figure 19: Représentation du cartilage articulaire au niveau d'une articulation de genou.	84
Figure 20: Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire.....	85
Figure 21: Principe de la technique des microfractures.	91
Figure 22: Principe de la technique de la mosaïcoplastie.	92
Figure 23: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues.	93
Figure 24: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues utilisant une matrice d'origine végétale: Cartipatch®.....	94

Figure 25: Evaluation morphologique des lésions cartilagineuses sur un modèle porcin.....	97
Figure 26: Nombre d'essais cliniques utilisant des CSM en fonction des indications thérapeutiques.....	98
Figure 27: Modes d'utilisations cliniques des CSM.	99
Figure 28: Evaluation de l'évolution de la lésion cartilagineuse par arthroscopie.	102
Figure 29: Principe de base de l'ingénierie tissulaire.	105
Figure 30: Ingénierie tissulaire adaptée au cartilage.	106
Figure 31: Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse.	107
Figure 32: Architectures de biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. .	110
Figure 33: Deux approches différentes (I et II) de la construction d'un biomatériau stratifié.	111
Figure 34: Représentation schématique des deux approches de l'ingénierie tissulaire stratifiée.	112
Figure 35: Système de pulvérisation.	118
Figure 36: Construction du biomatériau stratifié.	119
Figure 37: Fonctionnalisation du biomatériau par compression dynamique intermittente. ..	120
Figure 38: Coupe histologique du biomatériau stratifié à J28, coloré à l'HES.	129
Figure 39: Répartition des cellules au sein du biomatériau.....	129
Figure 40: Influence de la contrainte mécanique (A) et de la nature des biomatériaux (B) sur la viabilité cellulaire (Kit Vybrant/Apoptosis™).	130
Figure 41: Influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire (A: phase G0/G1 et B: phases S+G2/M) des CSM maintenues dans le biomatériau composite.	131
Figure 42: Expression des marqueurs CD34, CD45, (A et B) et HLA-DR (C) à la surface des CSM (CMF).	132
Figure 43: Analyse phénotypique des CSM cultivées en monocouche (P3) ou après 3 jours de culture dans une structure tridimensionnelle (Alg/HA et Alg/Hap).....	133
Figure 44: Influence de la contrainte mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression des marqueurs CD73 (A) et CD166 (B).	134
Figure 45: Influence de la stimulation mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression génique de Sox9 (A) et de RunX2 (B), après 3, 14 et 28 jours de culture.	135
Figure 46: Influence de la stimulation mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression de gènes codant pour les protéines d'intérêt exprimées par les MSC au cours de la chondrogénèse, après 3, 14 et 28 jours de culture.	137

Figure 47: Influence de la contrainte mécanique sur la synthèse des protéoglycannes et des collagènes totaux, après 28 jours de culture.....	138
Figure 48: Influence de la nature du biomatériau et de la contrainte mécanique sur la synthèse des collagènes I, II et X.....	139

Liste des tableaux

Tableau 1: Marqueurs exprimés à la surface des CSH.	41
Tableau 2: Antigènes exprimés ou non à la surface des CSM humaines.....	49
Tableau 3: Comparaison des propriétés des différentes cellules souches humaines.	60
Tableau 4: Extrait de la liste des unités de thérapie cellulaire autorisées par l'AFSSaPS.	68
Tableau 5: Médicaments indiqués dans le traitement symptomatique de l'arthrose.	89
Tableau 6: Ensemble des essais cliniques, en cours de réalisation, utilisant des CSM dans le traitement de lésions cartilagineuses.	101
Tableau 7: Avantages et inconvénients de certains biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.....	108
Tableau 8: Chronologie des paramètres analysés au cours de l'étude.....	121
Tableau 9: Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs.	122
Tableau 10: Amorces et conditions de PCRq pour chaque gène.	124
Tableau 11: Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects.	126

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis maintenant plusieurs années, le terme de cellules souches associé à une médecine régénératrice, ne relève plus de la science fiction. De l'embryon à l'Homme adulte, les sources de cellules souches sont multiples. Selon leur origine et leur mode d'obtention, ces cellules ne possèdent pas toutes les mêmes capacités de transformation. Nous verrons que leurs propriétés intéressantes permettent d'envisager leur utilisation en thérapie cellulaire ou tissulaire, à plus ou moins long terme. L'ensemble des caractéristiques des cellules souches humaines ainsi que leurs utilisations thérapeutiques reconnues et potentielles seront développées dans la première partie de notre travail.

Au moment de la découverte des cellules souches, et notamment des cellules issues de l'embryon humain, de vifs débats ont animé la communauté scientifique, surtout entre chercheurs et certains groupes religieux. La question d'ordre éthique était au centre du débat. En 2004, lorsque les Parlementaires adoptent la nouvelle loi de bioéthique, ils y intègrent une partie exclusivement consacrée à l'encadrement juridique des cellules souches embryonnaires. En 2011, cette loi de bioéthique a fait l'objet d'une révision dont les dispositions concernant les cellules souches seront abordées dans la seconde partie de notre étude.

Afin de pallier toute altération fonctionnelle de l'organisme, l'utilisation de prothèses ou de greffes est, à l'heure actuelle, utilisée pour remplacer les tissus et les organes lésés. Ainsi, suite à un traumatisme ou à une dégénérescence tissulaire telle que la dégénérescence du cartilage, la médecine réparatrice a su se développer et tente d'apporter des solutions thérapeutiques aux patients. Le caractère avasculaire du cartilage empêche une régénération spontanée efficace du tissu, entraînant une perte d'intégrité de ce dernier. Aujourd'hui, un grand nombre de patients souffrent de lésions cartilagineuses. C'est au total plus de six millions de Français qui sont ainsi concernés par l'arthrose. Les traitements actuels n'ayant pas montré de résultats satisfaisants à long terme, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques devient alors un véritable enjeu non seulement de santé publique mais aussi économique. Dans cette perspective, certaines cellules souches se sont trouvées être d'excellentes candidates à la thérapie cellulaire et à l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette dernière consiste, à partir de cellules ensemencées dans un biomatériau vecteur et/ou tuteur, à préparer *in vitro*, un néo-tissu cartilagineux qui sera réimplanté au niveau d'une lésion chondrale. La troisième partie de ce travail abordera l'intérêt d'utiliser les cellules souches en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire pour traiter les lésions cartilagineuses.

Enfin, une partie expérimentale s'inscrivant dans une perspective d'ingénierie tissulaire sera présentée. Ce travail propose de développer un biomatériau stratifié,ensemencé avec des cellules souches mésenchymateuses, et fonctionnalisé à l'aide de contraintes mécaniques. Ici, le potentiel de différenciation de ces dernières vers la cellule cartilagineuse est utilisé dans le but de créer un tissu *de novo*.

Partie I :

**Les différentes cellules souches
humaines**

Les cellules souches (CS) sont des cellules dites « immatures » et « indifférenciées ». Par conséquent, elles sont capables, dans un environnement donné, de se **différencier** en cellules ou organes spécialisés, voire d'engendrer un organisme entier. Ces cellules sont également douées d'une propriété d'**autorenouvellement**, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se multiplier à l'identique, notamment en culture *in vitro* (**Figure 1**). Ainsi, les CS peuvent se diviser de façon symétrique, donnant naissance à deux cellules indifférenciées, ou bien de façon asymétrique, en générant une cellule spécialisée et une cellule immature. Ces stratégies permettent de conserver un stock de cellules immatures tout au long de la vie.

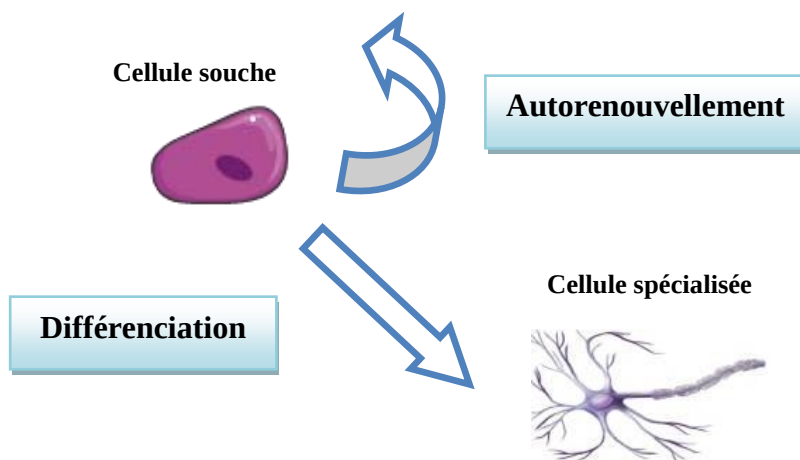


Figure 1: Deux propriétés essentielles des cellules souches

Le domaine des cellules souches est devenu très complexe ces dernières années : les progrès techniques ont permis d'isoler et de caractériser, de l'embryon à l'adulte, de multiples populations de CS. Ces cellules immatures possèdent de nombreuses caractéristiques et peuvent être classées de différentes façons : une classification physiologique, qui suit la succession chronologique des CS se succédant au cours de la vie, de l'embryon (qui crée les tissus), au fœtus et à l'adulte, où les tissus ne font que se renouveler ou se réparer en cas de lésion. Il est possible également de classer ces cellules selon leur potentiel de différenciation, s'étendant ainsi de la totipotence à l'unipotence. Cette classification sera utilisée dans la suite de notre travail afin de caractériser au mieux les différentes cellules souches humaines.

I. Les cellules souches totipotentes

L'embryogenèse est par définition le processus qui forme un individu entier à partir d'une seule cellule, le zygote (ou œuf fécondé). Ce zygote et les cellules issues de ses premières divisions (jusqu'au stade de 8 cellules), les blastomères, sont les seules cellules totipotentes de l'organisme (**Figure 2**). Etymologiquement, totipotence signifie « tout pouvoir », indiquant que le génome de ces cellules est organisé de telle manière qu'il peut coder l'information nécessaire à la fabrication d'un organisme entier. Mais encore faut-il que la cellule totipotente soit dans le contexte embryonnaire ; jamais une cellule totipotente ne formera un embryon *in vitro*. De plus, pour des raisons évidentes d'éthiques, ces cellules ne sont pas utilisées en recherche et encore moins à des fins thérapeutiques.

II. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de générer (dans les conditions adaptées) n'importe quelle cellule spécialisée et fonctionnelle de l'organisme. Leur capacité plus restrictive que les cellules totipotentes, ne leur permettent pas d'aboutir à la création d'un individu complet. Il est possible de les obtenir notamment à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes (**Cellules Souches Embryonnaires, CSE**) ou par reprogrammation forcée de cellules différenciées (**Cellules souches Pluripotentes Induites** ou **iPS**). Aujourd'hui, ces cellules représentent un espoir majeur pour des applications cliniques futures en thérapie cellulaire (Duprat et al., 2010). Il existe également d'autres cellules souches pluripotentes telles que les cellules embryonnaires de carcinome, les cellules souches de l'épiblaste ou encore les cellules embryonnaires germinales (Kieffer et al., 2010). L'étude de ces dernières est encore peu développée dans la littérature et par conséquent, elles ne seront pas détaillées dans la suite de notre travail. Notre étude se concentrera exclusivement sur les CSE et les iPS.

A. Les cellules souches embryonnaires

1. Définition

Dans les années quatre-vingt-dix, une équipe de chercheurs américains met en évidence des cellules souches embryonnaires chez l'homme (Thomson et al., 1998). Très vite, ils commencèrent à envisager leur utilisation dans une perspective de médecine régénératrice.

Au cours de l'embryogénèse et à partir du cinquième jour, l'embryon s'organise en territoires spécialisés, ayant chacun un destin propre : il s'agit du stade blastocyste du développement embryonnaire. Les cellules qui formeront les tissus embryonnaires se regroupent pour former la masse interne du blastocyste au sein d'une cavité bordée par une membrane externe, le trophoblaste. Ce dernier donnera le placenta et les annexes extra-embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires sont directement issues de cette masse cellulaire interne (**Figure 2**). Le génome de ces cellules est organisé de façon à coder l'information nécessaire pour former tous les tissus de l'organisme (pluripotence). Ensuite, les cellules de cette masse interne se spécialisent à leur tour et délimitent trois feuillets : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (processus de gastrulation). Chacun est à l'origine de certains des futurs tissus de l'organisme. Par exemple, la peau et le tissu nerveux sont issus de l'ectoderme, l'intestin, le foie et le pancréas de l'endoderme et enfin, les cellules musculaires, cartilagineuses ou osseuses sont quant à elles issues du mésoderme.

In vivo, la pluripotence des cellules souches embryonnaires n'existe que pendant une courte durée. La progression du développement embryonnaire conduit inéluctablement à la spécialisation de ces cellules. Cette situation est donc très différente des conditions *in vitro*, où l'objectif est de maintenir les propriétés de pluripotence des cellules afin d'en tirer partie en thérapeutique. C'est la raison pour laquelle, les chercheurs ont développé des lignées de cellules souches embryonnaires capables de proliférer de façon illimitée en culture tout en conservant leur caractère pluripotent (Thomson et al., 1998).

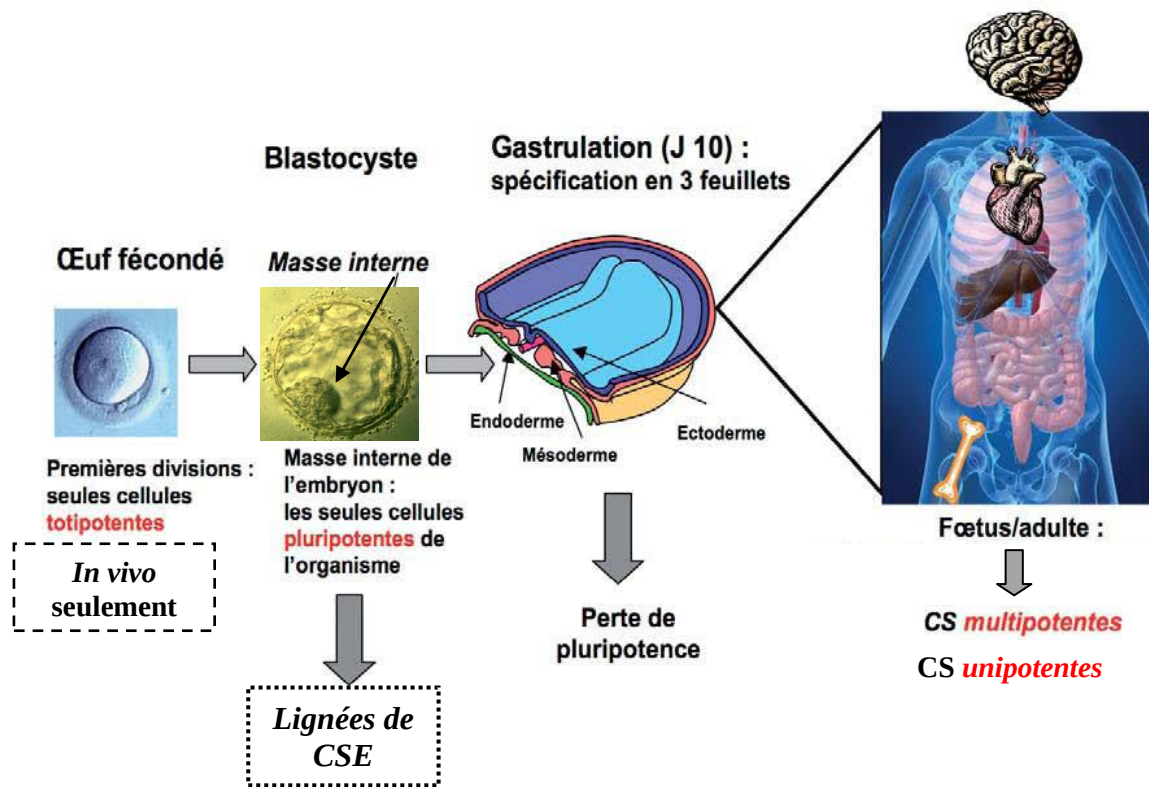


Figure 2: Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire.
(d'après Coulombel et al, 2010).

2. Mode d'obtention des cellules souches embryonnaires

En France, la création d'embryons à des fins de recherche est interdite par la loi. Les CSE proviennent d'embryons surnuméraires créés dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Les cellules de la masse interne du blastocyste sont extraites puis mises en coculture avec des cellules nourricières (fibroblastes) et en présence de facteurs de croissance. Ainsi, les CSE acquièrent la capacité de proliférer indéfiniment à l'identique, en inhibant leur évolution naturelle de différenciation qui survient normalement *in vivo*. De cette façon, sont créées des lignées immortelles de CSE humaines pluripotentes. Environ 600 lignées de CSE humaines ont été validées dans le monde, dont une cinquantaine est régulièrement utilisée par la majorité des laboratoires travaillant dans ce domaine (Coulombel, 2010).

Certaines lignées de CSE sont également obtenues à partir d'embryons porteurs d'une mutation dépistée au cours d'un diagnostic préimplantatoire. L'intérêt de ces lignées mutées sera expliqué ultérieurement dans la suite de notre travail.

3. Caractérisation des cellules souches embryonnaires

Un certain nombre de paramètres caractérisent les CSE humaines :

- Elles sont capables de se répliquer indéfiniment en culture *in vitro* tout en conservant, dans des conditions appropriées, leur caractère indifférencié et pluripotent, sans modifications de leur caryotype.
- Elles peuvent, en culture *in vitro* et dans un environnement adéquat, se différencier en plus de 200 types de cellules (cellules nerveuses, sanguines, de cartilage, etc).
- Elles sont caractérisées par :
 - ✓ des marqueurs de surface comme SSEA3 et SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigens, qui sont des gangliosides), Tra-1-60 et Tra-1-81 (qui sont des protéoglycannes) (Thomson et al., 1998).
 - ✓ des facteurs de transcription comme Oct4, Sox2 et Nanog (appelés également « gènes de pluripotence ») (Hoffman and Carpenter, 2005).
- Elles possèdent une forte activité télomérase directement liée à leur grande capacité de prolifération (Thomson et al., 1998).
- Lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée chez la souris immuno-déficiente, les CSE induisent la formation de tératomes. Ces tumeurs bénignes représentent la tentative anarchique des CSE de former les trois feuillets embryonnaires; destin naturel de ces cellules (Thomson et al., 1998).

Ces caractéristiques propres aux CSE humaines peuvent expliquer en partie l'intérêt mais aussi les obstacles de leur utilisation dans des applications cliniques futures.

4. Intérêts des cellules souches embryonnaires

a. La thérapie cellulaire et la médecine régénératrice

Grâce à leur grande capacité de proliférer *in vitro* et à leur capacité de s'autorenouveler indéfiniment, les CSE humaines constituent une source cellulaire potentiellement illimitée et facilement accessible (caractéristique idéale pour produire des banques de cellules). Ainsi, ces cellules offriraient la perspective d'un produit de thérapie cellulaire allogénique immédiatement disponible.

Leur propriété de pluripotence permet à ces cellules de pouvoir se différencier vers tous les types de cellules de l'organisme. En culture *in vitro*, les CSE humaines peuvent se différencier, entre autres, en cardiomyocytes (Mummery et al., 2003), en neurones (Zhang et al., 2001), en kératinocytes (Green et al., 2003) ou encore en cellules β pancréatiques sécrétant de l'insuline (Rajagopal et al., 2003). Ces cellules spécialisées pourraient ensuite constituer un traitement intéressant dans le cadre d'une médecine régénératrice. Des pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie de Huntington), des atteintes cardiaques (infarctus du myocarde), des atteintes cutanées (grands brûlés) ou le diabète de type 1, pourraient ainsi, être traités par des cellules spécialisées directement dérivées de ces cellules souches pluripotentes (**Figure 3**).

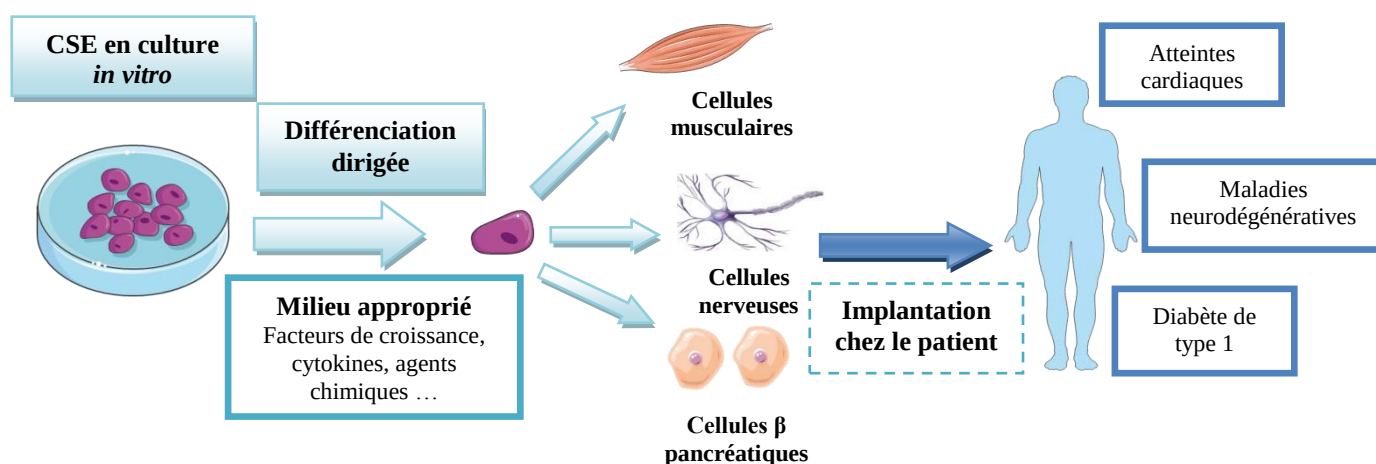


Figure 3: Utilisation potentielle des CSE humaines comme produit de thérapie cellulaire à des fins de médecine régénératrice.

Aujourd'hui, seules trois compagnies américaines ont obtenu l'autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) d'utiliser des cellules spécialisées dérivées de CSE humaines à des fins d'essais cliniques. Actuellement, quatre essais sont en cours de réalisation (Trounson et al., 2011) (<http://clinicaltrials.gov>).

L'entreprise Geron étudie, dans un essai clinique de phase I, la tolérance de l'injection de cellules nerveuses, issues de CSE humaines, chez des patients atteints de lésions de la moelle épinière suite à un traumatisme spinal (Bretzner et al., 2011). L'objectif sera de reconstituer la gaine de myéline, entourant les fibres nerveuses et permettant le passage de l'influx nerveux, et de réduire l'étendue de la paralysie. Si les résultats de cette étude sont

concluants, il s'agira véritablement d'une première mondiale car à l'heure actuelle, il n'y a jamais eu aucun succès thérapeutique dans la réparation des lésions de la moelle épinière.

Dans ce même domaine d'application neurologique, la compagnie CSC (California Stem Cell) étudie dans un essai de phase I, l'intérêt potentiel de neurones moteurs dérivés de CSE humaines dans une neuropathie héréditaire : l'atrophie musculaire spinale. Cette pathologie est due à une dégénérescence progressive des motoneurones de la moelle épinière.

Enfin, l'entreprise ACT (Advanced Cell Technology) étudie quant à elle, dans des essais cliniques de phase I et II, l'effet de la transplantation de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, dérivées de CSE humaines, dans une maladie rare de la rétine, la maladie de Stargardt, et dans une pathologie fréquente, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). En France, la DMLA touche deux millions de personnes et donc ce type de stratégie thérapeutique pourrait connaître un essor économique considérable.

b. Modèles cellulaires en recherche pharmacologique

Outre l'intérêt évident que représentent les CSE humaines en thérapie cellulaire, ces dernières constituent un outil idéal de modélisation cellulaire pour la recherche. Le modèle cellulaire une fois défini (cellules musculaires, cellules nerveuses, etc.), permettrait de tester *in vitro* une grande quantité de molécules sur ce modèle (criblage à haute densité), d'évaluer la toxicité d'un produit ou encore d'identifier un médicament potentiel. Ces expérimentations constitueraient une alternative intéressante aux modèles animaux. Les lignées de CSE mutées, obtenues après un diagnostic préimplantatoire, seraient très utiles à la modélisation de certaines maladies génétiques (la mucoviscidose par exemple) et par conséquent, au criblage de molécules thérapeutiques (Laustriat et al., 2009).

c. Génomique fonctionnelle

Enfin, les CSE humaines permettraient d'étudier la fonction des gènes humains et en particulier tous les gènes du développement qui représentent une grande partie des gènes humains non encore caractérisés.

5. Limites des cellules souches embryonnaires

a. Questionnement d'ordre éthique

Le premier obstacle à l'utilisation des CSE humaines est d'ordre éthique. En effet, en France, les recherches sur les CSE sont interdites et ne sont autorisées qu'à titre dérogatoire (Partie II-I). L'utilisation des CSE pour la recherche suscite évidemment de vifs débats, notamment pour certains groupes, religieux ou non, qui considèrent l'extraction des CSE comme une atteinte à l'intégrité de l'embryon.

b. Risque tumorigène

Le deuxième problème majeur de ces cellules est lié à leur fort pouvoir tumorigène et donc à leur capacité à provoquer parfois la formation de tumeurs bénignes (tératomes) lorsqu'elles sont injectées chez l'animal (Seminatore et al., 2010). Cette tumorigénicité serait liée à l'état de différenciation des CSE au moment de l'implantation de ces dernières chez l'animal. En effet, il sera absolument nécessaire, lors d'une potentielle utilisation thérapeutique des CSE, de purifier les préparations cellulaires qui devront être exemptes de toutes CSE résiduelles. Seules les cellules différenciées et spécialisées pourront être injectées. La maîtrise de ce risque impose donc une meilleure connaissance des mécanismes de différenciation cellulaire.

c. L'expression des marqueurs HLA

L'utilisation thérapeutique des CSE conduit, *de facto*, à la réalisation d'une greffe allogénique dont la compatibilité avec le receveur dépend de la présence des antigènes du système majeur d'histocompatibilité (marqueurs HLA) à la surface des cellules greffées. Se pose alors le problème de la tolérance immunitaire. Ces marqueurs s'expriment proportionnellement à la spécialisation des cellules. En effet, les cellules à l'état indifférencié expriment faiblement ces antigènes d'histocompatibilité. Lorsqu'elles se différencient, elles les expriment plus intensément (Drukker et al., 2002). Plusieurs possibilités ont été proposées pour pallier ce problème de rejet :

- Au lieu d'imposer au patient un traitement immunosuppresseur, il serait intéressant de réaliser une banque de CSE humaines couvrant tout le spectre des combinaisons HLA possibles.

- Le clonage dit thérapeutique permettrait également de fournir des cellules souches embryonnaires. Cette technique consiste à insérer dans un ovocyte énucléé, un noyau issu d'une cellule adulte prélevée sur une personne et à déclencher artificiellement la formation d'un embryon *in vitro* (Riaz et al., 2011) (**Figure 4**). Ainsi, les CSE extraites de cet embryon pourraient constituer un traitement à la personne qui a fourni initialement le noyau de la cellule en lui offrant une greffe compatible. Cependant, le clonage thérapeutique reste une approche purement théorique. En effet, en France, cette technique reste interdite et constitue juridiquement un délit.

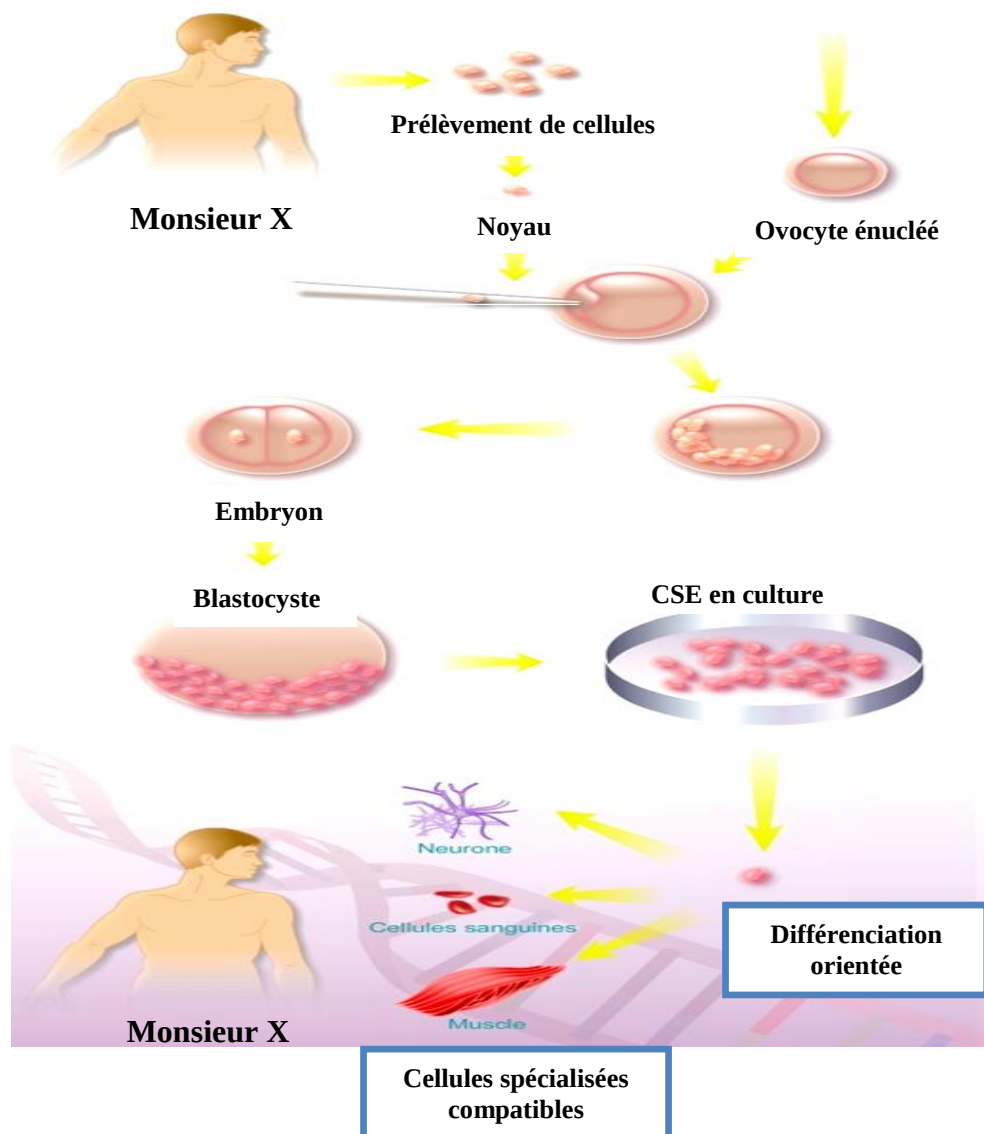


Figure 4: Principe du clonage à visée thérapeutique.

*Cette technique consiste à insérer dans un ovocyte énucléé, un noyau issu d'une cellule adulte prélevée sur une personne et à déclencher artificiellement la formation d'un embryon *in vitro*.*

- Un autre type cellulaire, de découverte récente, pourrait être également utilisé pour résoudre ce problème de compatibilité. Il s'agit des cellules souches pluripotentes induites ou iPS qui seront décrites dans la suite de notre travail.

Enfin, une question majeure demeure : « les CSE différenciées *in vitro* conserveront-elles la fonctionnalité voulue *in vivo* ? ».

B. Les cellules souches pluripotentes induites

1. Définition

Tout comme les CSE, les cellules souches pluripotentes induites ou cellules iPS possèdent deux caractéristiques majeures: elles sont capables de se multiplier à l'infini et peuvent se différencier en tout type cellulaire. De découverte relativement récente, ces cellules ont été obtenues par reprogrammation de cellules adultes différenciées, tout d'abord de souris (Takahashi and Yamanaka, 2006) puis humaines (Yu et al., 2007). Plus faciles à obtenir que les CSE, les cellules iPS ne posent aucun problème d'ordre éthique et semblent offrir des potentialités prometteuses dans de nombreuses applications.

2. La reprogrammation de cellules somatiques adultes

a. Les facteurs de pluripotence

La reprogrammation de cellules somatiques adultes consiste à transférer des gènes codants des facteurs de transcription bien particuliers, *via* un vecteur. Ces gènes utilisés pour la transformation de cellules adultes en cellules pluripotentes sont ceux qui interviennent dès le début de l'embryogénèse. En 2006, après l'identification de vingt quatre gènes intervenant dans la pluripotence des CSE, l'équipe japonaise de Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) retient quatre facteurs pour leurs premiers travaux sur la souris :

- Octamer-binding transcription factor 4 (**Oct4**), qui intervient lors du passage de la morula au blastocyste (Nichols et al., 1998).
- SRY-box 2 (**Sox2**) joue un rôle important dans la pluripotence et la capacité d'autorenouvellement des cellules embryonnaires (Avilion et al., 2003).
- Krüppel-like factor 4 (**Klf4**) peut activer ou réprimer la transcription.
- **c-Myc** est un oncogène exprimé dans les cellules à forte activité proliférative.

Un an après ce succès, cette même équipe réalise, avec ces mêmes facteurs, une reprogrammation de fibroblastes humains adultes (Takahashi et al., 2007).

En 2007, l'équipe américaine de Thomson J.A. (Yu et al., 2007), effectue également des travaux sur des fibroblastes humains et choisit pour réaliser la reprogrammation, Oct4, Sox2 et deux autres facteurs :

- **Nanog** intervient également dans le maintien des propriétés d'autorenouvellement et de pluripotence des cellules embryonnaires (Cavaleri and Scholer, 2003).
- **Lin 28**, exprimé au début de l'embryogénèse et fonctionnant comme stimulant de la différenciation cellulaire (Darr and Benvenisty, 2009).

D'autres gènes ont également été utilisés par d'autres équipes pour réaliser des cellules pluripotentes induites (**Klf5, Klf2, n-Myc, Esrrb...**). Plusieurs combinaisons de ces gènes ont été étudiées afin d'évaluer l'efficacité de reprogrammation des cellules adultes (Stadteld and Hochedlinger, 2010).

L'objectif final de la transfection de ces quatre gènes d'intérêt est de réactiver les gènes endogènes de pluripotence des cellules adultes reprogrammées. Ces gènes sont présents dans les cellules adultes mais leur expression est naturellement inhibée. Parallèlement, l'expression des gènes transfectés doit diminuer progressivement au cours du temps (**Figure 5**) (Stadteld and Hochedlinger, 2010).

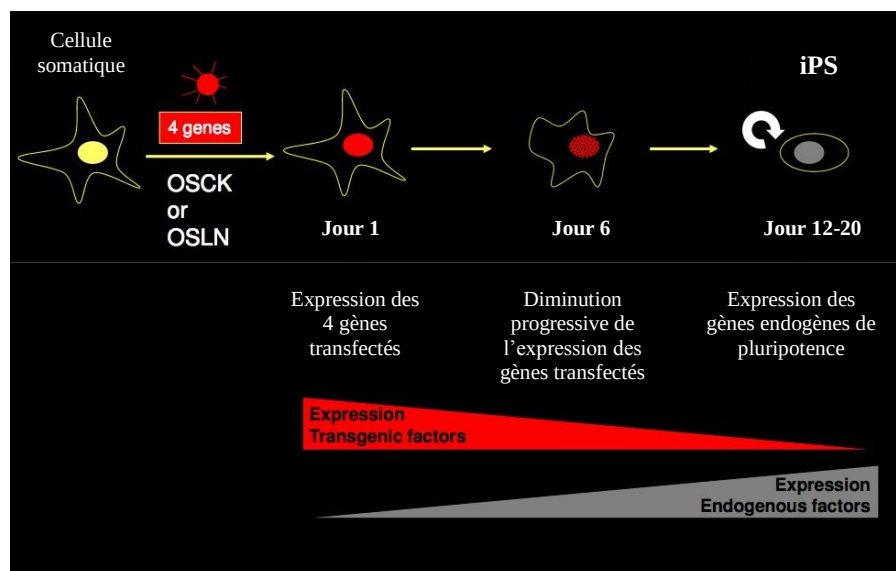


Figure 5: Principe de la reprogrammation de cellules somatiques adultes.

Après transfection des quatre gènes d'intérêts, la reprogrammation consiste à réactiver les gènes endogènes de pluripotence. L'expression des gènes transfectés diminue progressivement et parallèlement, les gènes endogènes sont réactivés. (OSCK : Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 et OSLN : Oct4, Sox2, Lin 28, Nanog).

b. Les vecteurs

Ces gènes de reprogrammation ont été initialement introduits dans les cellules adultes par l'intermédiaire de vecteurs intégratifs que sont les rétrovirus et les lentivirus. Par définition, ces vecteurs conduisent à l'intégration des transgènes au sein du génome des cellules. Cette intégration assure une bonne efficacité de reprogrammation mais également un risque de mutagenèse insertionnelle non négligeable (Lowry and Plath, 2008). C'est la raison pour laquelle, certaines équipes se sont intéressées à d'autres vecteurs, non intégratifs, qui n'altèrent pas l'ADN des cellules reprogrammées. Des adénovirus (Stadtfeld et al., 2008) ou encore des plasmides (Okita et al., 2008) ont ainsi été utilisés comme vecteur, induisant cependant une efficacité de reprogrammation moindre (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010) (**Figure 6**). L'efficacité de reprogrammation est évaluée par le taux de cellules induites. Aujourd'hui, les chercheurs se tournent de plus en plus vers d'autres techniques de reprogrammation efficaces et qui réduisent le risque de mutagenèse insertionnelle.

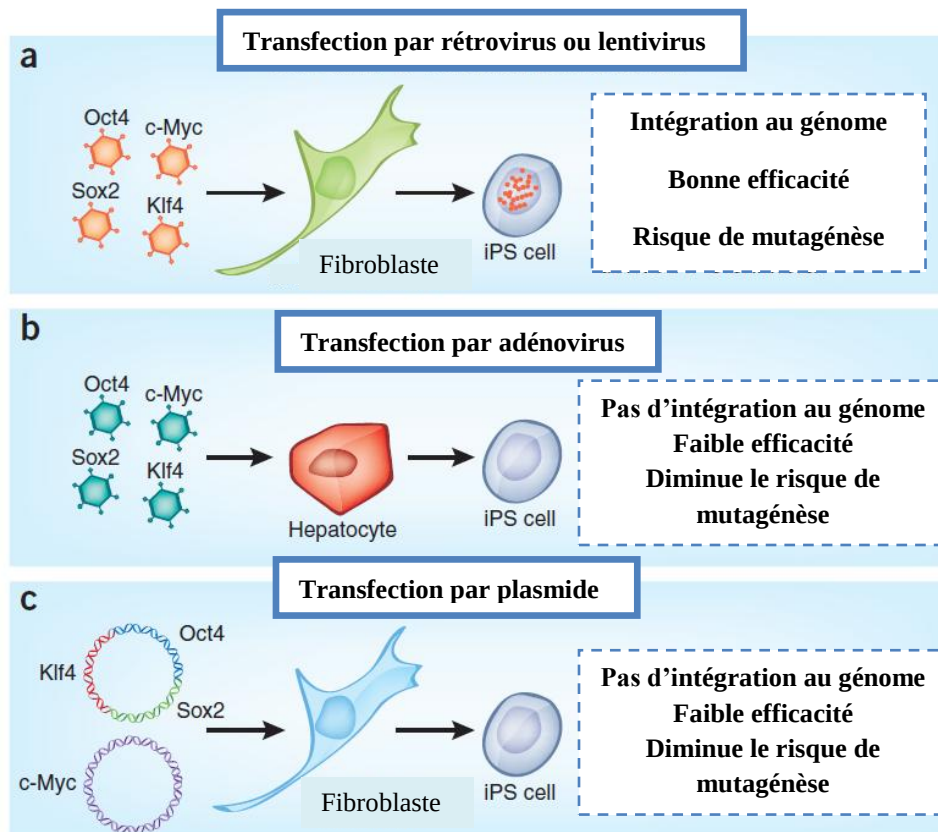


Figure 6: Trois stratégies utilisées dans la reprogrammation de cellules somatiques adultes.

(a) *Transfection par rétrovirus ou lentivirus.* (b) *Transfection par adénovirus.* (c) *Transfection par plasmide.* La reprogrammation des cellules adultes en cellules iPS se fait entre 15 et 30 jours (d'après Lowry et al., 2008).

Dans ce contexte, des scientifiques se sont intéressés à injecter dans les cellules adultes, non pas les transgènes mais, le produit de leur synthèse : les ARN messagers. De cette façon, les modifications du génome sont évitées et le risque de cancérogénèse est diminué. Les ARN messagers déclenchent bien le changement d'identité des cellules (bonne efficacité de reprogrammation) mais eux, contrairement aux transgènes, sont détruits rapidement (Warren et al., 2010).

c. Les cellules reprogrammées

Chez l'homme, les cellules iPS sont obtenues principalement à partir de fibroblastes cutanés mais également à partir de kératinocytes issus de biopsie cutanée (Aasen et al., 2008) ou encore de cellules progénitrices sanguines (Loh et al., 2009).

d. Identification des cellules iPS

L'objectif principal de cette reprogrammation de cellules adultes est de maintenir dans le temps le caractère pluripotent des cellules. Les cellules iPS une fois obtenues doivent répondre à un certain nombre de critères (Maherali and Hochedlinger, 2008). Ces paramètres sont ceux qui caractérisent les cellules souches embryonnaires et qui ont été décrits précédemment. L'intégrité génomique des cellules iPS peut être contrôlée par des techniques de séquençage. Ce contrôle d'éventuelles mutations induites semble nécessaire en vue d'une potentielle utilisation thérapeutique de ce type de cellules.

3. Domaines d'applications potentiels des cellules iPS

L'utilisation des cellules iPS permet de contourner deux obstacles majeurs que connaissent les CSE. Tout d'abord, les cellules iPS ne nécessitent pas l'emploi d'embryons surnuméraires. Par conséquent, ces cellules semblent être irréprochables sur le plan éthique. De plus, les cellules iPS sont obtenues à partir de cellules adultes et donc pourraient constituer un traitement pour la personne qui a fourni les cellules sans risque de rejet immunitaire. Il serait également possible de choisir des donneurs de cellules en fonction de leur profil HLA, et établir une banque couvrant la majorité des besoins. Ces deux caractéristiques font de ces cellules iPS d'excellentes candidates potentielles à la médecine régénératrice. Leur propriété de pluripotence permettrait d'utiliser ces cellules comme produit de thérapie cellulaire dans des pathologies telles que les pathologies neurodégénératives, les atteintes cardiaques ou encore le diabète de type 1 (Yamanaka, 2009) (**Figure 7**). Avant cela, il sera nécessaire, dans les prochaines années, de mieux comprendre le phénomène complexe de la reprogrammation

et de développer des techniques d'obtention des cellules iPS qui permettent d'utiliser ces cellules en clinique en toute sécurité.

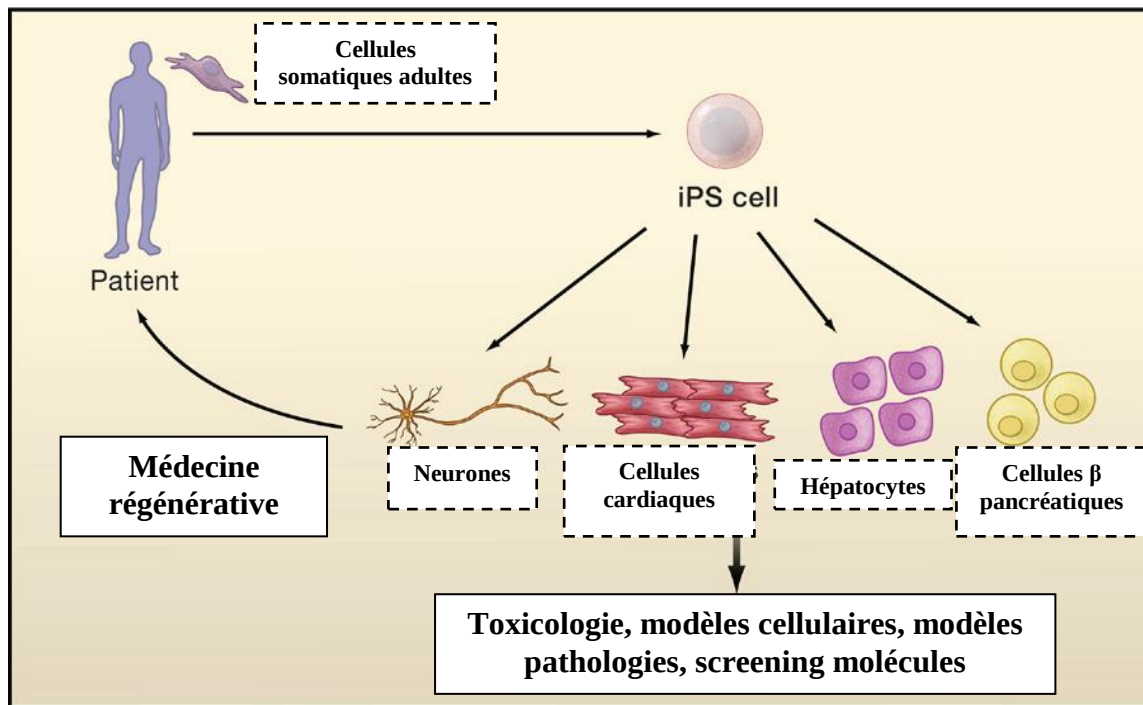


Figure 7: Domaines d'applications potentiels des cellules iPS.
(d'après Yamanaka, 2009).

En 2007, une équipe américaine publie des résultats encourageants sur l'utilisation de cellules iPS autologues de souris sur un modèle murin de drépanocytose. Les cellules iPS sont différenciées *in vitro* en précurseurs hématopoïétiques puis transplantés chez l'animal (Hanna et al., 2007).

Plus récemment, des chercheurs se sont penchés sur l'intérêt des cellules iPS dans le traitement de la granulomatoses septique chronique liée au chromosome X. Ce déficit immunitaire de l'immunité non spécifique altère l'activité microbicide des neutrophiles et expose le patient à de nombreuses infections. Des cellules iPS ont été développées à partir des cellules du patient. Ces cellules iPS ont ensuite été modifiées génétiquement puis différenciées en neutrophiles fonctionnels (Zou et al., 2011).

Dernièrement, une équipe française a démontré la capacité de différenciation, *in vitro*, de cellules iPS humaines vers des érythrocytes matures. Cette perspective très prometteuse de l'utilisation des cellules iPS permettrait ainsi, d'obtenir une source

potentiellement illimitée de globules rouges. Cette approche représenterait alors un intérêt majeur dans le domaine de la médecine transfusionnelle (Lapillonne et al., 2010).

Tout comme les CSE, les cellules iPS pourraient constituer des modèles cellulaires en recherche pharmacologique (**Figure 7**). Il serait alors possible d'évaluer la toxicité *in vitro* d'un produit ou encore d'effectuer le criblage d'un grand nombre de molécules d'intérêt thérapeutique. Enfin, des lignées de cellules iPS peuvent être produites à partir de sujets atteints de diverses pathologies, dans le but de disposer d'un modèle d'étude de ces pathologies.

III. Les cellules souches multipotentes

La multipotence caractérise les cellules souches d'origine adulte ou fœtale qui sont capables de générer plusieurs types de cellules. Leur capacité de différenciation est plus limitée que les cellules décrites précédemment. Ces cellules multipotentes sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique (d'origine ectodermique, endodermique ou mésodermique). Les CS multipotentes adultes sont présentes dans le corps humain (au niveau de niches tissulaires) et participent à la régénération des tissus en fonction des signaux envoyés par l'environnement. Par exemple, les **Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)** qui sont à l'origine de toutes les cellules du sang ou encore les **Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM)** qui donneront naissance aux futures cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires et adipeuses. Contrairement aux cellules pluripotentes, les CS multipotentes ont une capacité de prolifération limitée en culture *in vitro* (sénescence cellulaire). Ces cellules ont déjà montré leur réel intérêt en thérapie cellulaire (CSH) et offrent de belles perspectives quant à leur utilisation en médecine régénératrice.

A. Les cellules souches hématopoïétiques

1. Définition

Les CSH sont le point de départ de l'hématopoïèse qui a lieu, chez l'adulte, au niveau de la moelle osseuse. Elles assurent la production permanente des différentes lignées cellulaires sanguines, permettant à ces dernières un renouvellement constant. Elles sont capables de se différencier en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui sont à l'origine de toutes les cellules hématopoïétiques (globules rouges, plaquettes, polynucléaires, macrophages et lymphocytes) (**Figure 8**). La capacité d'autorenouvellement des CSH permet

à partir d'un stock limité de cellules d'assurer l'hématopoïèse d'un individu pendant toute sa vie. Ainsi, dans les conditions physiologiques, l'homéostasie du tissu sanguin est assurée.

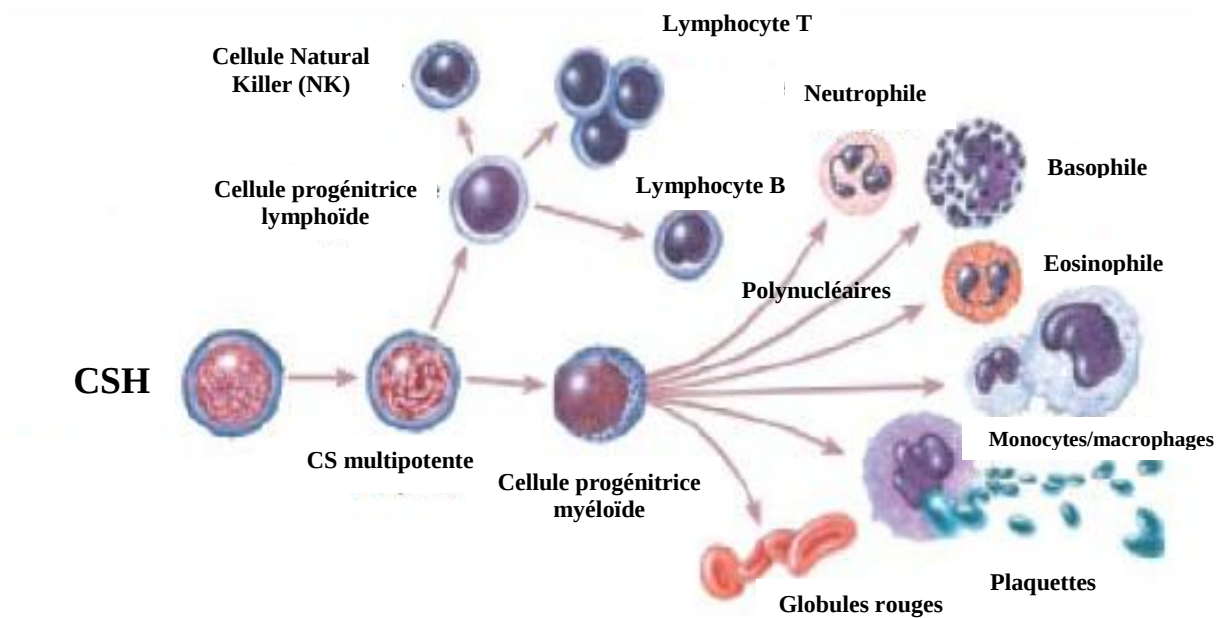


Figure 8: Potentiel de différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

2. Identification des CSH

Les premières preuves expérimentales de l'existence des CSH remontent à 1961 avec les travaux de Till et Mc Culloch (Till and Mc, 1961) où ils démontrèrent la présence de précurseurs hématopoïétiques chez l'animal sous forme de CFU-S (Colony Forming Unit in Spleen). Ces colonies observées au niveau de la rate (organe hématopoïétique chez la souris) sont obtenues après l'injection de cellules d'origine médullaire de souris à une autre souris irradiée.

Par la suite, des systèmes de culture *in vitro* ont permis de cultiver ces CSH et de mettre en évidence, en présence de facteurs de croissance hématopoïétiques, les précurseurs des différentes lignées sanguines. Des techniques de culture en milieu semi-solide ont permis cette identification (Bradley and Metcalf, 1966) et sont utilisées pour étudier la capacité fonctionnelle des CSH d'un individu. D'autres méthodes de culture ont été développées permettant de cultiver des précurseurs hématopoïétiques pendant plusieurs semaines. Un test appelé LTC-IC (long term culture-initiating cell) permet d'identifier un précurseur très précoce capable de générer des cellules sanguines après mise en culture sur un tapis de

cellules stromales médullaires et en présence de facteurs hématopoïétiques (Sutherland et al., 1990). Ce système tente de reproduire l'environnement médullaire naturel dans lequel se trouvent les CSH.

3. Caractérisation des CSH

a. Phénotype cellulaire

Les CSH ne sont pas identifiables morphologiquement. Néanmoins, elles se définissent par un certain nombre de marqueurs de surface (Wognum et al., 2003) (Shizuru et al., 2005) (**Tableau 1**).

Marqueurs exprimés à la surface des CSH	Nature/Fonctions
CD34	Glycoprotéine/Adhérence et migration
CD133 ou AC133	Glycoprotéine/-
CD90 ou Thy-1	Glycoprotéine/Adhérence et migration
CD117 ou c-kit	Protéine/récepteur cytokines (SCF : Stem Cell Factor)
CXCR4	Protéine/récepteur cytokines (SDF-1 : Stroma-derived factor-1)
VLA (-4 et -5)	Protéine/intégrines (adhérence aux protéines de la MEC)

Tableau 1: Marqueurs exprimés à la surface des CSH.

(- : fonction mal connue ; CD : Cluster de Différenciation ; MEC : Matrice Extra Cellulaire)

Les CSH se définissent également par l'absence de différents marqueurs de surface tels que CD38, CD10, CD14, CD15, etc.

Ces marqueurs phénotypiques sont indispensables pour identifier et purifier une population de CSH dite « CD34+ ». Des anticorps monoclonaux dirigés contre ces

marqueurs ont été développés afin d'effectuer un tri cellulaire à grande échelle et d'obtenir une population cellulaire la plus pure possible. Cette purification s'inscrit dans le but d'utiliser ces CSH comme produit de thérapie cellulaire.

b. Caractéristiques fonctionnelles

Outre leur caractérisation phénotypique, les CSH peuvent être caractérisées par certains paramètres :

- Elles sont multipotentes et donc, capables de se différencier en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui sont à l'origine de toutes les cellules sanguines.
- Elles sont transplantables, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de reconstituer à long terme l'ensemble du système hématopoïétique d'un individu greffé.
- Elles peuvent être amplifiées de façon limitée en culture *in vitro* et en présence de facteurs de croissance hématopoïétiques (intérêt majeur dans les greffes).
- L'autorenouvellement des CSH *in vivo* et *in vitro* est limité dans le temps. Au cours des divisions cellulaires, les télomères se raccourcissent conduisant les cellules sénescents vers l'apoptose. Pour cette raison et contrairement aux CSE, il est impossible de créer des lignées de CSH.
- *In vivo*, la majorité des CSH sont dans un état de quiescence, en phase G0 du cycle cellulaire (Berardi et al., 1995).
- Les CSH sont très sensibles à diverses cytokines intervenant dans la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhérence cellulaire (Barbosa et al., 2011).

4. Localisation et domiciliation des CSH chez l'adulte

Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule au niveau de la moelle osseuse et c'est à ce niveau que naturellement les CSH constituent une véritable niche hématopoïétique. Ce microenvironnement médullaire (**Figure 9**) apporte aux CSH :

- ✓ les facteurs de communication intercellulaire permettant d'attirer ces dernières vers cet environnement (chimiokines) : phénomène de Homing.
- ✓ Les molécules d'adhésion permettant l'adhésion des CSH à cet environnement.

- ✓ Les facteurs de croissance hématopoïétiques (FCH) qui assurent la survie, la prolifération et la différenciation des CSH.

Les chimiokines sont des protéines induisant la mobilité cellulaire. Si une cellule exprime à sa surface un récepteur pour une chimiokine, elle est alors capable de migrer dans le sens du gradient le plus élevé de cette chimiokine. Ces molécules jouent un rôle déterminant dans la localisation tissulaire (phénomène de « homing »). Les CSH expriment un récepteur à chimiokine (CXCR4) et sont donc attirées dans la moelle osseuse par SDF-1, chimiokine produite par les cellules stromales médullaires (Peled et al., 1999). Ainsi, la localisation des CSH dans la moelle osseuse nécessite une attraction permanente de ces dernières par la chimiokine SDF-1. Le blocage de la fixation de SDF-1 à son récepteur entraîne une migration des CSH dans le sang (principe de la molécule Plerixafor détaillé ultérieurement).

Une fois les CSH attirées dans la niche hématopoïétique, elles adhèrent aux cellules stromales ainsi qu'aux protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (fibronectine, laminine, etc) grâce à des molécules d'adhésion (N-cadhérine, intégrines : VLA-4, VLA-5, etc) (Gigant et al., 2001) (**Figure 9**).

Enfin, pour survivre, proliférer et se différencier vers une lignée cellulaire donnée, les CSH doivent être stimulées par des FCH.

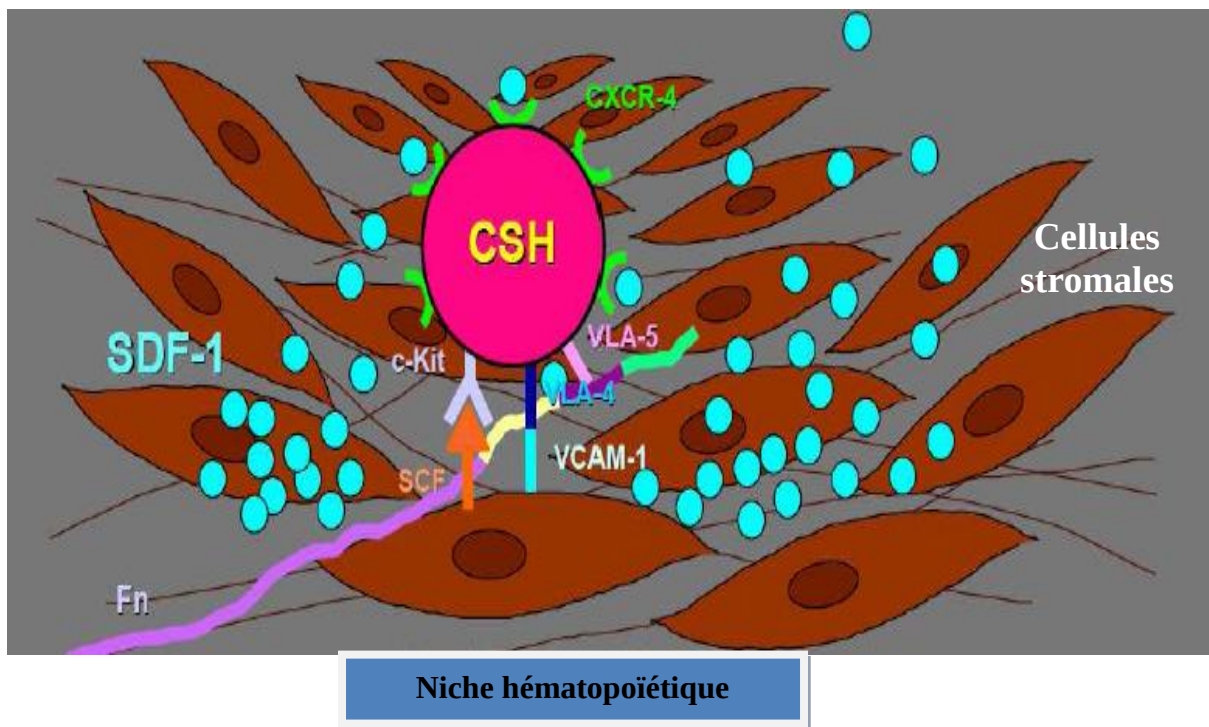


Figure 9: La CSH dans le microenvironnement médullaire (niche hématopoïétique).
(Fn : fibronectine).

Au sein de la moelle osseuse, les cellules stromales constituent le tissu de soutien de l'hématopoïèse (Dazzi et al., 2006). Ces cellules stromales mésenchymateuses cohabitent étroitement avec les CSH. Depuis plusieurs dizaines d'années, des études sur ces cellules stromales ont également montré leur propriété de cellules souches multipotentes.

5. Différentes sources de CSH

a. La moelle osseuse

Dans la moelle osseuse, les CSH représentent entre 0,5 et 1% des cellules mononucléées (Wognum et al., 2003). Il est donc nécessaire, lors du prélèvement de moelle, de pouvoir faire un tri cellulaire afin d'obtenir une population dite « CD34+ » la plus pure possible. La moelle osseuse reste encore une source importante de CSH pour les greffes allogéniques (le donneur est différent du receveur).

b. Le sang périphérique

Dans les conditions physiologiques, moins de 0,1% des cellules du sang périphérique expriment le marqueur CD34. Grâce à certains facteurs de croissance (G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor, par exemple) et plus récemment à un

antagoniste du récepteur CXCR4 (Plerixafor, Mozobil®) (Mohty and Ho, 2011), il est possible de mobiliser les CSH vers le sang périphérique. La molécule Plerixafor est utilisée en complément du G-CSF dans les échecs de mobilisation. Les liaisons des CSH avec l'environnement médullaire sont rompues, permettant ainsi leur passage dans la circulation systémique. Les CSH, une fois dans le sang périphérique, deviennent alors beaucoup plus accessibles et constituent aujourd'hui, la source principale des CSH en vue de leur utilisation dans les greffes autologues (le donneur est aussi le receveur).

c. Le sang de cordon ombilical

Les CSH peuvent également être d'origine fœtale puisqu'en effet, elles ont été identifiées au niveau du sang de cordon ombilical ou sang placentaire (Weissman and Shizuru, 2008). Cette source cellulaire présente de nombreux avantages dans la constitution de greffons allogéniques. En effet, l'immaturité du système immunitaire du tissu fœtal, confère aux CSH une plus faible immunogénicité (Wu et al., 1999). Ces dernières années, l'utilisation du sang placentaire, comme source de greffons de CSH allogéniques, a connu un essor sans précédent (**Figure 10**). Le recours à la greffe de sang de cordon, plutôt qu'à la greffe de moelle osseuse, a tendance à augmenter d'année en année.

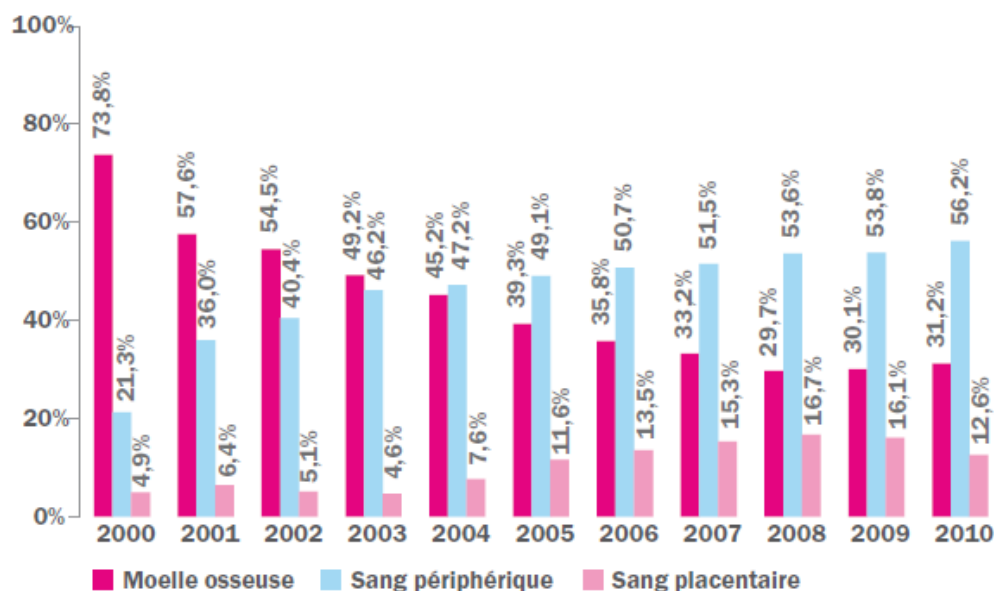


Figure 10: Evolution de la répartition des sources de greffons de CSH allogéniques. (d'après le rapport annuel des activités de l'Agence de la Biomédecine en 2010)(<http://www.agence-biomedecine.fr>).

6. Utilisation clinique des CSH

Aujourd'hui, les CSH sont utilisées en routine dans le cadre d'autogreffes ou d'allogreffes comme traitement ou support de traitement de certaines hémopathies malignes essentiellement. Elles sont également utilisées dans de nombreux essais cliniques.

Par définition, l'autogreffe implique une seule et même personne, puisque le donneur de CSH est également le receveur. La greffe autologue de CSH n'est pas un traitement en soi mais plutôt un support de traitement. En effet, les CSH provenant du patient lui-même sont conservées et réinjectées après une chimiothérapie intensive. Cette stratégie permet d'avoir recours à des doses de chimiothérapie très élevées, dans le but d'améliorer la réponse du patient au traitement anticancéreux. Les CSH autologues ne sont utilisées alors que comme support de traitement, afin de raccourcir l'aplasie médullaire obligatoirement induite par ce régime intensif de chimiothérapie. L'autogreffe de CSH concerne essentiellement les patients atteints d'hémopathies malignes (95% des indications) comme les leucémies aigües, les lymphomes ou encore le myélome par exemple. Dans une moindre mesure, cette autogreffe peut être indiquée dans le cas de tumeurs solides sans métastases médullaires (cancers du sein, de l'ovaire, etc.) (Lissandre et al., 2007).

L'allogreffe de CSH nécessite un donneur sain différent du receveur et sélectionné en fonction de certains critères d'histocompatibilité. Dans la mesure du possible, une compatibilité parfaite du système majeur d'histocompatibilité (système HLA) est exigée entre le donneur et le receveur. La greffe de CSH allogéniques permet de restaurer un tissu hématopoïétique déficient (déficit immunitaire) ou envahi par des cellules malignes (hémopathies malignes). Dans les deux cas, les CSH constituent véritablement un traitement en tant que tel. La curabilité par allogreffes de CSH est basée sur deux mécanismes d'action :

- ✓ Le conditionnement myélo-ablatif ou non myélo-ablatif et immunosuppresseur induisant une cytoréduction importante des cellules tumorales ou l'induction d'une tolérance vis-à-vis du greffon.
- ✓ Le contrôle antitumoral immunologique assuré par des effecteurs immuns allogéniques (lymphocytes T), contenus dans le greffon, appelé effet GvL ou effet du greffon contre la leucémie (Michallet, 2011).

L'allogreffe de CSH peut être indiquée dans certaines pathologies non malignes comme les aplasies médullaires constitutionnelles ou acquises, les déficits immunitaires combinés sévères, les hémoglobinopathies ou encore la maladie de Gaucher. Elle constitue également une stratégie thérapeutique intéressante dans les hémopathies malignes comme les syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques, les leucémies, les lymphomes, le myélome.

B. Les cellules souches mésenchymateuses

1. Définition et identification des CSM

Les CSM se définissent comme des cellules souches multipotentes capables d'autorenouvellement (certes limité dans le temps) et de différenciation vers différents types cellulaires spécialisés (d'origine mésodermique). Ainsi, les CSM participent activement à l'homéostasie et donc à la régénération des tissus d'origine mésenchymateuse de l'organisme. Résidant dans de nombreux tissus, les sources disponibles de CSM sont multiples et incluent à la fois les tissus adultes et les tissus fœtaux.

Les CSM ont été identifiées et isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse par l'équipe de A. Friedenstein. En cultivant des cellules stromales de moelle osseuse, les scientifiques ont observé l'apparition de colonies de cellules de type fibroblastique ou Fibroblasts Colony-Forming Unit (CFU-F, **figure 11**), adhérentes au plastique et pouvant se différencier en ostéoblastes (Friedenstein et al., 1976). Par la suite, d'autres équipes ont montré la capacité de ces cellules à se différencier, *in vitro*, vers d'autres cellules d'origine mésodermique : chondrocytes, adipocytes, myoblastes (Pittenger et al., 1999) (Colter et al., 2001). En 1991, le terme de « cellules souches mésenchymateuses » est introduit par A. Caplan. (Caplan, 1991).

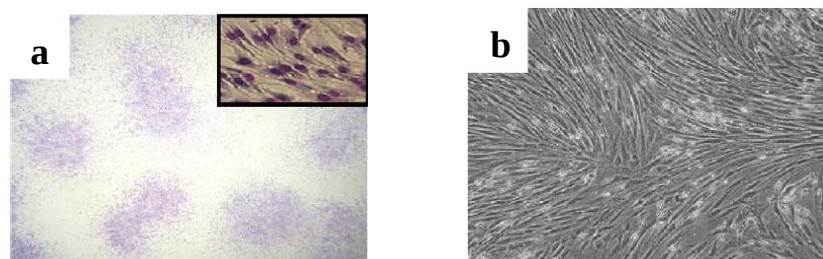


Figure 11: Culture de cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse.

(a) Fibroblasts Colony-Forming Unit (CFU-F) après coloration au Giemsa. (b) Morphologie des CSM à confluence (X40) (Photographies d'après Roux et al., 2011).

2. Localisation et source des CSM

C'est au niveau de la moelle osseuse que les CSM ont été identifiées pour la première fois (Friedenstein et al., 1976). Elles représentent approximativement entre 0,001% et 0,01% des cellules mononucléées médullaires (Pittenger et al., 1999). Malgré leur faible densité, la source médullaire reste la source de CSM la plus utilisée aujourd'hui. En effet, leur isolement et leur prolifération *in vitro* sont relativement aisés.

Par la suite, les CSM ont été isolées à partir du tissu adipeux, de la membrane synoviale, de l'os trabéculaire, du périoste, du muscle squelettique ou encore de la pulpe dentaire (Rastegar et al., 2010) (Chen et al., 2008). Elles peuvent également être d'origine fœtale et être isolées à partir du placenta, du liquide amniotique ou du cordon ombilical. Deux régions du cordon ombilical ont montré la présence de CSM : le sang de cordon et surtout la gelée de Wharton (tissu conjonctif du cordon ombilical) (McElreavey et al., 1991). Actuellement, quelques études s'intéressent à la caractérisation de ces CSM de la gelée de Wharton qui semblent constituer véritablement une source alternative aux CSM de la moelle osseuse.

3. Caractérisation des CSM

Dans un souci d'harmonisation, le comité de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a proposé des standards de caractérisation des CSM (Dominici et al., 2006), établissant des critères minimums de définition :

- ✓ L'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture *in vitro*.
- ✓ L'expression de certains marqueurs de surface tels que CD73, CD90, CD105 et l'absence d'expression des marqueurs CD34, CD45, CD14 ou CD11B, CD79A ou CD19 (>95% des cellules en culture).
- ✓ La capacité de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes (cellules d'origine mésodermique).

Des critères supplémentaires peuvent venir compléter ceux cités ci-dessus afin de réaliser une caractérisation fine de ces CSM :

- ✓ L'expression d'un panel d'antigènes de surface détectés par la technique de cytométrie en flux (Pittenger and Martin, 2004) (**Tableau 2**). La liste n'est pas exhaustive.

Antigènes exprimés à la surface des CSM humaines	Antigènes non exprimés à la surface des CSM humaines
CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49, CD51, CD54, CD58, CD71, CD102, CD106, CD119, CD120, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140, CD166, TGFb1R, TGFbIIR, HLA-A, B, C, SSEA-3, SSEA-4	CD34, CD45, CD14, HLA-DR, CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD36, CD38, CD49, CD50, CD62, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1

Tableau 2: Antigènes exprimés ou non à la surface des CSM humaines.

L'expression des marqueurs de surface est différente d'une espèce à une autre.

- ✓ La capacité à se différencier *in vitro* en cellules d'origine non mésodermique. Des études ont montré des possibilités de différenciation en cardiomyocytes ou en neurones (Planat-Benard et al., 2004) (Sanchez-Ramos et al., 2000). Ainsi, les CSM seraient capables de trans-différenciation (Uccelli et al., 2008) (**Figure 12**). Cependant, cette notion est largement controversée par certains auteurs. Ces derniers expliquent qu'il reste difficile d'affirmer que les CSM soient capables d'engendrer des types cellulaires n'appartenant pas au mésoderme (Phinney and Prockop, 2007).
- ✓ Un fort potentiel d'amplification en culture *in vitro*. Cependant, cet auto-renouvellement des CSM est limité (sénescence cellulaire). Après un certain temps de culture, le taux de prolifération et la capacité de différenciation des cellules diminuent (Banfi et al., 2000).
- ✓ Une majorité de cellules (90%) à l'état de quiescence (phase G0/G1 du cycle cellulaire) au niveau de leur niche tissulaire. Les CSM ne s'activent, c'est-à-dire prolifèrent et se différencient, qu'en cas d'atteintes tissulaires.
- ✓ Une forte activité paracrine. En effet, les CSM synthétisent et sécrètent dans leur environnement de nombreux signaux que sont les cytokines, les chimiokines et les

facteurs de croissance. Ces signaux intercellulaires interviennent dans les mécanismes de réparation tissulaire (Caplan and Dennis, 2006). Ils jouent également un rôle dans la propriété de trophicité des CSM avec des effets pro-angiogéniques et anti-apoptotiques (Martinaud et al., 2010).

- ✓ L'expression à la surface des CSM de récepteurs à chimiokines, de molécules d'adhésion de la famille des intégrines, des immunoglobulines, des métalloprotéinases, qui interviennent dans la mobilité cellulaire et donc, dans les phénomènes de « homing ». Ce mécanisme conduit à l'attraction des CSM de la moelle osseuse vers les sites lésés de l'organisme (Rastegar et al., 2010). Lors d'un stress tissulaire (ischémie, inflammation, etc), les différents signaux de danger qui sont libérés semblent influencer le recrutement des CSM.
- ✓ L'absence d'activité télomérase dans les CSM de moelle osseuse cultivée *in vitro*. Au cours des divisions, la longueur des télomères diminue, conduisant inéluctablement au vieillissement cellulaire (Banfi et al., 2002).

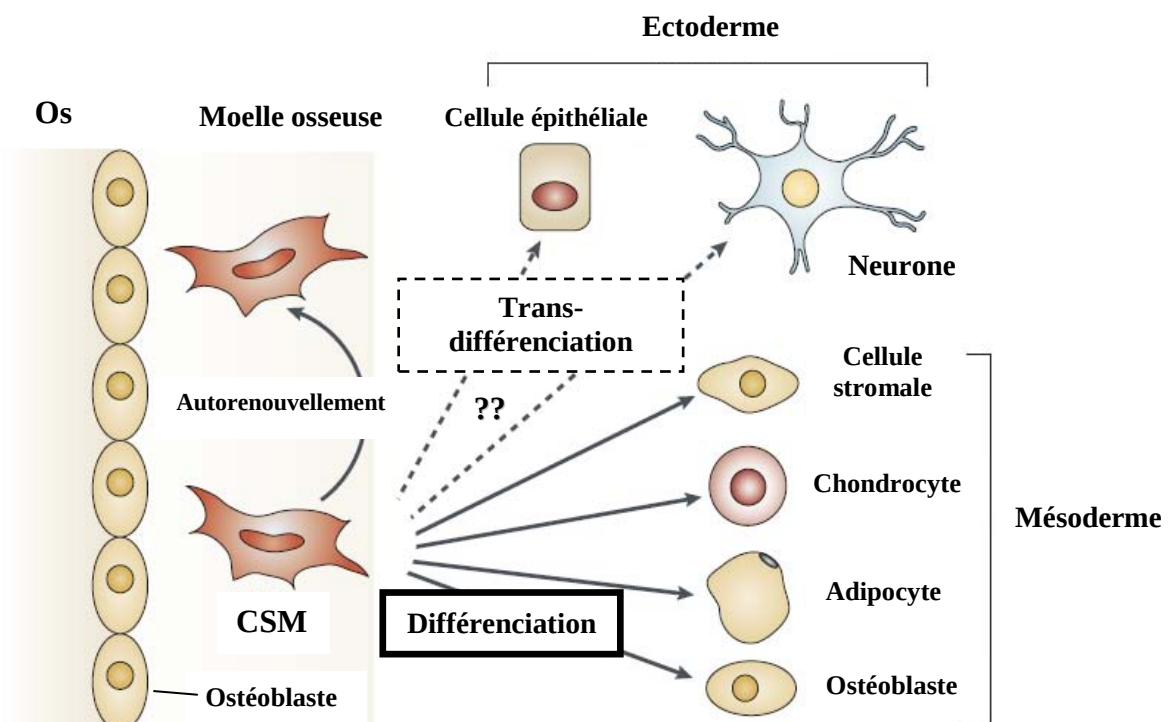


Figure 12: La multipotence des CSM.

Cette figure montre la capacité de différenciation des CSM en cellules d'origine mésodermique. Elle représente également la potentialité des CSM de se différencier *in vitro* en cellules d'origine ectodermique (phénomène de trans-différenciation). Actuellement, la trans-différenciation *in vivo* est très controversée (d'après Uccelli et al., 2008).

4. Effet immunomodulateur des CSM

Les effets immunomodulateurs des CSM ont été aussi bien démontrés *in vitro* qu'*in vivo*. Les CSM possèdent des propriétés immunosuppressives très vastes liées à la production de facteurs solubles inductibles qui inhibent l'activation des principaux effecteurs de l'immunité. Depuis quelques années, un certain nombre d'études commence à élucider les mécanismes d'action intervenant dans l'interaction des CSM avec les différents effecteurs de l'immunité adaptative et innée.

Les effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative sont nombreux. Les CSM ont la capacité de protéger les lymphocytes T ($T\alpha\beta$) de l'apoptose tout en inhibant leur activation et leur prolifération en réponse à de nombreux stimuli (Benvenuto et al., 2007). De nombreuses molécules solubles interviennent dans cet effet : les prostaglandines E2 (PGE2), les molécules HLA-G solubles (sHLA-G), les cytokines immunosuppressives comme l'interleukine-10 (IL-10) et le transforming growth factor- β (TGF- β), etc. Les CSM favorisent la différenciation des lymphocytes $T\alpha\beta$ en lymphocytes régulateurs (Treg). De plus, les CSM semblent freiner la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules matures productrices d'anticorps (Rafei et al., 2008). Enfin, les CSM inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques ainsi que la maturation de ces dernières de façon dépendante des PGE2, de l'IL-6 et de l'IL-10 (Nauta et al., 2006). Les cellules dendritiques produisent moins d'IL-12 (cytokines pro-inflammatoire) et ainsi, leur capacité à activer les lymphocytes T est diminuée (**Figure 13**) (Menard and Tarte, 2011).

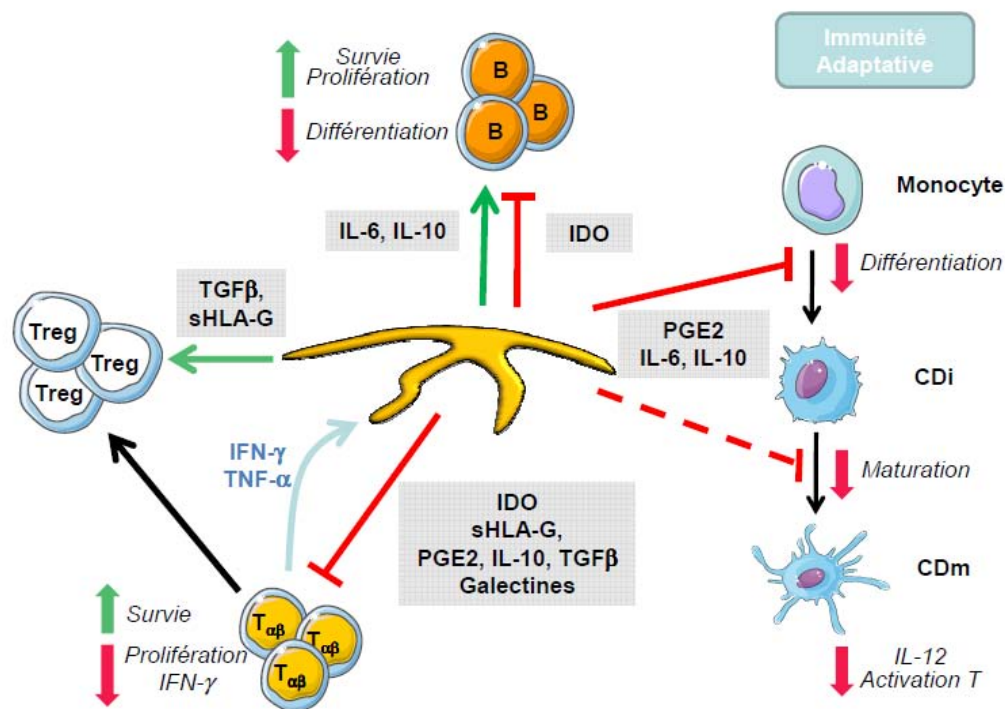


Figure 13: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative.

Les CSM permettent la survie des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$ tout en inhibant leur prolifération et leur synthèse d' $IFN-\gamma$ via la production d'une combinaison de facteurs solubles et membranaires dont la plupart sont induits par l' $IFN-\gamma$ et le $TNF-\alpha$ produits par les lymphocytes T activés. Elles favorisent également la différenciation des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$ en lymphocytes T régulateurs (Treg) via la synthèse de $TGF-\beta$ et de HLA-G soluble. Par ailleurs, en l'absence de facteurs inflammatoires, les CSM permettent la survie et la prolifération des lymphocytes B par la production des facteurs de croissance IL-6 et IL-10, tout en inhibant leur différenciation terminale en plasmocytes producteurs d'anticorps via des mécanismes mal identifiés. Enfin, les CSM inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (CD) immatures et la maturation de ces dernières de façon dépendante des PGE2, de l'IL-6 et de l'IL-10. (CDi : cellule dendritique immature, CDm : cellule dendritique mature, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase = enzyme immunosuppressive, $IFN-\gamma$: interféron- γ , $TNF-\alpha$: tumor necrosis factor- α) (d'après Ménard and Tarte, 2011).

Les cellules de l'immunité innée sont également des cibles potentielles du pouvoir d'immunomodulation des CSM. Ces dernières ont été décrites comme inhibant la prolifération et la cytotoxicité des cellules *natural killer* (NK) en réduisant leur production d' $IFN-\gamma$ en réponse à l'action concertée de plusieurs facteurs solubles (Aggarwal and Pittenger, 2005). Les capacités de prolifération, de cytotoxicité et de sécrétion d' $IFN-\gamma$ des lymphocytes $T\gamma\delta$ sont également inhibées par les PGE2 produites par les CSM (Martinet et al., 2009). L'action des CSM sur les macrophages est encore mal connue. Par l'intermédiaire des PGE2, les CSM inhiberaient la production d'IL-12 et de $TNF-\alpha$ (cytokines pro-

inflammatoires) et augmenteraient la sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) des macrophages (Kim and Hematti, 2009). Enfin, alors que la survie des polynucléaires neutrophiles est augmentée par les CSM, ces dernières inhibent la migration et le burst oxydatif de ces polynucléaires *via* la synthèse respectivement d'IL-6 et de TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 protein = protéine anti-inflammatoire) (Menard and Tarte, 2011) (**Figure 14**).

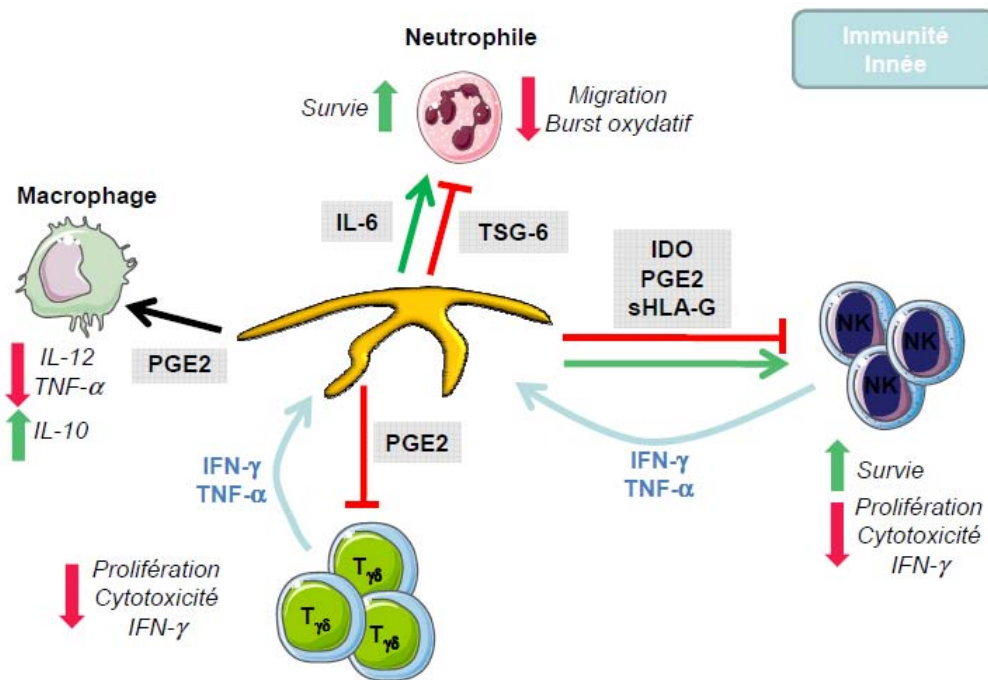


Figure 14: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée.

Les CSM inhibent la prolifération, la cytotoxicité et la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les cellules NK qui produisent l'IFN- γ et le TNF- α indispensables à l'induction de ce phénotype inhibiteur. Par ailleurs, les CSM modifient le profil d'activation des macrophages qui produisent moins de cytokines pro-inflammatoires et plus d'IL-10 en réponse aux PGE2. Enfin, alors que la survie des polynucléaires neutrophiles est augmentée par les CSM, ces dernières inhibent la migration et le burst oxydatif de ces polynucléaires *via* la synthèse respectivement d'IL-6 et de TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 protein) (d'après Ménard et Tarte, 2011).

In vivo, les propriétés immunosuppressives des CSM ont également été prouvées. En effet, des CSM allogéniques injectées chez le primate prolongent la survie d'un greffon de peau allogénique (Bartholomew et al., 2002). Dans un modèle murin de lupus érythémateux disséminé, l'injection de CSM a amélioré la maladie en inhibant les lymphocytes T et B autoréactifs (Deng et al., 2005). Enfin, certaines études ont montré l'intérêt des CSM en immunothérapie. Chez l'animal, l'administration de CSM induit la tolérance d'organes lors d'allogreffes et montre un rôle bénéfique comme traitement préventif de la maladie du greffon

contre l'hôte (GVHD) (Tisato et al., 2007). Chez l'homme, l'injection de CSM dans le traitement de la GVHD, de haut grade cortico-résistante, a montré des résultats très encourageants et a apporté la preuve de l'efficacité clinique de ces cellules en matière d'immunosuppression. La GVHD est une complication fréquente et très sévère de l'allogreffe de CSH. Elle se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme étrangers par les effecteurs immuns présents dans le greffon. La principale étude publiée à ce jour chez 55 patients atteints de GVHD sévère cortico-résistante et traités par une ou plusieurs injections de CSM fait état d'un taux exceptionnel de réponses complètes atteignant 43 % chez l'adulte et 68 % chez l'enfant. Le taux de survie à 2 ans atteignait même 52 % contre à peine 10 % attendus avec les autres thérapeutiques disponibles (Le Blanc et al., 2008).

L'absence d'immunogénicité caractérise également les CSM. En effet, ces dernières n'expriment pas les antigènes HLA de classe II, ni les molécules de co-stimulation, telles que CD40, CD80 et CD86.

Ces propriétés immunomodulatrices des CSM offrent des perspectives intéressantes quant à leur utilisation en situation allogénique.

5. Paramètres en faveur de l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire et tissulaire

Un bon nombre de paramètres propres aux CSM, dont certains ont déjà été évoqués précédemment, font de ces cellules une source incontournable dans l'utilisation de ces dernières à des fins thérapeutiques (Pittenger and Martin, 2004). Ces paramètres sont les suivants :

- Les CSM sont relativement faciles à isoler.
- Elles possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour des utilisations thérapeutiques.
- Elles sont caractérisées par leur importante plasticité. La plasticité cellulaire correspond à l'aptitude des CS à générer des cellules n'appartenant pas à leur tissu d'origine. Les CSM sont capables d'engendrer toutes les cellules d'origine mésodermiques mais aussi des cellules provenant des deux autres feuillets embryonnaires (phénomène de trans-différenciation encore amplement discuté).

- Elles possèdent un potentiel de réparation tissulaire et la capacité, en fonction des signaux de l'environnement, de migrer vers les sites lésés de l'organisme.
- Leur propriété d'immunomodulation confère aux CSM un atout majeur quant à leur utilisation ciblant des maladies dysimmunitaires. De plus, leur faible immunogénicité permet d'envisager leur utilisation en situation allogénique.
- Les CSM ne présentent aucune toxicité à court terme après leur injection chez l'homme (Lazarus et al., 1995).

A l'heure actuelle, les CSM sont utilisées dans plus d'une centaine d'essais cliniques (**Figure 15**) et dans des indications très variées telles que les lésions osseuses et cartilagineuses, l'infarctus du myocarde, la maladie du greffon contre l'hôte, des maladies auto-immunes ou encore dans des pathologies neurodégénératives par exemple (Trounson et al., 2011).

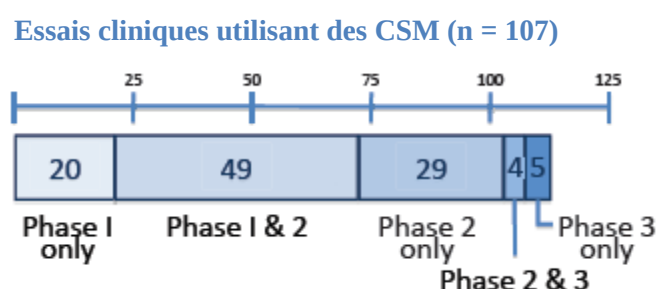


Figure 15: Représentation schématique des essais cliniques utilisant des CSM par phases cliniques.

(n : nombre d'essais)(d'après Trounson et al., 2011).

6. Risques potentiels de l'utilisation des CSM à des fins thérapeutiques

Les propriétés fonctionnelles immunosuppressives et de différenciation des CSM pourraient induire certains risques *in vivo*. L'immunosuppression engendrée par l'injection de CSM en trop grande quantité, chez l'Homme, pourrait conduire à une forte immunodépression. Cette dernière engendrerait un risque accru d'infections ou d'apparition de tumeurs (Roux et al., 2011).

La littérature scientifique a connu ces dernières années, l'émergence de données suggérant la possibilité d'une transformation maligne des CSM lors de culture *in vitro* à long terme (Rosland et al., 2009).

Certaines équipes ont également démontré la présence d'anomalies génétiques dans les CSM en culture. Ces anomalies, en particulier des aneuploïdies, ont été observées sans qu'il n'y ait pour autant des transformations cellulaires *in vitro* ni de formations tumorales *in vivo* (Tarte et al., 2010).

Enfin, une meilleure connaissance de la biologie et des mécanismes d'action des CSM *in vivo*, permettrait une utilisation adaptée et à moindre risque de ces dernières chez l'homme. Cela contribuerait à mieux comprendre les mécanismes d'homéostasie et de régénération tissulaire et ouvrirait la voie à des protocoles de thérapie cellulaire. Dans cet objectif, l'identification d'un marqueur spécifique des CSM serait indispensable. De plus, les essais cliniques actuellement en cours et utilisant des CSM, fourniront dans les années à venir des données importantes sur la toxicité ou non à long terme de ces CS.

IV. Les cellules souches unipotentes

A. Définition

Les cellules souches unipotentes possèdent une capacité d'autorenouvellement et de différenciation vers un seul type de cellule spécialisée. Ainsi, elles permettent le renouvellement permanent du tissu dans lequel elles se trouvent. Elles se localisent dans les tissus adultes au niveau du foie, des gonades, des muscles et dans certains épithéliums de la muqueuse intestinale, de la cornée, de la peau et du follicule pileux. La connaissance de ces CS unipotentes est moins développée que celle des CS décrites précédemment. En effet, leur potentiel de différenciation extrêmement limité ainsi que leur relative difficulté à être isolées, ont souvent conduit les chercheurs vers d'autres sources de CS.

B. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules hautement spécialisées. Néanmoins, ils sont susceptibles de se diviser et de s'autorenouveler pour assurer le turn over normal du parenchyme hépatique ou pour compenser une perte tissulaire dans certaines situations pathologiques ou d'agression. Cette propriété permet de considérer les hépatocytes comme des cellules souches unipotentes. Malheureusement, l'utilisation thérapeutique des hépatocytes est limitée par la difficulté d'obtenir et de conserver ces cellules en quantité suffisante (Guettier, 2005). D'autres cellules souches ou progénitrices intra-hépatiques ont été identifiées (dites « cellules ovales » du foie) mais présentant, cette fois-ci, des propriétés de multipotence.

C. Les cellules souches de la lignée germinale

Les cellules souches de la lignée germinale assurent la gamétogénèse durant la vie de l'organisme. Ces CS possèdent un fort taux de prolifération et assurent l'homéostasie du tissu dans lequel elles résident. Elles sont capables de se différencier en spermatozoïde ou en ovocyte (Yuan and Yamashita, 2010). La connaissance précise de la biologie de ces cellules souches de la lignée germinale reste encore limitée.

D. Les cellules souches épithéliales

L'homéostasie du tissu épithélial est maintenue grâce à la présence de cellules souches capables de se diviser à l'identique et de se spécialiser vers des cellules de leur tissu d'origine. Ces cellules souches épithéliales sont capables de remplacer les cellules lésées suite à une altération tissulaire. Elles se localisent au niveau de la muqueuse intestinale, du follicule pileux, de la peau, de la cornée ou encore des glandes sébacées (**Figure 16**) (Blanpain et al., 2007). L'épithélium de l'intestin est complètement renouvelé environ tous les cinq jours alors qu'au contraire, celui du follicule pileux est renouvelé toutes les quatre semaines.

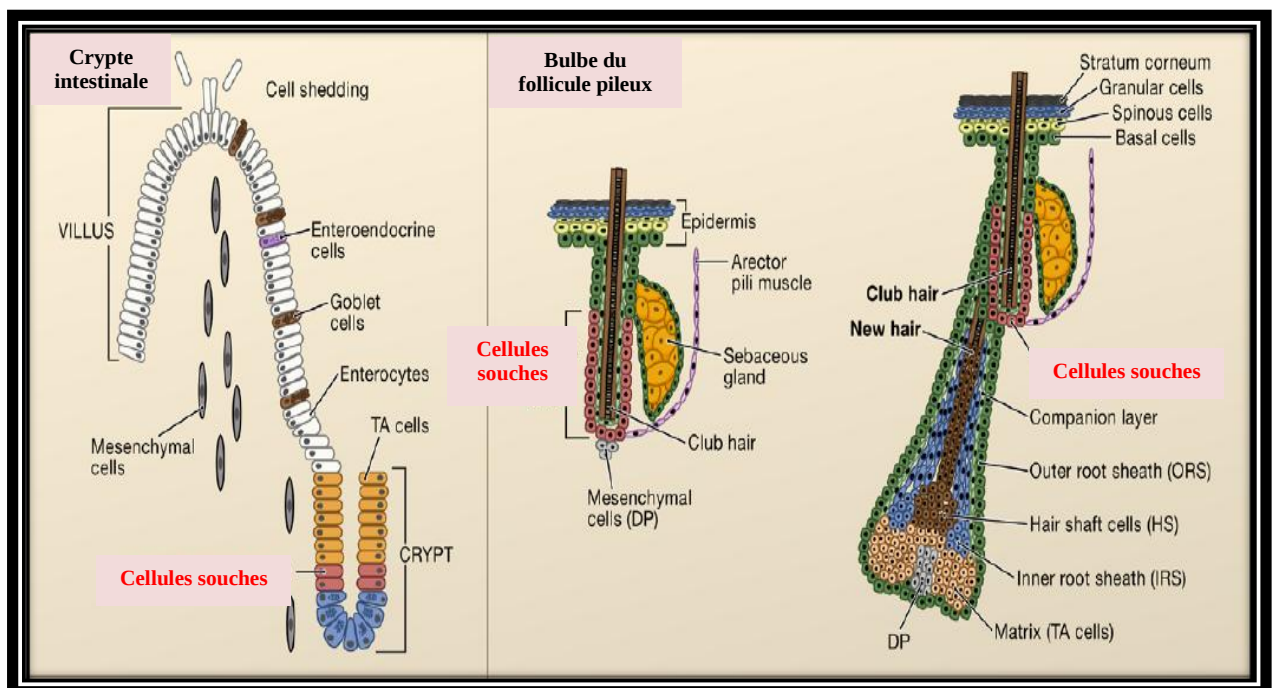


Figure 16: Localisations de cellules souches au sein de différents tissus épithéliaux. (d'après Blanpain et al., 2007).

L'équipe du Professeur Yann Barrandon a démontré, il y a quelques années, la présence de cellules souches au niveau des follicules pileux de mammifères. Ces cellules sont capables de proliférer aisément en culture *in vitro*. A partir d'une seule de ces cellules,

prélevée dans une vibrisse de rat, les chercheurs ont obtenu d'innombrables descendantes capables, une fois transplantées sous l'épiderme d'un fœtus de souris, de participer à la constitution, puis au fonctionnement normal de milliers de follicules pileux (Oshima et al., 2001). Nichées dans une zone précise du follicule appelée le renflement, elles sont capables de migrer vers la surface pour constituer les glandes sébacées, ou vers le bas pour former la papille du poil. En outre, ces cellules souches sont capables de quitter leur niche lorsque l'épiderme environnant est lésé pour participer à sa cicatrisation. De ce fait, la frontière entre unipotence et multipotence est parfois difficile à définir pour ces CS du follicule pileux.

Les cellules souches épidermiques sont situées dans la couche la plus profonde de l'épiderme, au niveau de la couche basale (**Figure 17**). Elles permettent un renouvellement permanent de la population kératinocytaire. Ces cellules souches de la peau ont pu être isolées *in vitro* à partir de cultures de kératynocytes. Une fois isolées, ces cellules ont montré un fort pouvoir de prolifération et une capacité à synthétiser un épiderme *in vitro* (Zouboulis et al., 2008). Ces cellules ont ainsi été utilisées à des fins de réparation épidermique et ont transformé le pronostic des grands brûlés. Elles permettent également d'étudier le vieillissement de la peau *in vitro* constituant ainsi, un modèle cellulaire intéressant pour l'industrie dermatologique. De plus, elles constituent un modèle d'essai attrayant pour des substances pharmaceutiques ou cosmétiques.

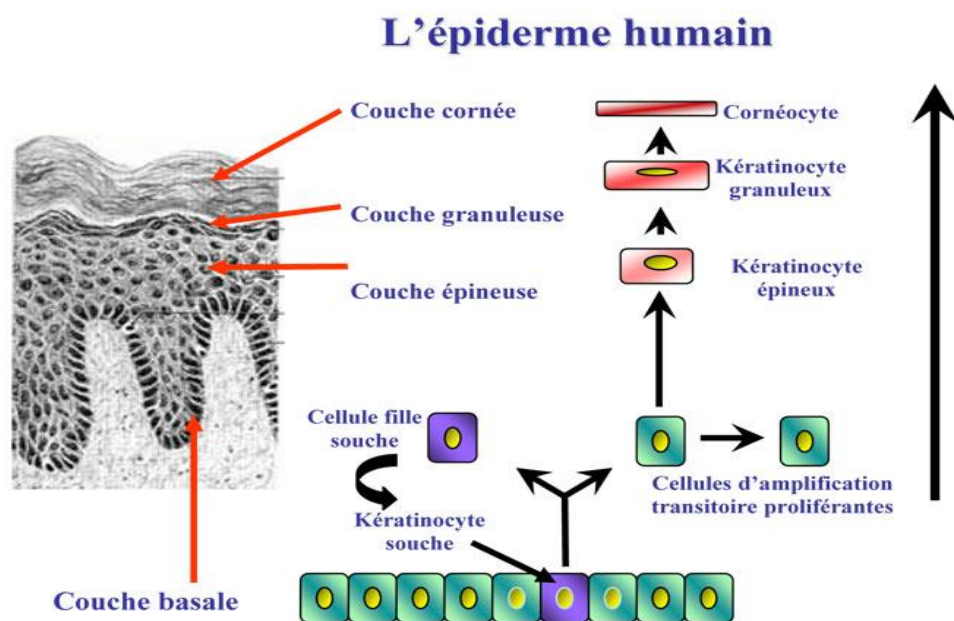


Figure 17: Représentation du renouvellement de l'épiderme humain par les kératinocytes souches.

Les deux propriétés fondamentales des CS sont bien représentées : l'autorenouvellement et la différenciation (Source : I-STEM).

V. Conclusion

Aujourd'hui, les cellules souches humaines représentent, pour les scientifiques et les cliniciens, un espoir thérapeutique majeur. Leur capacité d'autorenouvellement et de prolifération *in vitro* permettraient de constituer des lots de cellules, de grade clinique, en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique. Par ailleurs, leur potentiel de différenciation permettrait d'utiliser ces CS à des fins de réparation tissulaire et de médecine régénératrice suite à une lésion tissulaire accidentelle ou pathologique. Les différentes populations de CS humaines possèdent des caractéristiques propres (**Tableau 3**) qui permettent d'envisager leur utilisation thérapeutique à plus ou moins long terme.

Les CSE suscitent depuis une vingtaine d'années de larges espoirs quant à leur utilisation en médecine régénératrice. Leur capacité de différenciation vers tous les types tissulaires de l'organisme devrait permettre de traiter un plus grand nombre de pathologies. Cependant, ces CS se heurtent à différents obstacles notamment d'ordre éthique qui ont tendance à ralentir les avancées scientifiques dans ce domaine, en France. C'est la raison pour laquelle, certaines équipes se sont intéressées aux cellules iPS qui possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les CSE, sans poser de problèmes d'éthiques. Néanmoins, les techniques d'obtention de ces cellules doivent encore être améliorées afin d'obtenir des cellules dont l'utilisation soit totalement sûre.

Les CSH ont largement démontré leur utilité en thérapie cellulaire. Elles sont capables de reconstituer le tissu hématopoïétique d'un individu après l'administration d'une chimiothérapie anticancéreuse indiquée dans certaines hémopathies malignes par exemple.

Les CSM représentent, à l'heure actuelle, une source cellulaire très prometteuse dans des applications de thérapie cellulaire et d'ingénierie tissulaire. Leur propriété d'immunomodulation faciliterait l'utilisation de ces cellules en situation allogénique. Cependant, une connaissance approfondie de la biologie de ces cellules *in vivo* permettrait une utilisation adaptée de ces dernières chez l'Homme.

Enfin, les CS unipotentes, de par leur capacité de différenciation limitée et leur isolement parfois difficile, offrent des perspectives thérapeutiques assez restreintes. Les CS épidermiques peuvent toutefois, constituer un outil de thérapie tissulaire intéressant dans la réparation de la peau, par exemple.

	Cellules souches pluripotentes		Cellules souches multipotentes		Cellules souches unipotentes
Caractéristiques	CSE	IPS	CSH	CSM	
<i>Accessibilité</i>	Facile (lignées)	Facile	Facile	Facile	Plus difficile (biopsie cutanée, par exemple)
<i>Quantité</i>	Potentiellement illimitée	Potentiellement illimitée	Importante	Importante	Importante
<i>Plasticité</i>	+++	+++	+	++	-
<i>Potentiel régénérateur</i>	Pluripotent	Pluripotent	Multipotent	Multipotent	Unipotent
<i>Capacités de prolifération et d'amplification in vitro</i>	Grande et illimitée	Grande et illimitée	Limitée (sénescence cellulaire)	Limitée (sénescence cellulaire)	Limitée (sénescence cellulaire)
<i>Risque tumorigène</i>	Réel (si injectées non différenciées)	Réel (si injectées non différenciées) + mutagenèse insertionnelle	Non	Faible (transformation maligne à long terme en culture <i>in vitro</i>)	Inconnu
<i>Risque immunitaire</i>	Présent (HLA compatible)	Absent	Présent (compatibilité HLA la plus fine possible) Moins exigeant pour le sang placentaire	Faible	Présent si allogreffes (HLA compatible)
<i>Débat éthique</i>	Vif	Absent	Absent	Absent	Absent
<i>Perspectives thérapeutiques</i>	Envisageables (ralenties par la réglementation)	Lointaines	Déjà utilisées en routine (hémopathies malignes)	Proche (thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire)	Utilisées pour les greffes de peau (CS épidermiques)

Tableau 3: Comparaison des propriétés des différentes cellules souches humaines.

(+++ : très importante ; ++ : importante ; + : faible ; - : nulle).

Partie II :

**Aspects réglementaires de
l'utilisation des cellules souches
humaines à des fins thérapeutiques et
de recherches.**

L'utilisation des cellules souches humaines, en clinique ou en recherche, est encadrée par un ensemble de textes législatifs et réglementaires stipulés dans le Code de la Santé Publique. A l'exception des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches de la peau, les cellules souches sont principalement utilisées en recherche fondamentale ou clinique. Ces recherches sont régies par l'ensemble des dispositions, couvrant l'utilisation des éléments et produits du corps humain à des fins médicales ou scientifiques, mentionnées dans la **loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique**. Très récemment, cette loi a fait l'objet d'une révision de la part des parlementaires aboutissant à la promulgation de la **loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (Annexe)**. Deux types de cellules souches humaines sont spécifiquement traités dans cette loi de bioéthique : les cellules souches embryonnaires, dont la recherche est strictement réglementée, et les cellules souches hématopoïétiques, dont seule l'utilisation clinique est mentionnée. Cette loi de bioéthique constitue donc un élément majeur du cadre juridique des cellules souches, en traitant du don, de la conservation et de l'utilisation des éléments et produits du corps humain. La dernière révision de cette loi apporte quelques changements concernant le statut réglementaire des cellules souches.

I. La recherche sur les CSE humaines

La production d'une lignée de CSE humaine nécessite obligatoirement la destruction d'un embryon humain. Cet acte est suffisamment significatif pour que toute action en découlant soit réglementée avec précision.

A. Les grandes lignes de la loi

D'après la loi de bioéthique de 2011, la conception *in vitro* d'embryon ou la constitution par clonage d'un embryon humain à des fins de recherche est interdite (*Art. L. 2151-2*). En droit français, l'interdiction de la recherche sur l'embryon et sur les CSE a été assortie de dérogations dans des conditions très strictes (*Art. L. 2151-5*). Cet assouplissement de la loi résulte d'un compromis trouvé entre les parlementaires hostiles à la recherche sur l'embryon au nom du respect de la dignité humaine, et ceux qui en étaient partisans au nom de la liberté de la recherche. A titre dérogatoire et pour une durée maximale de cinq ans, la loi prévoit la possibilité pour les équipes de recherche française d'effectuer des recherches sur les CSE. Ces investigations sont autorisées sous plusieurs conditions, parmi lesquelles (*Art. L. 2151-5*) :

- Elles sont susceptibles de permettre des progrès médicaux majeurs, notamment dans la recherche de traitement de maladies graves ou incurables, ainsi que de traitement des affections de l'embryon ou du fœtus.
- Elles ne peuvent être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable en l'état des connaissances scientifiques.
- Elles sont conduites sur des embryons surnuméraires conçus au départ, *in vitro*, dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation (AMP) et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Le consentement écrit du couple est recueilli à deux reprises, à trois mois d'intervalle. Il est dûment informé des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou de leur destruction. Leur consentement est révocable à tout moment et sans motif, tant que les recherches n'ont pas débuté.
- Elles peuvent être conduites sur des embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire.
- Les protocoles de recherche font l'objet d'une autorisation par l'**Agence de la Biomédecine**^{*}, après avis de son conseil d'orientation, en fonction de leur pertinence scientifique, de leurs conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques et de leur intérêt pour la santé publique. Dans un bilan publié en 2008, l'Agence de la Biomédecine indique que de 2004 à 2009, 37 protocoles de recherche concernant les CSE ont été autorisés (Hermange, 2010).
- Les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation.

Très récemment et après un débat de longue haleine, le Sénat, pourtant favorable en première lecture à une évolution de la loi vers une autorisation encadrée de la recherche sur les CSE, s'est finalement rangé début juin 2011 à l'avis du gouvernement et de la majorité des députés. Les 21 et 23 juin 2011, l'Assemblée nationale puis le Sénat, ont donc adopté définitivement le projet de loi concernant la révision de la loi de bioéthique de 2004. Ainsi, elle maintient l'interdiction de mener en France des recherches sur l'embryon et les CSE, sauf dérogations spéciales et strictement encadrées. Ce *statu quo* a suscité de vives déceptions de

la part des scientifiques français qui considèrent cette décision parlementaire comme rétrograde, à contre courant de certains de leurs partenaires européens et internationaux.

La loi permet également, après autorisation de l'Agence de la Biomédecine, d'importer ou d'exporter des CSE dans le cadre de ces recherches (Art. L. 2151-6).

Tout organisme qui assure, à des fins de recherche, la conservation des CSE doit être titulaire d'une autorisation délivrée par l'Agence de la Biomédecine (Art. L. 2151-7).

L'autorisation délivrée à titre dérogatoire, permettant de travailler sur les CSE, n'est donnée qu'à des fins de recherche et non à des fins de développement industriel. Un embryon humain ne peut être ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé, à des fins commerciales ou industrielles (Art. L. 2151-3).

Les lignées de CSE utilisées pour ces recherches peuvent avoir deux origines : elles peuvent provenir d'embryons surnuméraires cédés à la recherche, ou être importées depuis l'étranger.

B. Obtention de lignées de CSE en France

En premier lieu, une lignée de CSE peut être produite à partir d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une démarche d'assistance médicale à la procréation (AMP). Trois types d'embryons sont concernés :

- ✓ Les embryons surnuméraires sains, congelés et ne faisant plus l'objet d'un projet parental.
- ✓ Les embryons issus de fécondation *in vitro* mais dont la qualité empêche leur utilisation à des fins de procréation.
- ✓ Les embryons porteurs de maladies génétiques, repérés lors d'un diagnostic préimplantatoire. Ces lignées réalisées à partir de tels embryons peuvent servir de modèles précieux dans la recherche du développement de ces maladies.

Dans tous les cas, le consentement, libre et éclairé, du couple à l'origine de la conception des embryons utilisés doit être recueilli. Ainsi, il décide de faire don de ses embryons à la recherche.

L'obtention de lignées de CSE humaines à partir d'embryons nécessite un savoir-faire et une technicité très difficiles à acquérir. A l'heure actuelle, très peu d'équipes en France s'y sont attelées. D'après les chiffres de l'Agence de la Biomédecine, qui est chargée par la loi de tenir un registre des lignées de CSE dérivées en France, 27 lignées ont été dérivées depuis 2004, dont une seule produite à partir d'un embryon sain.

Dans un second temps et afin de faciliter l'accès aux CSE humaines pour les équipes de recherche française, la loi de bioéthique a prévu la possibilité d'importer des lignées obtenues à l'étranger. Cette importation fait également l'objet d'une autorisation délivrée par l'Agence de la Biomédecine. Elle s'assure que les conditions dans lesquelles les embryons ont été donnés par les couples sont en accord avec les conditions pratiquées en France. Depuis 2004, 43 autorisations d'importation ont été délivrées (De Guerra et al., 2010).

C. Etats des lieux des législations étrangères

Les législations concernant l'utilisation de l'embryon et des CSE à des fins de recherche présentent une certaine disparité à travers le monde. Les législations en vigueur peuvent être classées en quatre catégories :

- *Législation permissive* : l'utilisation de la majorité des techniques est permise concernant la recherche sur l'embryon, à l'exception du clonage reproductif*. C'est le cas du Royaume-Uni, de la Belgique, de l'Espagne, des Etats-Unis, de Singapour.
- *Législation permissive avec restriction* : les recherches sur l'embryon et les lignées de CSE humaines sont permises (ou non interdites), ainsi que la dérivation de nouvelles lignées à partir d'embryons surnuméraires. Par contre, la technique de clonage thérapeutique et la création d'embryons pour la recherche sont interdites. C'est le cas du Canada, des Pays-Bas, du Brésil.
- *Législation restrictive* : les recherches sur l'embryon (donc dérivation de lignées de CSE) sont interdites, mais pas les recherches utilisant des lignées importées de l'étranger. C'est le cas de l'Allemagne, de l'Italie.
- *Législation d'interdiction* : l'ensemble des recherches est interdit : recherches sur l'embryon, dérivation de lignées de CSE, recherche sur les CSE humaines, même importées. C'est le cas de la Pologne, de l'Irlande, de la Russie.

La disparité des dispositions réglementaires concernant l'utilisation des CSE à travers le monde est telle, qu'il est parfois difficile de classer certains pays dans l'une ou l'autre des catégories. C'est le cas par exemple de la France dont les dispositions réglementaires se rapprochent plutôt d'une législation restrictive avec la possibilité de dérogations.

II. L'utilisation clinique des CSH

A. Conditions du don de CSH

La réglementation concernant le don de CSH est régie par la loi de bioéthique de 2011 encadrant le don et l'utilisation des éléments et produits du corps humain. En application de cette loi, le don de CSH est libre, gratuit et, dans le cas des donneurs non apparentés, anonyme, quelle que soit l'origine des cellules (moelle osseuse, sang périphérique ou sang placentaire). Ces principes sont globalement les mêmes partout en Europe, et sont régis par la directive européenne 2004/23/EC. Dans la loi de bioéthique de 2004, le recueil du consentement au prélèvement des CSH était soumis à des réglementations différentes en fonction de l'origine des cellules. Depuis la révision de la loi, les dispositions réglementaires tendent vers une harmonisation du régime juridique des CSH.

Lors d'un prélèvement de CSH par ponction intra-osseuse (CSH de la moelle osseuse) ou par cytophérèse (CSH du sang périphérique), le recueil du consentement est soumis aux conditions dictées par l'article *L. 1241-1* du Code de la Santé Publique. Ce dernier précise en particulier que le donneur doit être préalablement informé des risques et des conséquences éventuelles du prélèvement. Il doit exprimer son consentement devant le tribunal de grande instance (TGI) ou le magistrat désigné par lui, qui s'assure au préalable que le consentement est libre et éclairé. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment. Le donneur mineur, accompagné de ses parents ou du titulaire de l'autorité parentale, donne son consentement devant un comité d'experts et le TGI.

Dernièrement, les modalités de don et de prélèvement des CSH du sang placentaire ont également évolué et seront détaillées dans le troisième chapitre de cette partie.

Le prélèvement et la collecte des CSH, destinées à des fins thérapeutiques, sont soumis aux règles de sécurité sanitaire en vigueur (*Art. L. 1211-6*).

La loi de bioéthique de 2004 (*Art. L. 1418-1*) a spécifiquement intégré dans les missions de l'Agence de la Biomédecine, celles du **Registre France Greffe de moelle** (RFGM). Son objectif est de favoriser l'accès à la greffe de CSH pour les patients atteints de maladies hématopoïétiques graves et ne pouvant bénéficier d'une greffe apparentée. Initialement créé en 1986 par les Professeurs Jean Dausset et Jean Bernard, le RFGM assure la gestion du fichier des donneurs volontaires de CSH, ainsi que l'interrogation des registres internationaux et l'organisation de la mise à disposition des greffons. Le RFGM s'appuie également sur un réseau national de centres receveurs et greffeurs, responsables de l'inscription des patients. Ainsi, le RFGM joue véritablement un rôle d'interface entre centres donneurs et centres receveurs de façon à optimiser au mieux l'accès à la greffe de CSH.

B. Conditions d'autorisation des établissements de santé

Les trois étapes fondamentales de l'utilisation clinique des CSH, que sont le prélèvement, la conservation puis la greffe de ces cellules, sont soumises à des autorisations. Ces dernières sont accordées pour une durée de cinq ans et sont renouvelables.

Les cellules ne peuvent être prélevées à des fins d'administration autologue ou allogénique que dans des établissements de santé autorisés à cet effet par le directeur général de l'**Agence régionale de santé*** (ARS), après avis de l'Agence de la Biomédecine. Les CSH peuvent également être prélevées par l'Etablissement français du sang, dans ses établissements de transfusion sanguine, s'ils ont été autorisés dans les conditions applicables aux établissements de santé (*Art. L. 1242-1*).

Les établissements ou les organismes souhaitant réaliser la préparation, la conservation, la distribution et la cession, à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, des tissus et de leurs dérivés et des préparations de thérapie cellulaire, doivent obtenir une autorisation de l'**Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*** (AFSSaPS) (*Art. L. 1243-2*). Cette autorisation est accordée après l'évaluation de leurs procédés de préparation et de conservation, ainsi que de leurs indications thérapeutiques (*Art L. 1243-5*). L'autorisation n'est délivrée qu'après avis de l'Agence de la Biomédecine (**Tableau 4**). L'origine des cellules (moelle osseuse, sang périphérique ou sang placentaire) ne change rien à cette disposition.

* cf. lexique

Etablissement	Adresse	Activités Autorisées
Institut Paoli Calmette	Centre régional de lutte contre le cancer 232 boulevard Sainte Marguerite BP 158 13273 Marseille Cedex 9	Préparation, conservation, distribution ou cession de cellules souches hématopoïétiques autologues ou allogéniques et de cellules sanguines mononucléées allogéniques
TBF Génie Tissulaire	8 rue d'Italie ZI Leopha 68780 Mions	Préparation, conservation, distribution ou cession de chondrocytes autologues et de cellules souches mésenchymateuses autologues
Centre Hospitalier Régional Universitaire	Hôpital Saint Eloi 80, avenue Augustin Fliche 34295 Montpellier cedex 5	Préparation, conservation, distribution ou cession de cellules souches hématopoïétiques autologues ou allogéniques et de cellules sanguines mononucléées allogéniques
Centre Hospitalier	Hôpital E. Muller 87, avenue d'Altkirch BP 1070 68051 Mulhouse Cedex	Préparation, conservation, distribution ou cession de cellules souches hématopoïétiques autologues
Centre Hospitalier Universitaire	Hôpital de Brabois Avenue du Morvan 54550 Nancy-Vandoeuvre	Préparation, conservation, distribution ou cession de cellules souches hématopoïétiques autologues ou allogéniques et de cellules sanguines mononucléées autologues ou allogéniques
EFS Pays de la Loire	34, Boulevard Jean Monnet 44011 Nantes Cedex 1	Préparation, conservation, distribution ou cession de cellules souches hématopoïétiques autologues ou allogéniques, cellules sanguines mononucléées autologues ou allogéniques

Tableau 4: Extrait de la liste des unités de thérapie cellulaire autorisées par l'AFSSaPS.
(Article L. 1243-2 du code de la santé publique)(Afssaps - 25 mai 2011)(www.afssaps.fr).

La procédure d'autorisation des établissements repose sur l'élaboration d'un dossier mentionnant entre autres, la nature des activités, la description des locaux, la description des équipements et du matériel, la qualification du personnel ainsi que la liste des procédures internes. L'inspection sur site par l'AFSSaPS constitue également un point important dans la procédure d'autorisation. L'évaluation des procédés est quant à elle, basée sur un dossier comprenant des informations concernant :

- ✓ Les tissus ou les cellules prélevées
- ✓ Les étapes du procédé de préparation
- ✓ Les méthodes et les critères de contrôle qualité
- ✓ Les tissus et les cellules résultant du procédé
- ✓ La qualité du produit
- ✓ Les indications thérapeutiques

L'activité de greffe allogénique de CSH est soumise à une autorisation du SIOS (Schéma Interrégional d'Organisation Sanitaire) (décret 2006-73 du 24 janvier 2006), contrairement à la greffe autologue qui ne l'est pas. L'autorisation de pratiquer l'activité de greffes de CSH ne peut être délivrée qu'à un établissement de santé remplissant certaines conditions prévues aux articles *L. 1243-6* et *L. 6122-2*, qui concernent les infrastructures et les activités présentes dans l'établissement.

L'importation et l'exportation des CSH à des fins thérapeutiques sont soumises à autorisation et seuls peuvent exercer ces activités des établissements autorisés par l'AFSSaPS (*Art. L. 1245-5*).

Dans un souci d'amélioration de la prise en charge des patients et des donneurs, de leur sécurité, des conditions de travail des équipes, un programme européen d'accréditation a été mis en place dans certains centres de greffe. Le programme JACIE (Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT) (Boccaccio et al., 2008) est un programme européen d'accréditation adapté du programme américain FACT (Foundation for the Accreditation of Cell Therapy) et touchant à l'ensemble des activités de greffe de cellules souches hématopoïétiques. A l'initiative de la société européenne de greffe EBMT (European group for Blood and Marrow Transplantation), le programme a été largement promu en Europe et devrait devenir obligatoire dans les prochaines années pour les centres souhaitant mener une activité de greffe allogénique avec donneur non apparenté. Le programme s'appuie sur un référentiel décrivant les standards requis pour les trois partenaires intervenant dans le processus de greffe : clinique, prélèvement, et unité de thérapie cellulaire. Le développement de ce programme dans les centres est long, difficile, et nécessite l'aide de professionnels de la qualité, mais il est fédérateur, source d'amélioration des soins, et à terme, le savoir-faire devrait largement déborder le seul champ de la greffe pour bénéficier aux autres activités hématologiques.

III. Les cellules souches du sang placentaire

A. Le statut juridique

Nous avons vu précédemment que les CS du sang placentaire constituaient une source cellulaire intéressante dans la constitution de greffons de CSH allogéniques. A l'heure actuelle, en France, seule l'utilisation allogénique des CSH du sang placentaire est autorisée par l'AFSSaPS à des fins thérapeutiques. L'activité de conservation de sang placentaire à visée autologue est illégale et il n'existe à l'évidence aucune banque autorisée à le faire. Tout prélèvement et transport de sang de cordon sur le sol français dans un but de conservation autologue est pénalement répréhensible.

Dans certains pays comme aux Etats-Unis ou encore en Suisse se sont développées des banques privées de sang placentaire pour une utilisation autologue. Leur but est de recueillir et de conserver par congélation, lors de la naissance d'un enfant, du sang placentaire en vue du traitement de pathologies éventuelles que pourraient développer cet enfant. Cette conservation est réalisée, contre paiement, pendant plusieurs années. Cependant, aujourd'hui encore, les indications en médecine réparatrice de ce type d'utilisation à visée autologue, vantées par ces sociétés, restent hypothétiques et répondent davantage à des objectifs économiques. De plus, cette démarche s'oppose aux fondements même de la greffe d'organe qui s'est toujours constituée en un acte non lucratif, fondé sur des principes de gratuité, de solidarité, de transparence et de règles éthiques. Dans les années à venir, il sera nécessaire de favoriser la greffe allogénique destinée à la collectivité et dont l'intérêt a été prouvé. Ceci fera l'objet d'une collection la plus large possible d'unités de sang placentaire conservées dans des banques publiques.

En France, la nouvelle loi de bioéthique de 2011 a fondamentalement changé le statut réglementaire des CSH du sang placentaire. Ce dernier n'est plus considéré comme un déchet opératoire mais bien comme une source de CSH au même titre que la moelle osseuse et le sang périphérique. L'objectif de cette nouvelle disposition réglementaire est de renforcer la protection des banques de sang placentaire allogéniques et de contrer l'implantation de banques de sang placentaire privées à visée autologue.

B. Le Réseau Français de Sang Placentaire

En France, il existe un réseau d'établissements publics de conservation de sang de cordon, le **Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP)**. L'Agence de la Biomédecine est responsable du pilotage du RFSP et de sa stratégie d'extension. Ce réseau structure l'activité de conservation des unités de sang placentaire, au travers des banques autorisées, et regroupe un ensemble de maternités associées à ces banques. Les banques peuvent être situées dans des sites de l'Etablissement français du sang ou dans des établissements de santé du type Centre hospitalier universitaire ou Centre de lutte contre le cancer. Ce RFSP s'inscrit dans une démarche qualité validée et formalisée à tous les niveaux de la chaîne depuis l'information de la femme enceinte jusqu'à la conservation du sang de cordon qui permet la distribution en vue de la greffe de greffons parfaitement sécurisés et suffisamment riches en cellules. L'organisation générale du dispositif répond à des procédures communes à l'ensemble du réseau et en accord avec les normes internationales. Le programme JACIE, mentionné précédemment, inclut les greffes de sang de cordon, sans toutefois inclure les procédures de collection, de typage, de conservation et de cession de ces greffons qui font l'objet d'une accréditation indépendante selon le référentiel NETCORD-FACT-JACIE. Le RFSP prend de plus en plus d'ampleur et tend à s'accroître ces prochaines années. Au Centre hospitalier universitaire de Nancy et plus précisément à l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (UTCT), une banque de sang de cordon est en cours d'ouverture (www.agence-biomédecine.fr). D'après les données de l'Agence de la Biomédecine, le RFSP recensait fin mai 2011, 12574 unités de sang placentaire stockées sur le territoire français et dont les caractéristiques sont inscrites dans sa base de données. L'objectif à atteindre pour la fin de l'année 2011 s'élève à 17332 unités de sang placentaire. Ce nombre ne cesse d'augmenter au fil des années.

C. Prélèvement et don de sang placentaire

La maternité où a lieu le prélèvement de sang placentaire doit obtenir une autorisation délivrée par l'ARS dont elle dépend. La banque où est conservé le sang placentaire, quant à elle, est soumise à une autorisation de l'AFSSaPS, après avis de l'Agence de la Biomédecine, qui ne peut être accordée que dans le cadre d'une utilisation thérapeutique. Le prélèvement et la collecte du sang de cordon à des fins thérapeutiques sont soumis aux règles de sécurité sanitaire définies par le Code de la santé publique (*Art. L. 1211-6*), concernant notamment les tests de dépistage des maladies transmissibles. Seules peuvent être préparées, conservées,

distribuées ou cédées les cellules du sang placentaire prélevées dans les conditions mentionnées ci-dessous (*Art. L. 1243-2*).

Les modalités de prélèvement des CSH du sang placentaire ont été modifiées lors de la révision de la loi de bioéthique de 2011. Le don de sang placentaire ne repose plus sur un régime de déchet opératoire et de « non opposition ». A présent, ce prélèvement ne peut avoir lieu qu'à des fins thérapeutiques ou scientifiques et à la condition que la femme, durant sa grossesse, ait donné son consentement par écrit au prélèvement et à l'utilisation de ces cellules (*Art. L. 124-1*). Des informations sur les finalités de ce don lui sont développées de façon précise. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu. Le prélèvement à des fins thérapeutiques est opéré en vue d'une utilisation anonyme, dans l'intérêt de toute personne ayant besoin d'une greffe. L'anonymat est préservé entre le donneur et le receveur. Toutefois, le nom du donneur est connu de la banque afin que l'on puisse être informé de l'examen clinique du nouveau né dans les quarante jours qui suivent l'accouchement.

Dans les cas de greffes intrafamiliales, on parle alors de don dirigé : lorsqu'au moment de l'accouchement il existe déjà un enfant malade, le prélèvement des cellules de l'enfant à naître est susceptible de soigner un des enfants de la fratrie. La conservation des cellules faisant l'objet de dons intrafamiliaux est soumise à des conditions spécifiques. En effet, elle ne peut se faire que sur prescription du médecin spécialiste prenant en charge l'enfant malade et selon certaines modalités prévues par le groupe d'experts désigné par le RFSP. Ces recommandations portent à la fois sur les indications et les modalités de conservation et de destruction des unités de sang placentaire à visée d'utilisation allogénique familiale (www.agence-biomédecine.fr). Ce don intrafamilial peut être indiqué dans certaines hémoglobinopathies, maladies métaboliques, aplasies médullaires, hémopathies, tumeurs solides ou autres affections génétiques. L'existence préalable (ou concomitante) du typage HLA de l'enfant malade est indispensable à la prescription de la conservation.

IV. L'utilisation des CS humaines en recherche

A. Don à la recherche de produits du corps humain

Le prélèvement de cellules ou de tissus sur donneur vivant est encadré par la loi de bioéthique au travers des articles *L. 1241-1* à *L. 1241-7*, énoncés précédemment pour le don de CSH. Une fois le donneur informé de l'objet du prélèvement, ainsi que des risques et des conséquences qui y sont rattachés, le consentement libre et éclairé du donneur doit être recueilli. Le consentement est révoable sans forme et à tout moment.

Les articles *L. 1232-3* et *L. 1241-5* de cette même loi, réglementent le prélèvement de tissus ou de cellules à des fins scientifiques sur donneur décédé ou en état de mort encéphalique. Ce prélèvement peut être effectué à condition qu'il soit destiné à une recherche dont le protocole a été préalablement déclaré à l'Agence de la Biomédecine (*Art. R. 1232-15* et *R. 1241-2-2*). Avant le prélèvement, il est nécessaire de s'assurer que le donneur n'a pas fait connaître, de son vivant, le refus de prélèvement, en particulier à des fins scientifiques. Il peut pour cela s'être inscrit sur le registre national des refus (au prélèvement à des fins scientifiques et/ou thérapeutiques), ou avoir manifesté cette volonté auprès de ses proches. Si ce n'est pas le cas, la personne en charge du protocole de recherche doit envoyer un dossier de déclaration à l'Agence de la Biomédecine afin de pouvoir initier le programme de prélèvement. Enfin, le protocole est transmis au ministère de la Recherche, qui a le pouvoir de suspendre ou d'interdire sa mise en œuvre à tout moment.

Une troisième source disponible pour effectuer une recherche, clinique ou non, utilisant des cellules souches est le matériel biologique (organes : têtes fémorales, cordons ombilicaux par exemple, tissus, cellules appelés communément « déchets opératoires ») prélevé à l'occasion d'une intervention chirurgicale pratiquée dans l'intérêt de la personne opérée ou lors d'un accouchement (*Art. L. 1235-2* et *L. 1245-2*). Dans ce cas, ce matériel biologique peut être utilisé à des fins scientifiques (ou thérapeutiques) sauf opposition exprimée par le patient après qu'il a été informé de l'objet de cette utilisation (régime de « non opposition »). Ce statut réglementaire est applicable notamment aux cellules souches issues du cordon ombilical, à l'exception des CSH du sang placentaire (CSM de la gelée de Wharton par exemple).

B. L'utilisation des CS en recherche clinique

Aujourd'hui et à travers le monde, un grand nombre de protocoles de recherche clinique se basent sur les propriétés des CS, en particulier leur capacité supposée de régénération *in vivo* et leurs propriétés d'immunomodulation (dans le cas des CSM). Ces essais cliniques portant sur l'usage de produit de thérapie cellulaire sont encadrés par la directive européenne n° 2001/20/CE. Cette dernière a été transposée en droit français à travers la loi n° 2004-806 relative à la politique de santé publique du 9 août 2004. Elle n'apporte pas de changement pour les produits de thérapie cellulaire par rapport aux dispositions de la loi « Huriet-Sérusclat » de 1988 qui garantissait la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale. Dans le cas de l'utilisation des CS en recherche biomédicale, le régime juridique s'appliquant est donc celui des protocoles de recherche clinique en thérapie cellulaire (Art. L. 1125-1). Les grandes lignes de la législation en vigueur seront abordées dans les paragraphes suivants.

1. Le consentement du patient

Aucune recherche biomédicale ne peut être pratiquée sur une personne sans son consentement libre et éclairé, recueilli après délivrance d'une information complète sur la finalité d'une telle recherche. L'information délivrée porte sur (Art. L. 1122-1 et L. 1122-1-1) :

- ✓ L'objectif, la méthodologie et la durée de la recherche,
- ✓ Les bénéfices attendus, contraintes et risques prévisibles, y compris en cas d'arrêt avant le terme de l'étude,
- ✓ Les alternatives médicales éventuelles,
- ✓ Les modalités de prise en charge médicale en cas de fin, arrêt prématuré ou exclusion de la recherche,
- ✓ L'avis du **Comité de Protection des Personnes*** (CPP) et l'autorisation de l'autorité compétente,
- ✓ L'interdiction de participer simultanément à une autre recherche,
- ✓ L'inscription au fichier national,
- ✓ Les résultats globaux de la recherche,
- ✓ Le droit de refuser de participer à une recherche ou de retirer son consentement sans encourir de responsabilité ou de préjudice.

* cf. lexique

Le consentement est donné par écrit ou, en cas d'impossibilité, attesté par un tiers, totalement indépendant du **promoteur*** et de l'**investigateur*** de l'étude (Art. L. 1122-1-1).

2. Procédures d'autorisation

D'après l'article L.1123-8 du code de la santé publique : « Nul ne peut mettre en œuvre une recherche biomédicale sans autorisation de l'autorité compétente délivrée dans un délai fixé par voie réglementaire ». En France, l'autorité compétente est l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSaPS). Elle est composée d'experts scientifiques qui fournissent l'autorisation préalable d'effectuer la recherche. L'AFSSaPS assure également le suivi et l'évaluation de la sécurité pendant et après la fin de l'essai. La seconde condition indispensable pour pouvoir initier une recherche biomédicale est l'obtention d'un avis délibératif favorable de la part du Comité de Protection des Personnes (CPP). Il s'agit d'un comité pluridisciplinaire qui étudie le protocole d'un point de vue éthique. Il rend un avis sur les conditions de validité de la recherche, notamment au regard de la protection des personnes, l'intelligibilité des informations écrites ainsi que la procédure à suivre, la pertinence de la recherche, les modalités de recrutement... L'autorisation de l'AFSSaPS et l'avis favorable du CPP sont alors deux conditions indépendantes et cumulatives pour que puisse démarrer la recherche. Ceci est valable pour toute recherche biomédicale

Dans le cas des recherches biomédicales impliquant l'administration de préparation de thérapie cellulaire, le dossier est également transmis par l'AFSSaPS à l'Agence de la Biomédecine pour avis. Ce type de recherche biomédicale nécessite une autorisation dite « expresse » de la part de l'AFSSaPS (Art. L. 1125-1), et fait l'objet d'une instruction particulière. Cette autorisation explicite est délivrée par le directeur de l'AFSSaPS qui recueille l'avis d'un groupe d'expert en thérapie cellulaire. Les critères de décision portent notamment sur la qualité et la sécurité du produit, les données d'efficacité ainsi que sur le rapport bénéfice/risque pour le patient. Dans le régime général, l'absence de réponse de l'AFSSaPS au bout de 60 jours correspond à une autorisation pour débiter l'étude. En revanche, une telle absence concernant la réponse à une demande d'autorisation pour des recherches biomédicales utilisant les CS, vaut un refus d'autorisation. Dans ce cas, le délai fixé pour la réponse de l'AFSSaPS est de 90 jours (**Figure 18**).

* cf. lexique

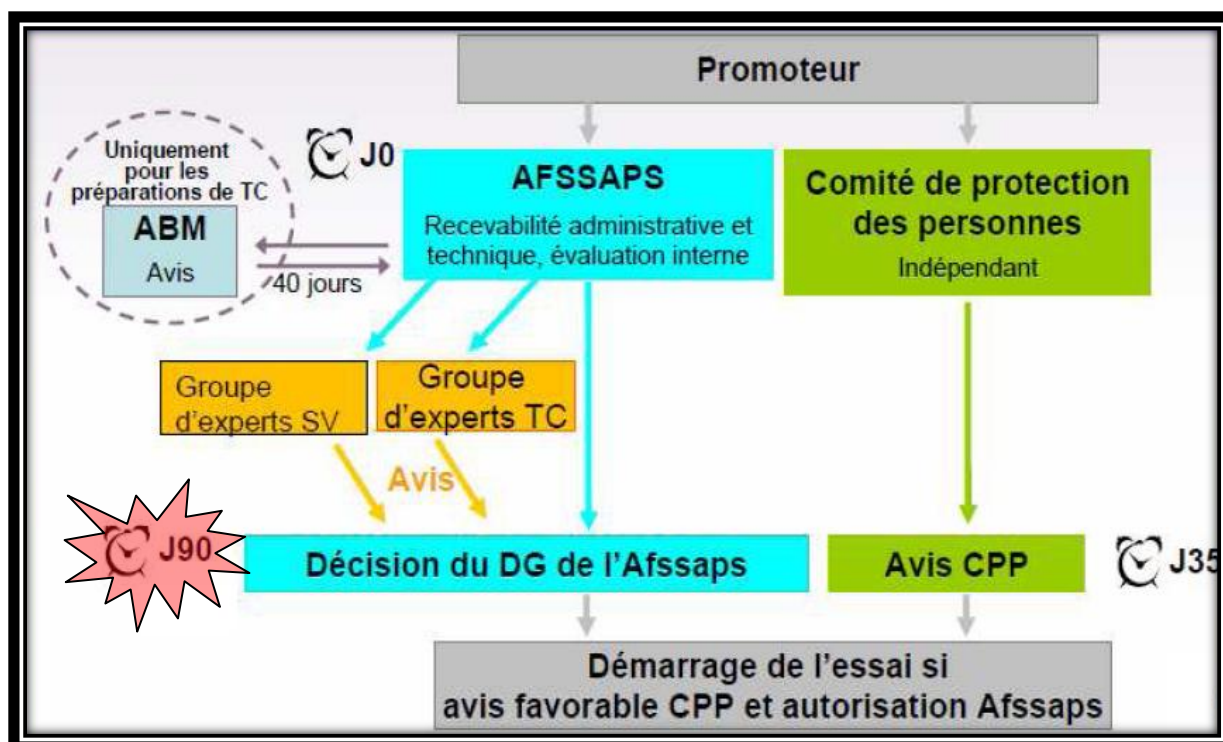


Figure 18: Procédures pour les essais cliniques de thérapie cellulaire.

TC : thérapie cellulaire, ABM : Agence de la biomédecine, SV : sciences de la vie.

Cette demande d'autorisation auprès de l'AFSSaPS et le recueil des avis de l'Agence de la biomédecine et du CPP, nécessitent de constituer un dossier complet décrivant précisément le protocole de la recherche ainsi que la nature du produit expérimental.

3. Constitution et évaluation du dossier

Le dossier de demande d'autorisation comporte une partie administrative (formulaire de demande, attestation d'assurance, etc.), une description précise des modalités de l'étude (protocole, brochure investigateur, note d'information au patient, consentement) et du produit expérimental (qualité pharmaceutique, données cliniques et non cliniques, données de sécurité virale). Une copie de l'avis final délivré par le CPP est également intégrée au dossier.

L'évaluation du dossier s'intéresse aux effets thérapeutiques attendus et aux propriétés biologiques des cellules administrées. Les critères de qualité qui caractérisent les propriétés biologiques des cellules ainsi que les procédés d'obtention de ces cellules sont également évalués. Enfin, les critères permettant de s'assurer que les cellules ne présentent aucun risque pour les receveurs sont étudiés. Il s'agit notamment d'évaluer la dose et la posologie requises pour obtenir l'effet thérapeutique escompté.

C. L'utilisation des CS en recherche fondamentale

L'utilisation des CS en recherche fondamentale est encadrée par le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain.

1. Prélèvement de cellules à des fins scientifiques

Le prélèvement à des fins scientifiques de tissus ou de cellules est réglementé par les articles *R. 1232-15* à *R. 1232-18* du code la santé publique. Les établissements qui envisagent de procéder à une recherche nécessitant le recours à des tissus ou cellules, adressent au directeur général de l'Agence de la Biomédecine, sous pli recommandé avec demande d'avis de réception, un protocole comprenant notamment une description du programme de recherche ainsi que la nature et le nombre des prélèvements envisagés. Ce protocole est inclus dans un dossier dont la forme et le contenu sont fixés par arrêté du ministre chargé de la recherche après avis du directeur général de l'Agence de la Biomédecine. Le dossier comprend notamment l'objet, le titre et la durée des protocoles de recherche, l'identification du déclarant et des participants au protocole ainsi que leurs titres et qualité. Il comporte également la nature des prélèvements envisagés, les éléments permettant de s'assurer du respect des conditions légales et réglementaires des prélèvements. Le directeur général de l'agence délivre un accusé de réception lorsque le dossier est complet et adresse simultanément ce dossier au ministre chargé de la recherche. Après l'appréciation de la nécessité du prélèvement et de la pertinence de la recherche, la mise en œuvre du protocole peut débuter, sauf décision d'interdiction opposée par le ministre chargé de la recherche.

2. Conservation et préparation de cellules à des fins scientifiques

Les organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain et pour les besoins de leurs propres programmes de recherche, doivent élaborer un dossier de déclaration (*Art. R. 1243-49*). La déclaration est adressée au ministre chargé de la recherche et, le cas échéant, au directeur général de l'hospitalisation. L'organisme adresse simultanément sa déclaration, pour avis, au CPP. Le dossier de déclaration comporte un volet technique indiquant des informations sur (*Art. R.1243-51*) :

- ✓ Le type d'activité (préparation, conservation, utilisation, constitution de collections d'échantillons biologiques).
- ✓ La description des locaux (entretien, élimination des déchets).

- ✓ Les équipements techniques utilisés (description, contrôle qualité, dispositifs en cas de panne...).
- ✓ L'hygiène et la sécurité du personnel.
- ✓ La traçabilité (papier ou informatique).
- ✓ L'activité thérapeutique en parallèle éventuelle.
- ✓ La Sous-traitance éventuelle.

Le dossier de déclaration contient également des renseignements scientifiques sur la nature des prélèvements, les modalités d'obtention des échantillons, le consentement des donneurs (recueil, absence d'opposition, anonymisation), le programme de recherche et le devenir envisagé des échantillons.

Les organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique, doivent être titulaires d'une autorisation délivrée par le ministre chargé de la recherche (*Art. R. 1243-61*). La demande d'autorisation est adressée au ministre chargé de la recherche et, le cas échéant, au directeur de l'agence régionale d'hospitalisation (*Art. R. 1243-63*). L'avis du CPP est également demandé. Le dossier d'autorisation comporte les mêmes renseignements techniques et scientifiques que le dossier de déclaration avec en plus, des informations concernant la formation du personnel, le transport des échantillons, la gestion documentaire du service ainsi que la gestion de la cession des prélèvements. La décision du ministre chargé de la recherche ou, le cas échéant, la décision conjointe du ministre chargé de la recherche et du directeur régional de l'hospitalisation est notifiée au demandeur dans un délai de trois mois à compter de la date à laquelle le dossier est réputé complet. L'absence de réponse dans ce délai vaut décision implicite de rejet (*Art. R. 1243-67*). L'autorisation est accordée pour une durée de cinq ans.

L'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (UTCT), du CHU de Nancy, possède une autorisation pour préparer, conserver et utiliser des cellules à des fins scientifiques, ainsi qu'une autorisation pour céder des cellules pour un usage scientifique à des équipes qui en font la demande.

V. Conclusion

Les textes législatifs et réglementaires français actuels, et en particulier la nouvelle loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique prennent en considération spécifiquement, l'existence de deux types de CS :

- ✓ Les CSE humaines, dont l'utilisation est strictement encadrée en raison de leur provenance éthiquement sensible : l'embryon. Ainsi, la loi maintient l'interdiction d'effectuer des recherches sur les CSE avec la possibilité d'obtenir des dérogations spéciales. D'après certains scientifiques, ces dispositions freineraient les avancées de la recherche française dans ce domaine et donc les potentielles applications en recherche clinique à court terme.
- ✓ Les CSH, pour lesquelles le don, le prélèvement et la greffe sont très précisément encadrés, en raison du volume que représente cette activité thérapeutique (1538 allogreffes de CSH ont été effectuées en France en 2009) (De Guerra et al., 2010) et de la gravité des pathologies qu'elles permettent de traiter. La nouvelle loi de bioéthique tend à harmoniser le statut juridique des CSH en encadrant spécifiquement les CSH du sang placentaire.

L'utilisation spécifique de certaines populations de CS, comme les CSM par exemple, ne se retrouve pas, pour l'instant, de façon précise, dans les textes législatifs et réglementaires. Elle est régie par l'ensemble des dispositions, couvrant l'utilisation des éléments et produits du corps humain à des fins de recherches cliniques ou scientifiques. Actuellement, le statut réglementaire des CSM est tel, qu'il permet de mener, assez librement, de nombreuses recherches. Les perspectives prometteuses de l'utilisation de ces cellules dans de nombreuses pathologies encore incurables aujourd'hui ainsi que de nombreuses avancées dans certains domaines (éthiques, médicaux, économiques et financiers, etc.) devraient faire naître dans les années à venir, un encadrement juridique spécifique de ces populations cellulaires.

LEXIQUE

AFSSaPS : organisme qui garantit, au travers de ses missions de sécurité sanitaire, l'efficacité, la qualité et le bon usage de tous les produits de santé destinés à l'homme : médicaments et matières premières, dispositifs médicaux, dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, produits biologiques d'origine humaine (produits sanguins labiles, organes, tissus, cellules, produits de thérapie génique et de thérapie cellulaire), produits cosmétiques et biocides.

Agence de la Biomédecine : établissement public national de l'Etat créé par la loi de bioéthique de 2004 et se substituant à l'Etablissement français des greffes. Elle exerce ses missions dans les domaines du prélèvement et de la greffe d'organes, de tissus et de cellules, ainsi que dans les domaines de la procréation, de l'embryologie et de la génétique humaines. Comme la plupart des agences sanitaires, elle est sous tutelle du ministère de la Santé.

ARS : elles ont été créées par la loi du 21 juillet 2009 portant sur la réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires. L'ARS regroupe en une seule entité plusieurs organismes (DDASS, DRASS, ARH, etc.) chargés des politiques de santé dans les régions et les départements. Interlocuteur régional unique, l'ARS garantit aux professionnels de santé des procédures plus simples. Elle assure aux patients un égal accès aux soins et une meilleure coordination sur le terrain entre les professionnels et les établissements de santé et médico-sociaux.

Clonage reproductif : il consiste à insérer dans un ovocyte énucléé, un noyau issu d'une cellule adulte prélevé sur une personne et à déclencher artificiellement la formation d'un embryon. L'embryon ainsi obtenu est ensuite transféré dans l'utérus d'une femme. En le laissant se développer, il serait possible théoriquement d'obtenir le double génétique de la personne qui a fourni initialement le noyau de la cellule.

CPP : il a été créé par la loi du 9 août 2004 portant sur la recherche biomédicale chez l'homme. Il a pour rôle de s'assurer que tout projet de recherche clinique sur l'être humain, mené en France, respecte diverses mesures (médicales, éthiques et juridiques) visant à assurer la protection des personnes qui se prêtent à une telle recherche.

Investigateur : il est choisi par le promoteur (un médecin dans la plupart des cas) pour diriger et surveiller la bonne réalisation de l'essai clinique sur le site.

Promoteur : personne physique ou morale qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale sur l'être humain et qui en assure la gestion et le financement (industries pharmaceutiques, centres hospitaliers par exemple).

Partie III :

**Utilisation des cellules souches en
thérapie cellulaire et en ingénierie
tissulaire : exemple d'application
dans le cartilage.**

Aujourd'hui, seulement deux types de cellules souches sont utilisés en clinique pour des soins courants : les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches de la peau. Les premières sont essentiellement greffées dans des indications hématologiques (Ungerstedt et al., 2011) (pathologies malignes et non malignes du sang), alors que les secondes le sont dans les cas de grands brûlés (Bargues et al., 2011). A notre connaissance et à l'heure actuelle, il n'existe pas d'autres traitements utilisant nommément des cellules souches en tant que telles qui aient passé le stade de la recherche clinique. L'utilisation de cellules dérivées des cellules souches embryonnaires a été autorisée par la FDA dans le cadre de quatre essais cliniques menés par des compagnies américaines. Les cellules souches mésenchymateuses, quant à elles, sont impliquées dans de nombreux essais cliniques et en particulier dans les pathologies de l'os et du cartilage. En effet, les propriétés immunomodulatrices et la capacité de différenciation des CSM vers les cellules du cartilage (chondrocytes) et de l'os (ostéoblastes), font de ces cellules de très bonnes candidates à la thérapie cellulaire et tissulaire. Elles représentent un véritable espoir dans une perspective de médecine régénératrice. Les CSM ont déjà montré leur intérêt dans certaines maladies osseuses comme l'ostéogénèse imparfaite (Horwitz et al., 2002) ou encore dans le cas de pseudarthrose, conséquence directe de fracture non consolidée (Galois et al., 2009) (Dans cette étude, ce sont des cellules de moelle osseuse concentrée qui sont injectées et non pas des CSM purifiées). Actuellement, les pathologies du cartilage, dégénératives ou traumatiques, ne bénéficient que de traitements symptomatiques ou ne permettant pas de reconstituer l'intégrité du tissu natif. C'est la raison pour laquelle, les scientifiques et les cliniciens se sont naturellement tournés vers les CSM dans le but d'obtenir une régénération du tissu cartilagineux. Ces CSM peuvent être utilisées seules dans le cadre de la thérapie cellulaire ou bien combinées à une matrice support tridimensionnelle dans le cas de l'ingénierie tissulaire.

I. Le cartilage articulaire

A. Structure, physiologie et physiopathologie

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif complexe, hautement spécialisé et caractérisé par ses propriétés mécaniques, résultant d'une combinaison complexe de mécanismes de tension, de forces de cisaillement et de compression. Interposé entre deux surfaces osseuses et en regard du liquide synovial, il permet le glissement de ces dernières grâce à un coefficient de friction extrêmement faible (**Figure 19**). Le cartilage articulaire est composé d'un seul type cellulaire (le chondrocyte), et d'une abondante matrice extracellulaire

(MEC) spécifique. Il s'agit d'un tissu non innervé et non vascularisé, ce qui explique sa faible capacité de régénération.

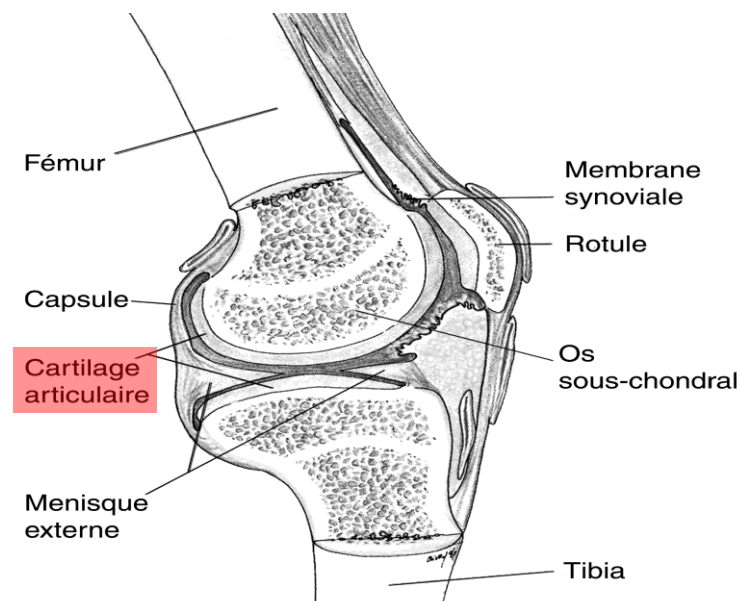


Figure 19: Représentation du cartilage articulaire au niveau d'une articulation de genou.

(d'après la thèse de Wang Y, 2007).

La MEC d'un tissu cartilagineux mature se compose de collagènes, de protéoglycannes (PGs), de petites protéines, d'ions et d'eau. Les propriétés fonctionnelles du cartilage reposent essentiellement sur l'organisation hétérogène de ces constituants matriciels, en particulier l'orientation des fibres de collagènes et la distribution des PGs (**Figure 20**) (Hayes et al., 2007).

En se basant sur ces éléments, il est possible de distinguer quatre zones allant de la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral :

➤ *La couche superficielle* (5 à 10% de l'épaisseur du cartilage) est en contact avec le liquide synovial. Les chondrocytes y sont nombreux, aplatis et orientés parallèlement à la surface de l'articulation. Le réseau de collagène, essentiellement constitué de collagène de type II, est dense et parallèle à la surface articulaire, apportant ainsi une plus grande résistance aux contraintes mécaniques que dans les zones plus profondes. Cette couche sert de surface de glissement entre deux pièces cartilagineuses avec un coefficient de frottement extrêmement faible.

➤ *La couche moyenne ou transitionnelle* (5 à 40% de l'épaisseur du cartilage), plus épaisse que la couche précédente, contient des fibres de collagènes de type II orientées

obliquement par rapport à la surface articulaire et beaucoup de PGs de haut poids moléculaire comme l'agrécanne. Ces PGs forment un véritable gel hydrophile, retenant l'eau au sein de la couche et lui conférant des propriétés mécaniques d'amortissement des chocs. Les cellules, de forme arrondie, y ont une activité de synthèse plus intense.

➤ *La couche profonde* (40 à 90% de l'épaisseur du cartilage) présente des chondrocytes et des fibres de collagènes disposées en colonnes perpendiculaires à la surface. A ce niveau, les cellules montrent une activité anabolique plus importante que dans les deux couches précédentes. Le taux de PGs y est le plus fort et la quantité d'eau la plus faible. Cette couche permet, à un degré moindre, d'amortir les chocs.

➤ *La couche basale ou calcifiée* (2 à 3% de l'épaisseur du cartilage) se situe à la jonction du cartilage et l'os sous-chondral. Les cellules sont beaucoup plus restreintes en nombre et deviennent hypertrophiques. Le cartilage est alors en voie de calcification. Cette couche permet la solidarisation du cartilage avec l'os.

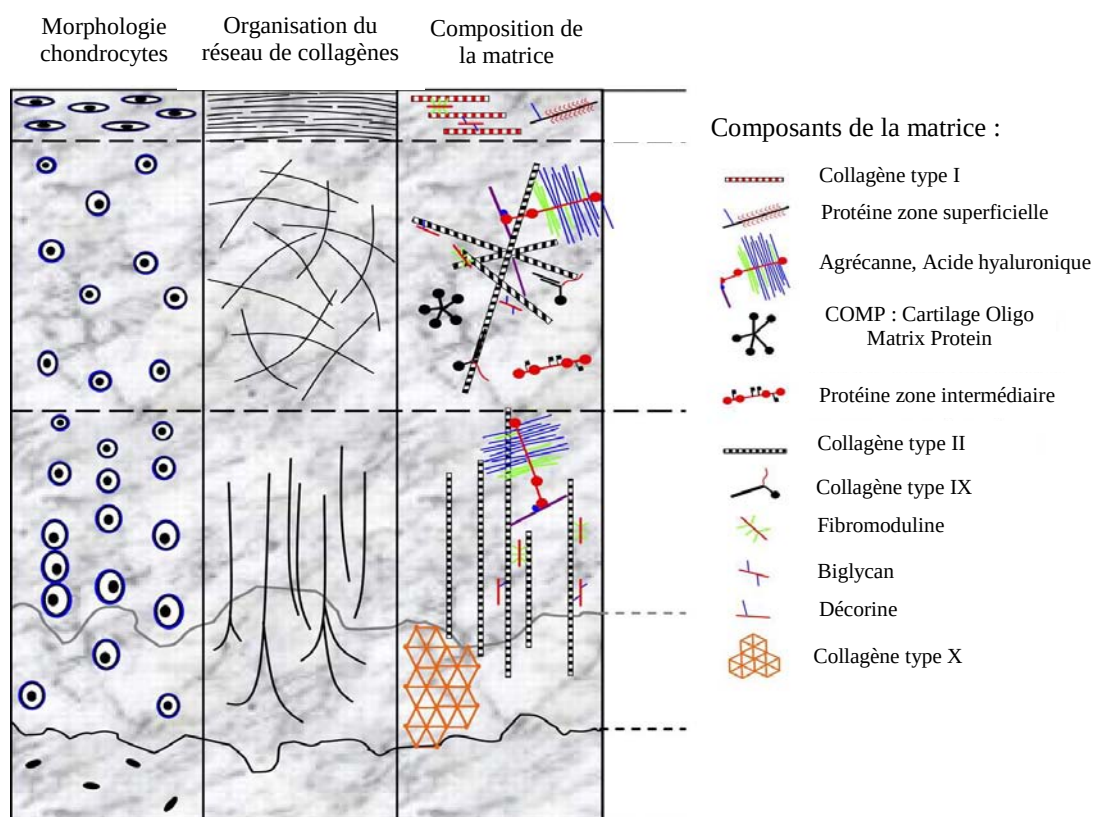


Figure 20: Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire.

(d'après Hayes et al., 2007).

Les petites protéines telles que la COMP (Cartilage Oligo Matrix Protein) se trouvent également dans la MEC. Elles semblent jouer un rôle important dans les interactions entre les

chondrocytes et leur matrice et plus spécifiquement dans le maintien de l'intégrité du réseau de collagène.

La description de cette structure stratifiée du cartilage articulaire est essentielle pour comprendre l'objectif du travail expérimental développé dans la dernière partie du manuscrit.

Les chondrocytes synthétisent leur MEC mais également les enzymes (métalloprotéases, hyaluronidases,...) capables de la dégrader, permettant ainsi un remodelage du tissu cartilagineux. Les chondrocytes garantissent également l'équilibre entre la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) et celle de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α). Ces cellules assurent donc l'homéostasie du cartilage, c'est-à-dire la balance entre l'anabolisme et le catabolisme. L'homéostasie est influencée par des facteurs solubles (hormones, vitamines, cytokines, facteurs de croissance) et par l'environnement physico-chimique des chondrocytes et les contraintes mécaniques qui y sont associées. Lorsque l'équilibre est rompu, au profit du catabolisme, une dégénérescence du tissu apparaît et le cartilage devient pathologique. C'est le cas de l'arthrose par exemple. L'inflammation constitue un élément régulateur important de la genèse et de l'évolution de l'arthrose (Rannou et al., 2010). L'arthrose est une maladie multifactorielle associée à quatre facteurs de risques que sont l'hérédité, l'obésité, les traumatismes, l'hypersollicitation articulaire, et surtout le vieillissement.

B. Fonctions du cartilage

Le cartilage articulaire sert à absorber les contraintes liées aux mouvements et au poids du corps. La composition de sa matrice extracellulaire permet de résister aux contraintes en se déformant face aux forces subies. Les pressions exercées à la surface des cartilages articulaires varient en fonction de la localisation et du poids de l'individu, de sa tension musculaire et de son activité physique. Des mesures *in vivo* ont montré qu'en position debout, la pression moyenne s'exerçant sur la hanche d'un patient est de 0,7 MPa (Mégapascal). Lors d'exercices physiques, cette contrainte atteint 5-10 MPa périodique au niveau de la hanche, soit une charge équivalente à 3-8 fois le poids du corps (Bergmann et al., 2001). Enfin, cette contrainte peut dépasser 20 MPa lors de mouvements physiques intenses comme par exemple un saut. Ces contraintes mécaniques résultent d'une combinaison complexe de mécanismes de tension, de forces de cisaillement et de compression ; le phénomène de compression étant le plus important (Wong et al., 2001). Ces contraintes mécaniques agissent non seulement sur la matrice extracellulaire mais aussi sur le métabolisme des chondrocytes. Ainsi, il a été montré

que dans des conditions extrêmes, telles que l'immobilisation, les capacités de synthèse des chondrocytes ainsi que l'épaisseur du cartilage diminuaient. De même, dans les zones soumises à des contraintes maximales, l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme du cartilage peut être perturbé, ce qui conduit à l'apparition de pathologies dégénératives telles que l'arthrose (Kerin et al., 2002).

C. Lésions du cartilage

Le caractère avasculaire du tissu explique que les capacités de réparation cartilagineuse sont faibles. Les lésions peuvent être d'origine traumatique ou dégénérative (cas de l'arthrose). Elles peuvent être superficielles ou profondes. Les possibilités de cicatrisation varient en fonction de l'étendue de la lésion, de son siège et de la profondeur. Les lésions localisées dans le cartilage superficiel apparaissent, pour la plupart, sous forme de fissures. Ces dernières n'atteignent pas l'os sous-chondral et par conséquent, ne génèrent aucune réparation tissulaire. En revanche, les lésions profondes atteignant l'os sous chondral, qui lui est vascularisé, entraînent un recrutement des cellules sanguines et une réparation tissulaire de type fibrocartilage (Shapiro et al., 1993). Ce dernier, retrouvé dans l'arthrose, possède alors des propriétés structurelles et fonctionnelles différentes de celles rencontrées dans le cartilage hyalin natif. Les chondrocytes sont capables de remplacer une perte en agrécanne au stade précoce, mais sont dépassés lorsque le maillage collagénique est détruit. La fragmentation du réseau de collagène peut être considérée comme le point de non-retour dans la pathologie arthrosique. De plus, le tissu cartilagineux étant un tissu non innervé, la dégradation tissulaire se fait de façon insidieuse. La symptomatologie n'apparaît généralement que tardivement dans le développement de la maladie. Les différents stades d'évolution de la dégénérescence cartilagineuse sont évalués par les grades de la maladie (de I à IV). Ainsi, le traitement sera adapté au grade de l'arthrose.

D. Contexte socio-économique

Le développement de nouvelles thérapeutiques pour les maladies ostéoarticulaires, caractérisées par une altération progressive du cartilage, avec perte des propriétés mécaniques, est un enjeu médical et économique de premier plan. L'arthrose, maladie dégénérative du cartilage, arrive au tout premier rang des maladies articulaires (Le Pen et al., 2005). Cette pathologie à la fois chronique et évolutive, dont la prévalence peut dépasser 90% chez les personnes de plus de 70 ans, altère leur qualité de vie, et constitue une des principales causes de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et de handicap. L'arthrose est la

première cause d'incapacité physique et de douleurs persistantes. Il existe environ 4,6 millions de patients souffrant d'une arthrose symptomatique en France, ce qui génère un coût annuel de 2,6 milliards d'euros pour leur prise en charge et hospitalisations, incluant la mise en place de 120000 prothèses de hanche ou de genou. La fréquence de cette pathologie, qui ne pourra aller qu'en augmentant du fait de l'allongement de l'espérance de vie, constituera un problème majeur de santé publique pour les années à venir. Ceci souligne l'importance de son diagnostic et de son dépistage précoces, et la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir ou traiter les stades peu avancés de cette pathologie associée au vieillissement.

Actuellement, certaines stratégies thérapeutiques, reposant sur des traitements pharmacologiques, chirurgicaux ou de thérapie cellulaire sont utilisés afin d'éviter ou de retarder la pose d'une prothèse totale.

II. Traitements actuels des lésions cartilagineuses

A. Traitements pharmacologiques

Ces traitements correspondent aux traitements symptomatiques de l'arthrose, comprenant des anti-inflammatoires et des antalgiques permettant d'enrayer l'inflammation et de soulager la douleur, sans une véritable action sur la progression de la maladie arthrosique. Ces traitements sont administrés par voie locale, en *per os* ou encore par injection intra-articulaire (**Tableau 5**).

Classes pharmaco-thérapeutiques	Noms des molécules	Noms commerciaux	Voies d'administration	Indications
Antiarthrosiques d'action lente	Chondroïtine sulfate Diacéréine	Chondrosulf® Structum® Art® Zondar®	<i>Per os</i>	Traitement symptomatique à effet différé de l'arthrose
	Hyaluronate de sodium* (fluides visco-élastiques)	Euflexxa® Sinovial®...	Injection intra-articulaire	Traitement symptomatique de la gonarthrose douloureuse
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	Diclofénac kétoprofène	Voltarène emulgel® Ketum gel ®	Voie locale (percutanée)	Traitement symptomatique des arthroses des petites articulations
	Acide tiaprofénique Diclofénac Kétoprofène Naproxène Indométhacine Acide niflumique Méloxican	Flanid® Voltarène® Profénid® Apranax® Indocid® Nifluril® Mobic®	<i>Per os</i>	Traitement symptomatique au long cours des arthroses douloureuses et invalidantes Traitement symptomatique des poussées aiguës d'arthrose
	Célécoxib	Célébrex®	<i>Per os</i>	Traitement symptomatique des douleurs de l'arthrose
	Piroxicam	Feldene®	<i>Per os</i>	Traitement symptomatique de l'arthrose en deuxième intention
	Bétaméthasone Triamcinolone Prednisolone...	Célestène® Hexatrione LD® Hydrocortancyl®...	Infiltration intra-articulaire (ne pas dépasser 3 infiltrations/an à un même site)	Poussées aiguës des arthroses notamment avec épanchement articulaire
Analgésiques périphériques	Paracétamol	Doliprane®	<i>Per os</i>	Traitement des douleurs arthrosiques
Autres agents anti-inflammatoires antirhumatismaux, non stéroïdiens	Glucosamine	Voltaflex® Dolenio® Flexea®...	<i>Per os</i>	Soulagement des symptômes liés à une arthrose légère à modérée du genou

Tableau 5: Médicaments indiqués dans le traitement symptomatique de l'arthrose.

**Produits ayant le simple statut de dispositifs médicaux et non celui de spécialités pharmaceutiques. (gonarthrose : arthrose du genou).*

Les schémas thérapeutiques des arthroses douloureuses associent généralement un antalgique périphérique et/ou un AINS lors des poussées, avec ou non un anti-arthrosique d'action lente. Si la pathologie évolue et notamment dans le cas d'une gonarthrose, une infiltration de corticoïdes (en cas d'épanchement) associée ou non à une injection intra-articulaire de fluide visco-élastique seront nécessaires. En parallèle des traitements pharmacologiques, une prise en charge par kinésithérapie peut être envisagée. Certains accessoires comme les colliers cervicaux, les orthèses, les ceintures lombaires ou encore les corsets, permettent de soulager les patients. Dans le cas d'une arthrose liée à une obésité, une prise en charge nutritionnelle est réalisée, dans le but d'obtenir une normalisation du poids.

Dans les cas où la maladie arthrosique continue de progresser et touche la totalité de l'articulation, la pose de prothèse devient alors inéluctable.

Beaucoup de chercheurs travaillent à la mise au point d'une substance pouvant stimuler la régénération spontanée du cartilage articulaire. Cependant, ces substances font l'objet de nombreuses controverses.

B. Traitements chirurgicaux

Ces approches chirurgicales concernent le traitement des lésions cartilagineuses localisées du sujet adulte jeune (< 50 ans). Elles sont généralement contre-indiquées dans le cas d'une dégénération cartilagineuse massive (arthrose évoluée). Ces traitements sont nécessaires afin d'éviter le risque de voir se développer chez le sujet atteint de lésions cartilagineuses, une arthrose précoce difficile à traiter par des moyens autres que la pose de prothèse totale. Il est donc important d'intervenir aussi rapidement que possible afin d'éviter que le cercle vicieux du phénomène arthrosique se mette en œuvre. Hormis des techniques palliatives comme le lavage articulaire, certaines techniques chirurgicales permettent une réparation toute relative du cartilage, avec la formation d'un fibrocartilage.

1. Forages de Pridie et microfractures

Cette technique consiste à effectuer des forages au poinçon ou à la mèche dans la perte de substance cartilagineuse tous les 2 à 3 mm sur une profondeur de 3 à 4 mm (**Figure 21**). L'objectif étant de perforer la lame sous-chondrale et de stimuler l'os sous-chondral (tissu vascularisé), de manière à recruter les cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente à l'os. Ainsi, ces CS stimulées vont favoriser l'apparition d'un fibrocartilage

permettant de combler la perte de substance depuis la profondeur jusqu'en superficie. Cependant, cette technique n'a pas montré de résultats très satisfaisants à long terme puisqu'elle génère un fibrocartilage (Von Keudell et al., 2011).

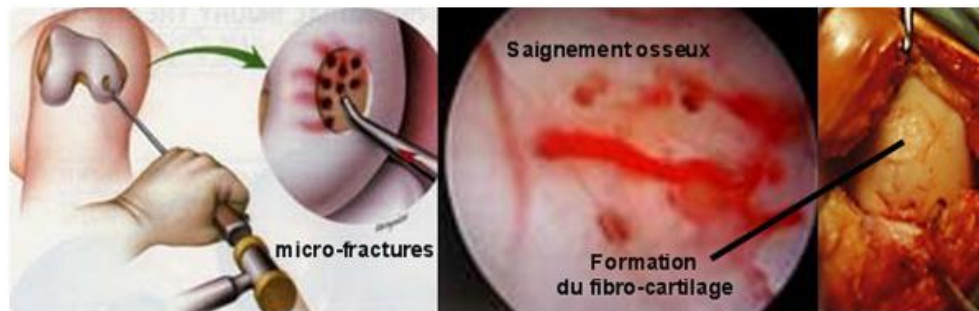


Figure 21: Principe de la technique des microfractures.

L'objectif est de perforer la lame sous-chondrale et de stimuler l'os sous-chondral, de manière à recruter les cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente à l'os. Ainsi, ces CS stimulées vont favoriser l'apparition d'un fibrocartilage permettant de combler la perte de substance. (d'après www.kneesurgeonbristol.co.uk).

2. La mosaïcoplastie

Cette technique consiste à prélever des petites carottes ostéochondrales, à un endroit du genou où le prélèvement n'a pas de conséquences, c'est-à-dire au niveau d'une zone non portante. Ces greffons autologues sont ensuite insérés dans la lésion de façon à reconstituer une surface cartilagineuse (Hangody et al., 1998) (**Figure 22**). Cette approche possède des avantages notamment liés à son faible coût, à la faible morbidité et à l'apport de tissu cartilagineux et autologue vivant. Néanmoins, cette technique a ses limites liées en particulier à la localisation et à la taille des lésions (Hangody et al., 2008). L. Hangody a cependant proposé récemment d'étendre cette technique aux pertes de substance cartilagineuse du tibia, de la rotule et de la trochlée.

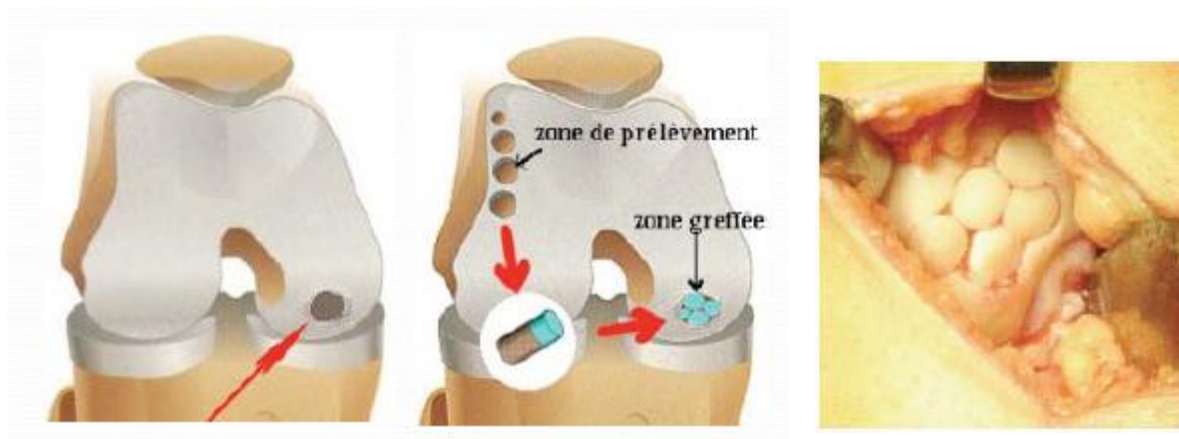


Figure 22: Principe de la technique de la mosaïcoplastie.

Cette technique consiste à prélever des petites carottes ostéochondrales, au niveau d'une zone non portante du genou. Ces greffons autologues sont ensuite insérés dans la lésion de façon à reconstituer une surface cartilagineuse (d'après Hangody et al., 2008).

Ces traitements ne sont pas satisfaisants à long terme car ils ne permettent pas la synthèse d'un néo-tissu de remplacement fonctionnel. En effet, le tissu cicatriciel se révèle être davantage un fibrocartilage au sein duquel le chondrocyte se différencie et adopte un phénotype fibroblastique. Par conséquent, ce tissu cicatriciel ne possède pas les caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et biomécaniques du tissu natif.

3. La thérapie cellulaire : transplantation de chondrocytes autologues

Le principe de cette technique est la mise en culture de chondrocytes matures prélevés chez le receveur qui sont ensuite réinjectés dans la perte de substance cartilagineuse. L'étanchéité est assurée par un couvercle de périoste (Brittberg et al., 1994) (**Figure 23**) ou plus récemment grâce à l'intégration des cellules au sein d'une matrice ou d'une membrane.

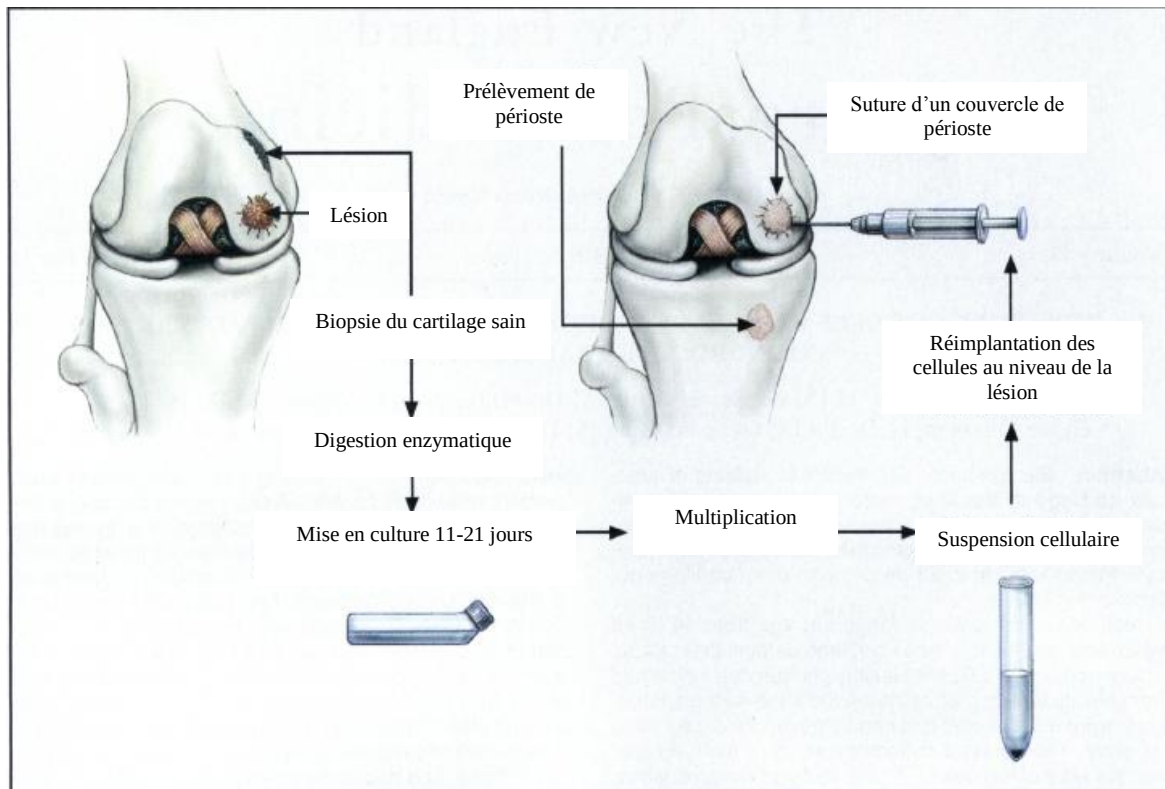


Figure 23: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues.

Des chondrocytes sont prélevés chez le patient dans une zone saine du cartilage puis mis en culture et amplifiés in vitro. Ils sont ensuite réinjectés dans la perte de substance cartilagineuse. L'étanchéité est assurée par un couvercle de périoste (d'après Brittberg et al., 1994).

Le premier temps consiste, sous arthroscopie à faire un prélèvement de cartilage sain dans une zone non portante du genou à l'aide d'une curette. Ce prélèvement est adressé à un laboratoire de culture cellulaire agréé, pour y subir une mise en culture. Les chondrocytes sont ainsi amplifiés pendant deux à trois semaines. Le site receveur est ensuite préparé et débridé. Un lambeau de périoste est prélevé et suturé sur les bords de la lésion. Enfin, les chondrocytes amplifiés en culture (plusieurs millions de cellules) sont injectés sous le lambeau périosté étanche. Les chondrocytes se mettent alors à synthétiser une matrice cartilagineuse permettant de combler la lésion. De bons résultats ont été obtenus sur une période de deux à dix ans surtout chez les jeunes patients (Marlovits et al., 2006). Cependant, cette technique présente certains inconvénients. Il s'agit en effet, d'une opération onéreuse et lourde à mettre en place aussi bien pour le patient que pour le clinicien. De plus, il existe un risque que les chondrocytes, cultivés en monocouche, se différencient et perdent leur

phénotype (Domm et al., 2002). Par ailleurs, l'arthroscopie révèle l'apparition d'une zone hypertrophique au niveau de l'implantation après quelques mois (Marlovits et al., 2006).

Depuis 2006, la technique chirurgicale utilisant le lambeau de périoste a évolué vers l'utilisation de matrice (Cartipatch®) ou de membrane (Hyalograft C®) dans lesquelles sont intégrées les chondrocytes. Il s'agit d'une nouvelle génération de transplantation de chondrocytes autologues se rapprochant progressivement de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette stratégie associant des cellules intégrées dans un support tridimensionnel correspond aux prémices de l'ingénierie tissulaire. Ces nouvelles techniques évitent le prélèvement et la suture du périoste facilitant ainsi les procédures chirurgicales. Elles permettent une meilleure répartition spatiale des chondrocytes et tentent de maintenir le phénotype des chondrocytes en culture *in vitro*. La matrice Cartipatch® développée par l'entreprise française TBF est une matrice tridimensionnelle d'origine végétale (agarose et alginate) (**Figure 24**). Cette technique a montré de bons résultats en terme de régénération de cartilage hyalin sur environ la moitié des patients traités (Selmi et al., 2008). Ces résultats ont été obtenus à court terme et la technique reste encore en cours d'évaluation. Cette démarche demeure tout de même assez lourde pour le patient et n'est pas sans risques.

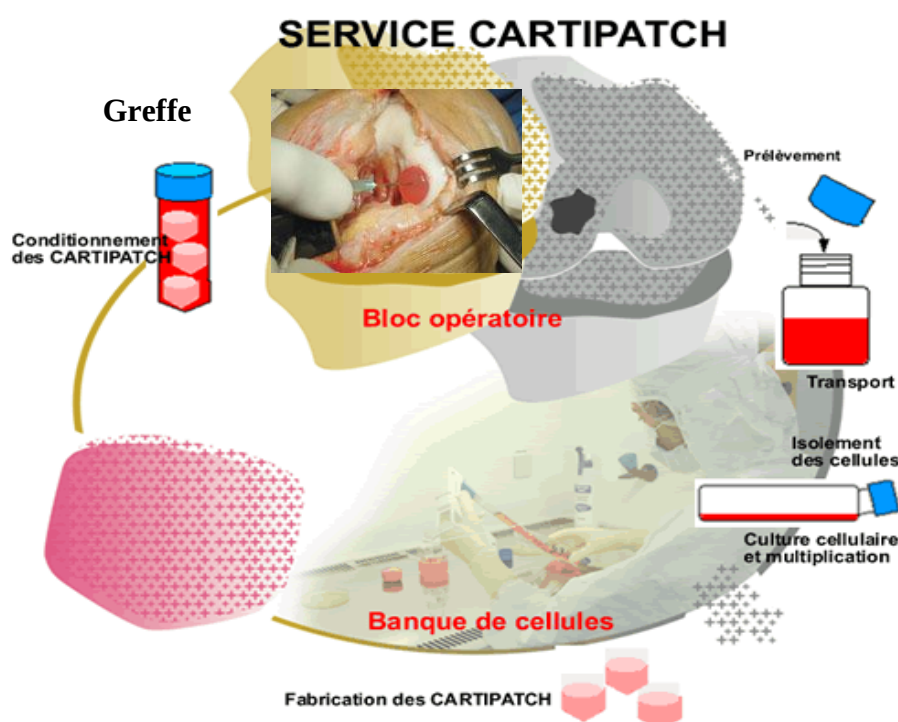


Figure 24: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues utilisant une matrice d'origine végétale: Cartipatch®.

(d'après www.tbf-lab.com). Les chondrocytes autologues sont prélevés puis amplifiés en culture *in vitro*. Ils sont ensuite ensemencés dans une matrice végétale à base d'alginate et d'agarose. L'ensemble (cellules+matrice) est introduit au niveau de la lésion cartilagineuse.

La matrice Hyalograft C® est une matrice à base d'acide hyaluronique, composant naturel du cartilage, sur laquelle sont ensemencés des chondrocytes autologues. Cette matrice biocompatible a été ensuite implantée au niveau de lésions cartilagineuses et a montré des résultats encourageants en terme de réparation tissulaire (Marcacci et al., 2005).

C. Conclusion

Le choix du traitement des lésions cartilagineuses sera défini en fonction de plusieurs paramètres :

- L'inefficacité ou non d'un traitement pharmacologique bien conduit.
- L'âge du patient présentant des lésions cartilagineuses.
- La localisation et l'étendue de la perte de substance cartilagineuse.
- Le degré d'usure du tissu cartilagineux.

Actuellement, il n'existe pas de prise en charge globalement satisfaisante des lésions du cartilage, permettant une régénération d'un tissu cartilagineux hyalin et fonctionnel. C'est la raison pour laquelle les scientifiques et les cliniciens se sont orientés à la fois, vers une thérapie cellulaire utilisant des cellules plus précoces que sont les cellules souches mésenchymateuses, et vers une ingénierie tissulaire du cartilage.

III. Utilisation des CS en thérapie cellulaire: application au cartilage

Comme nous avons pu le constater précédemment, le caractère avasculaire du tissu cartilagineux explique ses faibles capacités de réparation. La faculté de différenciation de certaines CS vers des cellules spécialisées de phénotype chondrocytaire, pourraient alors constituer une voie de thérapie régénératrice du cartilage. Ces CS peuvent être utilisées seules, en tant que produit de thérapie cellulaire, ou bien combinées à une matrice support, dans le cas de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette dernière permet de reconstituer un néo-tissu *in vitro* qui permettra, une fois implanté, de combler la perte de substance. Cette approche sera développée de façon précise dans le quatrième chapitre de cette partie.

Certaines études se sont intéressées au caractère pluripotent des CSE humaines et donc à leur capacité à se différencier vers le chondrocyte. Les CSE ont été cultivées *in vitro* seules ou associées à une matrice support afin d'induire leur différenciation chondrocytaire. Les cellules

spécialisées ont ensuite été implantées dans des modèles animaux présentant des lésions cartilagineuses. En fonction du protocole utilisé, ces travaux ont montré des résultats très aléatoires concernant l'efficacité de différenciation ainsi que la qualité de la réparation cartilagineuse (Toh et al., 2011). Une meilleure connaissance des phénomènes de différenciation chondrocytaire des CSE humaines sera nécessaire dans la perspective d'une potentielle utilisation thérapeutique de ces dernières.

Les scientifiques et les cliniciens se sont tournés vers une autre population de CS, plus évidente, que sont les CSM. Leur propriété de multipotence et leur capacité de différenciation vers les cellules d'origine mésodermique, et notamment le chondrocyte, font de ces cellules, d'excellentes candidates à la thérapie régénératrice du cartilage. Leur capacité d'adressage vers un tissu lésé (homing), leur faible immunogénicité permettant d'envisager une utilisation allogénique, et l'absence de considérations éthiques liées à leur origine, expliquent l'intérêt que suscitent ces cellules en médecine régénératrice depuis maintenant près de vingt ans. De plus, elles possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour des utilisations thérapeutiques. Parallèlement aux premiers essais cliniques, la question des risques liés à la possible transformation cancéreuse des cellules amplifiées *in vitro* a suscité de vifs débats, sans que le rapport bénéfice-risque ne penche pour l'instant en défaveur de l'utilisation thérapeutique des CSM.

A. Modèles animaux

Différents modèles animaux présentant des lésions cartilagineuses ont été utilisés afin d'évaluer l'efficacité des CSM dans la régénération tissulaire. Ce travail sur l'animal est une étape incontournable et nécessaire avant toute investigation thérapeutique sur l'Homme. Des modèles caprins, porcins ou encore de lapins ont été étudiés (Yan and Yu, 2007).

En 2007, une étude a évalué l'efficacité de l'injection de MSC sur un modèle porcin présentant des lésions cartilagineuses. Les lésions cartilagineuses sont réalisées sur des condyles fémoraux de mini porcs adultes, sans atteintes de l'os sous-chondral. Les CSM proviennent d'un prélèvement autologue de la moelle osseuse au niveau de la crête iliaque. Les CSM sont cultivées *in vitro*, amplifiées, puis suspendues dans une solution d'acide hyaluronique (HA) (molécule de la matrice cartilagineuse). L'administration des cellules se fait par injection intra-articulaire directe. Un groupe contrôle reçoit seulement une solution saline dans les mêmes conditions. Les mini porcs sont ensuite sacrifiés à 6 et 12 semaines après l'injection afin d'effectuer une analyse morphologique et histologique des lésions

cartilagineuses. A 12 semaines, le groupe ayant reçu les CSM intégrées à l'acide hyaluronique, présente une réparation complète du tissu cartilagineux. A l'inverse, le groupe contrôle ne révèle aucune réparation tissulaire. Un troisième groupe ayant reçu uniquement de l'acide hyaluronique présente une régénération partielle du tissu cartilagineux (**Figure 25**) (Lee et al., 2007).

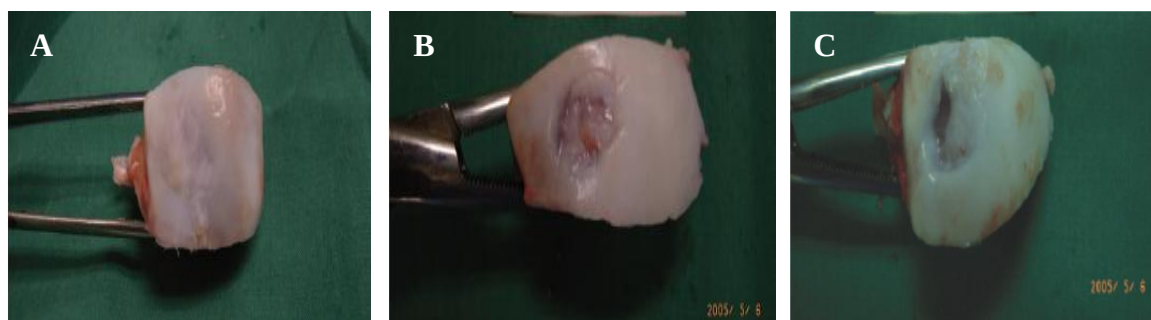


Figure 25: Evaluation morphologique des lésions cartilagineuses sur un modèle porcin.
A : Réparation tissulaire complète après injection de CSM+HA, 12 semaines après implantation. B : Réparation tissulaire partielle après injection de HA, 12 semaines après injection. C : Pas de réparation tissulaire après injection d'une solution saline, 12 semaines après injection (d'après Lee et al., 2007).

B. Utilisation clinique des CSM dans les lésions cartilagineuses

1. CSM et essais cliniques

Actuellement et à travers le monde, les CSM sont impliquées dans 123 essais cliniques toutes indications confondues (<http://clinicaltrials.gov>) (Trounson et al., 2011) (**Figure 26**). La majorité de ces études sont encore en phase I ou II de la recherche biomédicale, évaluant la tolérance, l'innocuité de l'administration des CSM chez l'Homme, ainsi que les premières preuves d'efficacité. Les sources cellulaires proviennent aussi bien de prélèvements autologues que de prélèvements allogéniques. La plupart des CSM utilisées sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse (90% des essais cliniques). La première indication pour laquelle les CSM sont le plus utilisées en recherche clinique, concerne la maladie du greffon contre l'hôte et les maladies auto-immunes. Les propriétés immunomodulatrices des CSM sont alors mises à contribution. Les pathologies ostéo-articulaires arrivent en deuxième position et par conséquent, occupent une place importante dans l'utilisation des CSM en recherche biomédicale. Dans ce cas précis, c'est essentiellement les propriétés de différenciation et réparation tissulaire qui justifient l'emploi de ces cellules.

**Nombre d'essais cliniques utilisant des CSM
en fonction des indications thérapeutiques
(n=123)**

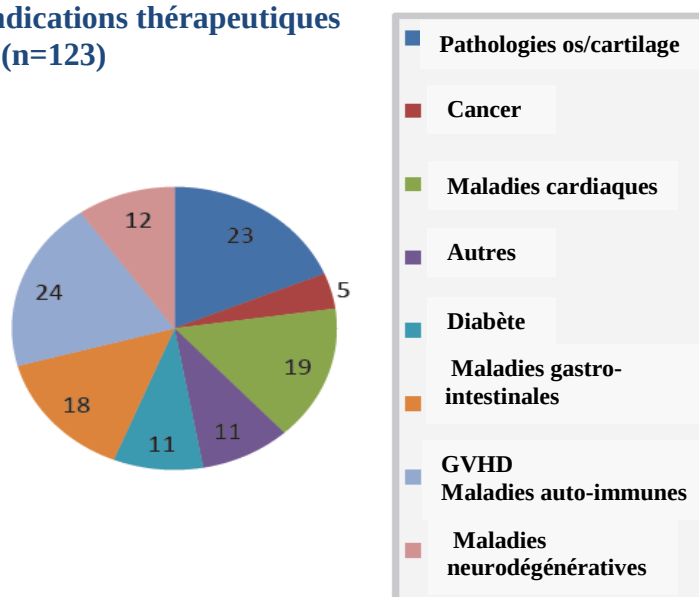


Figure 26: Nombre d'essais cliniques utilisant des CSM en fonction des indications thérapeutiques.

(n=nombre d'essais en cours) (d'après Trownson et al., 2011) (source : <http://clinicaltrials.gov>).

L'utilisation clinique de ces cellules multipotentes a longtemps été envisagée sous l'angle du remplacement de types cellulaires déficients ou insuffisamment nombreux. Aujourd'hui, leurs multiples autres caractéristiques amènent à utiliser leurs capacités à moduler la cicatrisation et la réparation tissulaire, la réponse immune ou encore la mort cellulaire (effet anti-apoptotique). La capacité d'adressage vers un tissu lésé (phénomène de homing) existant physiologiquement est mise à profit en thérapeutique pour des lésions tissulaires diffuses ou difficiles d'accès. L'utilisation autologue des CSM à des fins thérapeutiques, après amplification *in vitro*, permettrait de rétablir, une défaillance des cellules à sortir de leur niche, ou une insuffisance quantitative des CSM au sein de l'organisme.

Actuellement, le choix du tissu d'origine des CSM pour les essais cliniques repose essentiellement sur la facilité et la richesse des prélèvements. Trois sources sont aujourd'hui utilisées : la moelle osseuse, le tissu adipeux et les tissus extra-fœtaux (gelée de Wharton du cordon ombilical, placenta). La source médullaire reste la plus employée (Martinaud et al., 2010) (**Figure 27**).

La grande majorité des essais repose sur l'injection de CSM amplifiées *in vitro* plutôt qu'utilisées directement ou après un éventuel tri cellulaire basé sur le phénotype membranaire. Cette amplification *in vitro* est limitée dans le temps, entraînant un faible nombre de doublement de population, pour ne pas induire d'aberrations chromosomiques. Dans certains cas, les CSM sont associées à une matrice support ou biomatériau qui permettra de combler la perte de substance. Les scientifiques et les cliniciens ne parlent plus alors de thérapie cellulaire mais plutôt d'ingénierie tissulaire, employée notamment dans les réparations osseuses et cartilagineuses. Pour l'instant, aucun essai reposant sur des CSM modifiées génétiquement *ex vivo* n'a été rapporté (Martinaud et al., 2010).

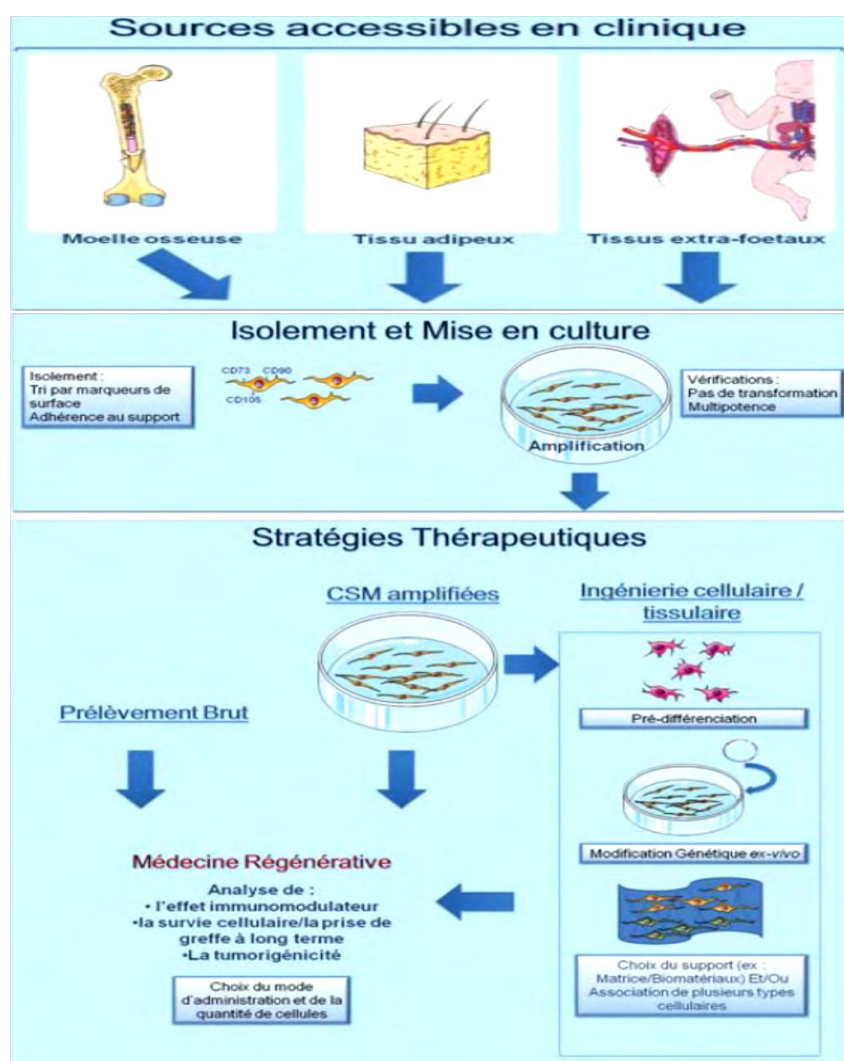


Figure 27: Modes d'utilisations cliniques des CSM.

Des CSM isolées de différents tissus (moelle osseuse, tissu adipeux ou tissus extra-fœtaux) peuvent être amplifiées en culture, et utilisées directement, après prédifférenciation, insertion dans une matrice support, et potentiellement modifiées génétiquement avant réimplantation. Le concept d'ingénierie tissulaire sera développé ultérieurement (d'après Martinaud et al., 2010).

2. CSM et lésions cartilagineuses

A l'heure actuelle, 10 essais cliniques utilisant des CSM dans le traitement de lésions cartilagineuses ont été mis en place (<http://clinicaltrials.gov>) (dernière consultation au 22/08/2011) (**Tableau 6**). L'hypothèse d'un déficit simple de migration des CSM vers la lésion ou d'un nombre insuffisant de cellules physiologiquement, justifie l'emploi de ces dernières en thérapeutique. Les indications de ce type de traitement concernent essentiellement les lésions du cartilage articulaire dans leur globalité. La majorité des essais (environ 80%) utilisent comme source cellulaire, des CSM de moelle osseuse isolées à partir d'un prélèvement autologue. Deux essais utilisent, respectivement, des CSM provenant du tissu adipeux et du cordon ombilical (sang du cordon). Ces cellules sont soit, implantées directement chez le patient après amplification *in vitro*, soit intégrées dans une matrice support (Collagène de type I, polymère, autre matrice de nature protéique). Cette association cellules-matrice tente d'améliorer le comblement des lésions cartilagineuses en diminuant la diffusion des cellules en dehors de la lésion. L'implantation des cellules se fait directement par injection intra-articulaire et parfois, sous arthroscopie. Certains essais utilisent approximativement 40 millions de cellules en dose unique. Le caractère confidentiel des essais cliniques rend difficile la description précise des protocoles employés : nombre d'injection, rythme d'injection, nombre de cellules implantées, etc.

Numéro d'identification de l'essai	Indications/Pathologies du cartilage	Source de CSM	Association à une matrice support	Mode d'administration	Phase de l'essai clinique	Investigateur/ Pays
NCT00850187	Lésions profondes (genou) Gonarthrose	CSM autologues de moelle osseuse	Collagène de type I	Injection intra-articulaire	I	Taghiyar, L. Iran
NCT00891501	Arthrose précoce Lésions ostéocondrales	CSM autologues de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	II/III	Haleem, A.M. Egypte
NCT00885729	Lésions focales (genou)	CSM autologues de moelle osseuse	Membrane (nature ??)	Injection intra-articulaire sous arthroscopie	I	Aroen, A. Norvège
NCT01159899	Lésions profondes (genou) Gonarthrose	CSM autologues de moelle osseuse	Matrice support protéique	Injection intra-articulaire sous arthroscopie	I	Assor, M. France (Marseille)
NCT01227694	Gonarthrose grade II-III	CSM autologues de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire Simple dose, 4.10^7 CSM	I/II	Soler, R. Espagne
NCT01207661	Gonarthrose	??	Non	Injection intra-articulaire Simple dose	I	Fazeli, R. Iran
NCT01399749	Lésions condyle fémorale	CSM autologues de tissu adipeux	Non	Injection intra-articulaire 1.10^6 CSM/cm ² lésions Suture Mb périoste	I/II	Moreno Garcia, A.C. Espagne
NCT01041001	Lésions, gonarthrose	Allogénique, du sang de cordon ombilical	Polymère semi-solide Cartistem®	Injection intra-articulaire Simple dose, 500µL/cm ²	III	Lim, H.C. République de Corée
NCT01183728	Gonarthrose grade II à IV	CSM autologues de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire 4.10^7 CSM	I/II	Orozco, L. Espagne
NCT01152125	Arthrose	CSM autologues de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	I/II	Rudraprasad, M.S Inde

Tableau 6: Ensemble des essais cliniques, en cours de réalisation, utilisant des CSM dans le traitement de lésions cartilagineuses.
(source : <http://clinicaltrials.gov>) (dernière consultation au 22/08/2011). Le caractère confidentiel des essais cliniques rend parfois difficile la description précise des protocoles employés. (Mb : membrane).

Hormis ces essais cliniques en cours de réalisation, des résultats encourageants de certaines études ont déjà été publiés. Tout d'abord, des travaux ont montré une innocuité de la transplantation autologue de CSM de moelle osseuse à moyen terme (11 ans et 5 mois) (Wakitani et al., 2011). De plus, l'injection intra-articulaire de CSM amplifiées est une procédure sûre n'entraînant théoriquement aucune complication.

Cette même équipe a montré également, quelques années auparavant, que la transplantation autologue de CSM de moelle osseuse amplifiées *in vitro*, améliore les symptômes de patients atteints de lésions articulaires. Les CSM sont isolées à partir de moelle osseuse de la crête iliaque. Les cellules sont amplifiées en culture puis suspendues dans une solution de collagène de type I (5.10^6 cellules/mL) et enfin injectées en intra-articulaire. Un an après la transplantation, un comblement total de la lésion est observé chez un patient grâce aux techniques d'imagerie (IRM). Cependant, il est difficile de savoir si le tissu de réparation constitue un cartilage hyalin ou un fibrocartilage (Wakitani et al., 2007) .

Une autre étude, utilisant le même procédé, s'est intéressée à la transplantation de CSM autologues chez un jeune sportif adulte présentant une lésion au niveau du condyle fémoral. Dans cette étude, l'implant est recouvert par une membrane de périoste autologue. Sept mois après la transplantation, l'arthroscopie révèle une réparation tissulaire (**Figure 28**). L'histologie confirme qu'il s'agit bien d'un cartilage de phénotype hyalin. Un an après l'opération, les symptômes cliniques sont améliorés de façon significative (Kuroda et al., 2007) et l'athlète peut reprendre normalement ses activités sportives.

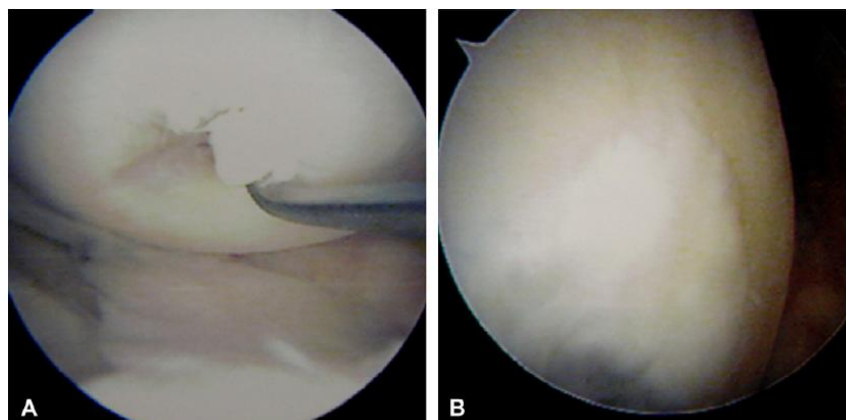


Figure 28: Evaluation de l'évolution de la lésion cartilagineuse par arthroscopie.

A : lésion cartilagineuse sur le condyle fémoral avant la transplantation de CSM. B : Sept mois après la transplantation de CSM, la lésion est totalement comblée par un tissu cicatriciel (d'après Kuroda et al., 2007).

D'autres études ont également démontré l'effet bénéfique de la transplantation autologue de CSM sur la régénération du ménisque (Centeno et al., 2008).

Un essai plus récent, conclut sur des résultats plus mitigés, avec certes une amélioration des symptômes (diminution des douleurs) chez des patients atteints d'une pathologie dégénérative du cartilage. En revanche, les réponses au traitement sont variables d'un individu à l'autre et pour certains, la transplantation autologue de CSM n'a pas montré de bénéfice statistiquement significatif (Davatchi et al., 2011). Les résultats sont encourageants mais une meilleure connaissance des processus de différenciation et du rôle des molécules de matrice (HA, collagène, etc) permettrait d'obtenir de meilleurs résultats.

3. Conclusions et perspectives

Malgré des résultats très prometteurs, et avant d'utiliser ces CSM dans des pratiques thérapeutiques courantes, une meilleure connaissance des mécanismes d'action de ces cellules permettront à l'avenir de mieux orienter les essais et d'améliorer leur efficacité. Il sera nécessaire de déterminer :

- la dose de cellules requises,
- le nombre et le rythme des injections,
- le mode d'administration,
- l'introduction ou non d'agents de co-stimulation,
- l'étape de la maladie au moment de la transplantation,
- une voie non invasive permettant de marquer et de tracer les CSM après leur injection.

Même si les perspectives qu'offrent ces cellules paraissent très encourageantes, il ne faut pas perdre de vue les problèmes de sécurité que représente encore leur administration aux patients. L'objectif sera alors d'assurer un contrôle qualité très strict des CSM permettant de produire des lots de cellules de grade clinique. Le caryotype actuellement exigé comme critère de libération d'un produit thérapeutique à base de CSM, en France, semble effectivement un pré-requis indispensable mais n'explorant qu'insuffisamment les anomalies génétiques acquises en culture. De plus, les CSM sont cultivées *in vitro* en présence de produits d'origine animale (sérum de veau fœtale), non dénués de risques de transmission de zoonoses inconnues ou de maladies à prions. Par conséquent, des sérums autologues ou

d'origine humaine seraient de bons substituts aux sérums animaux. Enfin, un marqueur spécifique des CSM permettrait d'effectuer une purification des populations cellulaires.

Après la thérapie cellulaire dans laquelle des cellules isolées vont remplacer des cellules défectueuses, l'ingénierie tissulaire permet de pallier la dysfonction d'organes ou de tissus dont l'architecture joue un rôle fonctionnel primordial (exemple du cartilage). Les connaissances sur la composition des matrices extracellulaires de différents tissus, des types cellulaires interagissant au sein d'un tissu ainsi que l'amélioration des procédés techniques, permettent de penser que les CSM ont toute leur place dans ces matrices support en tant que cellules différenciées (Martinaud et al., 2010).

IV. Utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage

A. L'ingénierie tissulaire

1. Définition générale

Si un certain nombre de tissu et d'organes régénèrent naturellement à la suite d'un accident (la peau, le foie, le tissu musculaire, etc.), la plupart des tissus ne se régénère pas et le procédé naturel de réparation conduit à un tissu cicatriciel. Depuis le milieu des années 80, l'ingénierie tissulaire vise à développer, *in vitro*, des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus endommagés. Cette voie de recherche clinique et fondamentale repose sur l'ensemencement de cellules dans des matrices utilisées comme support d'adhésion, supports qui peuvent aussi véhiculer des molécules biologiquement actives (**Figure 29**) (Peltari et al., 2009). Pour parvenir à la reconstruction du néo-tissu, l'ingénierie tissulaire fait appel à de nombreuses disciplines telles que la science des matériaux, la biologie moléculaire et cellulaire, l'ingénierie chimique ou encore la médecine. Les domaines d'application sont vastes, puisque l'ingénierie tissulaire pourrait être utilisée dans des pathologies cardiovasculaires, génito-urinaires, musculaires ou encore ostéoarticulaires. Il s'agit véritablement d'une stratégie thérapeutique innovante qui pourrait pallier certains problèmes liés à la transplantation (manque d'organes de remplacement, problème d'histocompatibilité).

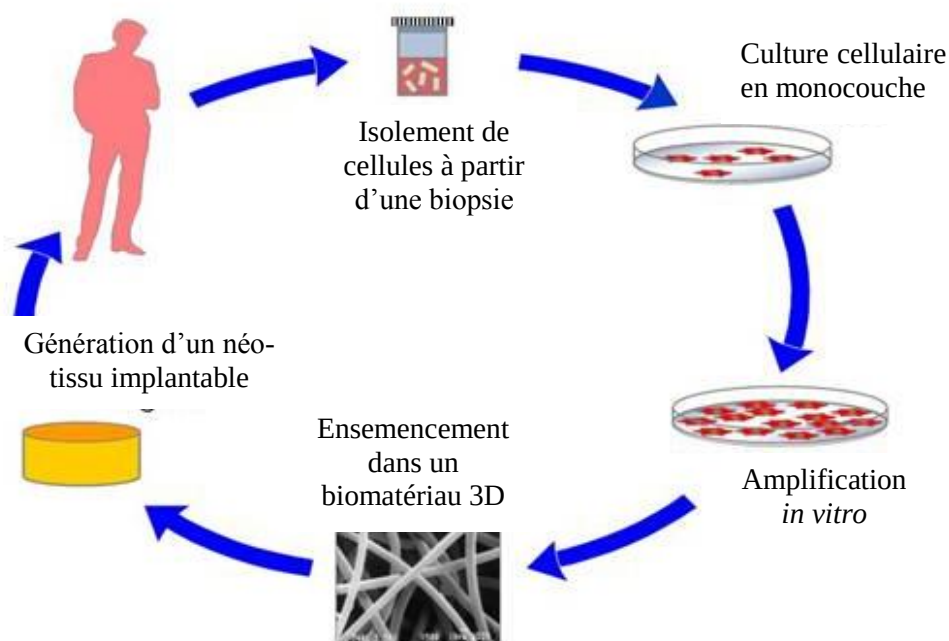


Figure 29: Principe de base de l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire est composée de plusieurs étapes : l'isolement des cellules à partir d'une biopsie tissulaire, l'expansion de ces dernières lors de culture en monocouche, l'ensemencement des cellules dans un biomatériau-tuteur tridimensionnel et la fonctionnalisation de l'ensemble afin d'obtenir un néo-tissu implantable au niveau d'une lésion (d'après Peltari et al., 2009).

2. L'ingénierie tissulaire du cartilage

L'ingénierie tissulaire constitue une voie de recherche prometteuse pour la réparation des lésions chondrales. Elle s'inspire des connaissances de l'ingénierie et des sciences de la vie dans le but de produire un néo-tissu cartilagineux fonctionnel. Ce néo-tissu sera réimplanté, chez le patient, afin de combler les lésions du tissu natif et maintenir ou améliorer ses fonctions au niveau articulaire. Différents paramètres interviennent dans les étapes de l'ingénierie tissulaire, notamment le **choix des cellules**, le **choix des biomatériaux ou matrices support** et la nature de la **fonctionnalisation de ce biomatériau** (Figure 30) (Chung and Burdick, 2008).

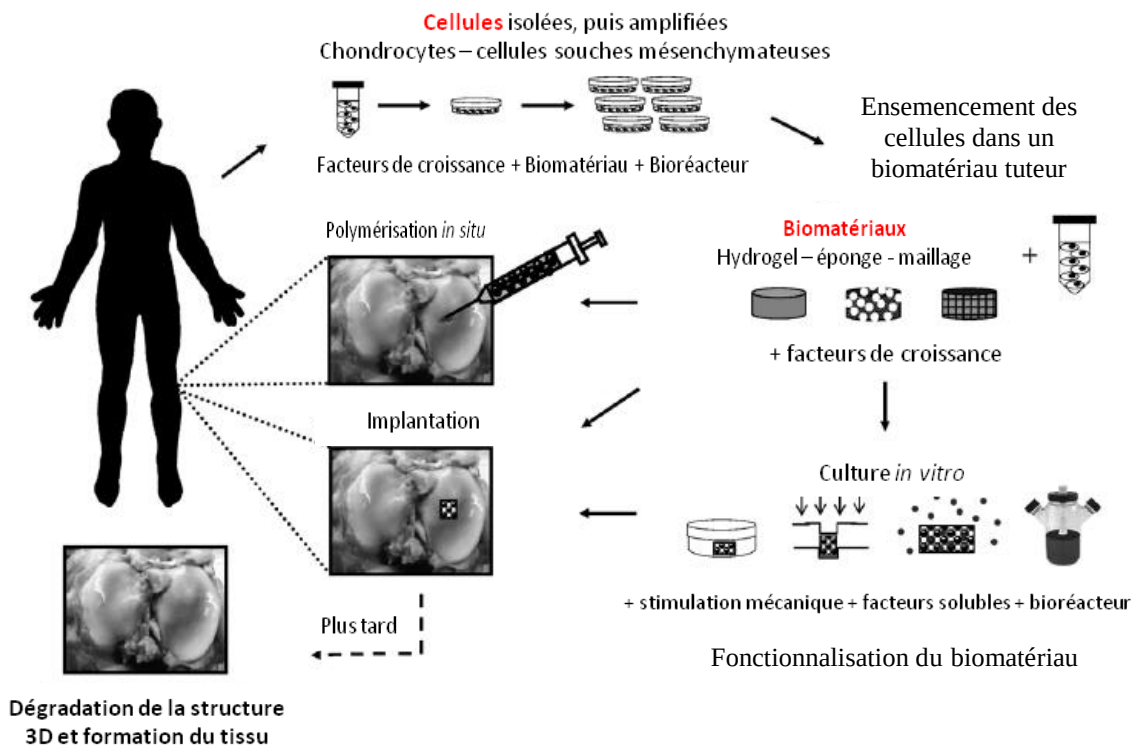


Figure 30: Ingénierie tissulaire adaptée au cartilage.
(D'après Chung et al., 2008).

B. Le choix de la source cellulaire

1. Les cellules natives ou chondrocytes

Le chondrocyte, cellule native du tissu cartilagineux, s'est révélé être au départ la cellule de choix pour l'ingénierie tissulaire. En effet, cette dernière est capable de produire une matrice cartilagineuse riche en agrécannes et en collagène de type II. Cependant, le nombre limité de cellules obtenues par prélèvement autologue et le risque potentiellement iatrogène de ce prélèvement, ont rendu l'utilisation de ces cellules limitée. De plus, lors de leur amplification en monocouche, les chondrocytes se différencient et adoptent un phénotype fibroblastique. La synthèse matricielle en est alors modifiée. C'est la raison pour laquelle, les chercheurs se sont orientés vers une autre source cellulaire plus primitive: les cellules souches mésenchymateuses.

2. Cellules plus précoces : les CSM

Les propriétés intéressantes des CSM et notamment, leur capacité, sous l'influence de stimuli biochimiques ou mécaniques, de se différencier en chondrocytes, font de ces cellules d'excellentes candidates à l'ingénierie tissulaire du cartilage. Elles représentent une véritable alternative aux chondrocytes autologues.

Le suivi de la différenciation chondrocytaire ou chondrogénèse de ces CSM se fait par l'étude de l'expression de certains gènes d'intérêt ou de certaines protéines matricielles (**Figure 31**) (Vinatier et al., 2009). Elle peut également être évaluée par l'évolution de l'expression des marqueurs de surface (CD) observée au cours de la différenciation (Lee et al., 2009).

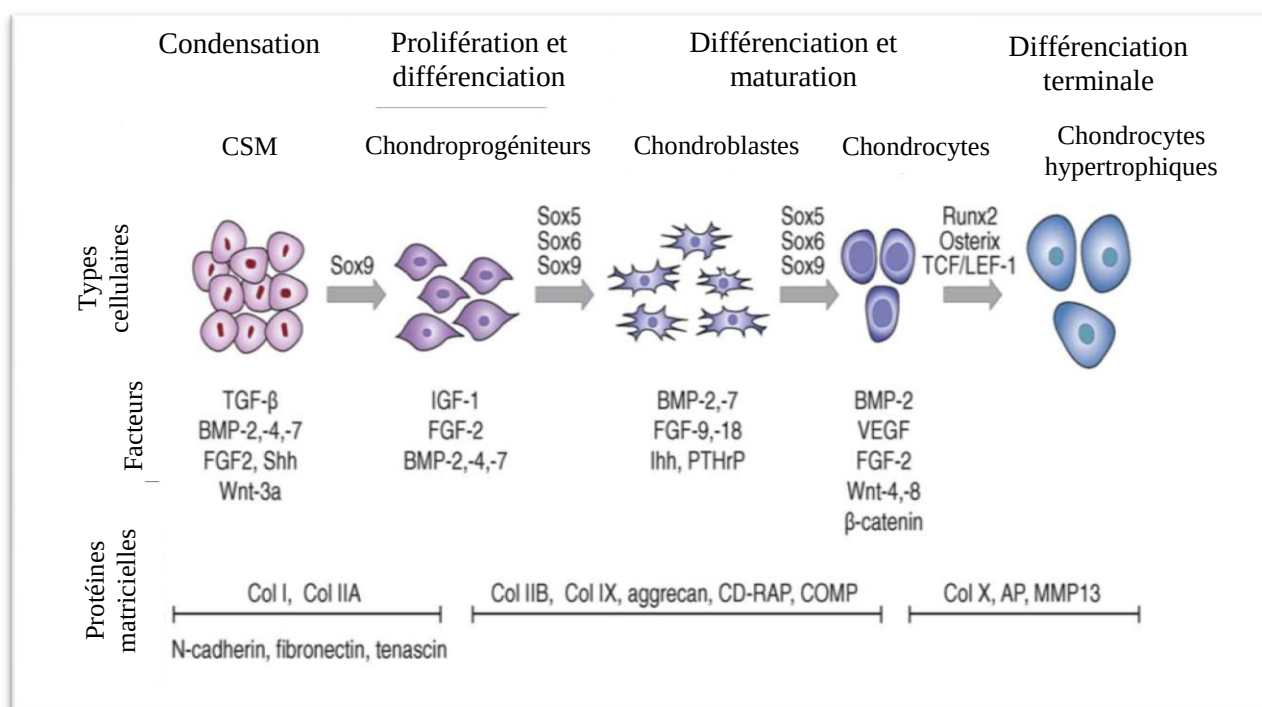


Figure 31: Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse. La chondrogénèse se divise en 4 étapes : la phase de condensation, de différenciation, de maturation et de différenciation terminale. Chacune de ces étapes se caractérise par l'expression de certains facteurs de transcription ou certaines protéines matricielles. (D'après Vinatier et al., 2009).

C. Le choix du biomatériau

Destinés à une application clinique, les biomatériaux doivent répondre à certaines exigences et doivent posséder, entre autres, des propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité.

D'origine naturelle ou synthétique, homogène ou hétérogène, monophasique ou multiphasique, le biomatériau constitue une matrice tridimensionnelle. Cette dernière doit se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques et mimer la structure naturelle du cartilage afin que les cellules produisent un néo-cartilage fonctionnel. Le biomatériau joue un

rôle essentiel dans le maintien du phénotype des chondrocytes et dans l'induction de la différenciation des CSM en chondrocytes (Kemppainen and Hollister, 2010).

Dans la suite de l'exposé, il sera développé les biomatériaux utilisés dans le cadre de notre travail expérimental : des hydrogels d'alginate enrichis en hyaluronate de sodium ou d'hydroxyapatite.

1. Nature des biomatériaux

Les biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Parmi les composés synthétiques, nous pouvons citer les polymères d'acides polylactique et polyglycolique. Les supports d'origine organique se composent de collagène de type I, de fibrine ou encore de polymères polysaccharidiques tels que l'alginate. Le tableau 7 regroupe les avantages et les inconvénients de ces principaux polymères (**Tableau 7**) (Puppi et al., 2010).

Biomatériaux	Avantages	Inconvénients
Naturels	Faible toxicité, faible coût, recyclable, adhésion cellulaire+++, biodégradable	Faible stabilité mécanique, thermique et chimique. Risque infectieux. Possible perte des propriétés biologiques lors de la formulation
Collagène de type I	Peu immunogène, adhésion cellulaire+++, propriétés mécaniques++, Biocompatibilité	Biodégradation rapide, répartition des cellules -
Alginate	Biodégradable, injectable, intégration cellulaire ++, biocompatible	Stabilité mécanique --, difficulté à stériliser, impuretés
Acide hyaluronique	Non immunogène, interactions avec cellules/matrice ++, production à grande échelle (Ferm. bact.)	Résistance mécanique -, tissu formation --
Hydroxyapatite	Biocompatibilité, ostéoconductivité, ostéoinductivité	Solubilité-- : formation de cristaux
Synthétiques	Large variétés, propriétés physiques, chimiques et mécaniques+++, peu immunogène, risque infectieux---	Coût élevé, potentiellement toxique, peu de données sur réponses biologiques

Tableau 7: Avantages et inconvénients de certains biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.

(D'après Puppi et al., 2010).

L'alginate (Alg), d'origine végétale, est un copolymère polyanionique, formé par des chaînes de polysaccharides constituées de groupes acide guluronique et mannuronique. Il est soluble dans les solutions aqueuses et forme un gel stable. Ce polymère constitue un modèle

de référence pour des études de morphologie cellulaire, de synthèse des protéoglycannes et de collagènes mais aussi, de mécanobiologie des chondrocytes articulaires. Bien que l'alginate de sodium ne soit pas un composant naturel de la matrice extracellulaire, il présente une structure similaire à celle des glycosaminoglycannes du cartilage (Wang et al., 2009).

L'acide hyaluronique (HA) est un des composants de la MEC du cartilage natif. Pour l'ingénierie tissulaire, il permet d'améliorer la prolifération des cellules et leur attachement au biomatériau grâce à des récepteurs membranaires. Il possède non seulement des propriétés rhéologiques remarquables en solution notamment en terme de viscoélasticité, mais il a aussi une action bénéfique sur l'activité de prolifération et de synthèse des chondrocytes (Gigant-Huselstein et al., 2004). Ce biomatériau, extrait de tissu animal, peut être utilisé seul (Jakobsen et al., 2009) ou combiné avec d'autres biomatériaux.

L'hydroxyapatite (Hap), forme naturelle d'apatite de calcium, est la principale composante minérale de l'os. Elle est utilisée dans l'ingénierie tissulaire car elle possède de bonnes propriétés de biocompatibilité, d'ostéoconductivité et d'ostéoinductivité (Marinucci et al., 2010).

2. Principaux mode de fabrication

Les biomatériaux employés actuellement se présentent sous plusieurs formes : hydrogels, éponges ou maillages (**Figure 32**) (Chung and Burdick, 2008).

D'un point de vue mécanique, les hydrogels présentent l'avantage d'utiliser l'eau de la même façon que le cartilage. Sous l'action de compression, l'eau sort de l'hydrogel, ce qui permet à ce dernier d'absorber le choc. Puis, une fois la contrainte relâchée, l'eau reprend sa place dans le matériau et celui-ci retrouve son volume initial. D'un point de vue biologique, les hydrogels offrent un environnement 3D suffisamment poreux pour permettre la prolifération cellulaire ainsi que le transport des nutriments.

Ils peuvent se présenter sous forme de biomatériau injectable, sous forme de billes ou de moules après polymérisation. Dernièrement, une équipe a développé un hydrogel à base d'alginate pulvérisé sur un support, afin d'obtenir une colonisation homogène des cellules au sein du biomatériau (Tritz et al., 2010). Cette technique originale permet de pulvériser une suspension biomatériau/cellules, couche par couche, et de reproduire ainsi une organisation zonale.

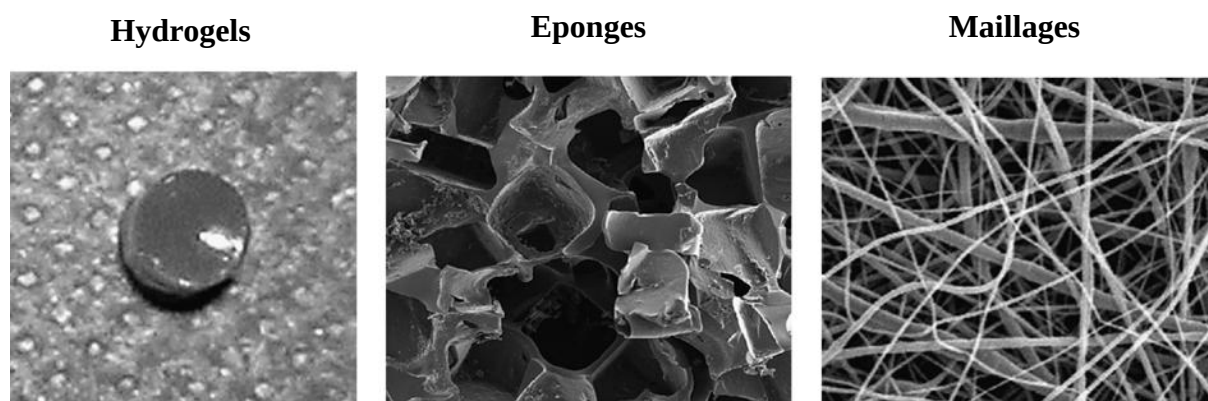


Figure 32: Architectures de biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Les biomatériaux se retrouvent essentiellement sous la forme d'hydrogels, d'éponges ou de mailles (d'après Chung et al., 2008).

3. Matrice simple ou mixte, monophasique

Les biomatériaux naturels ou synthétiques, peuvent être utilisés soit individuellement, soit en association pour former des matrices mixtes. De cette façon, les scientifiques cherchent à améliorer les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des biomatériaux. Récemment, une équipe a synthétisé un nouveau biomatériau, composé de collagène, d'hydroxyapatite (Hap) et de chondroïtine sulfate, ensemencé en CSM. Ce dernier a montré des propriétés mécaniques et chondrogéniques supérieures à celles rencontrées avec une matrice uniquement composée de collagène (Ohyabu et al., 2009). D'autres auteurs ont également montré que la présence d'HA au sein d'un biomatériau peut permettre de stimuler les activités biologiques des chondrocytes. Afin de bénéficier des avantages rhéologiques et biologiques de l'HA, ils l'ont associé à des hydrogels d'alginate (Gigant-Huselstein et al., 2004).

4. Biomatériaux stratifiés, multiphasiques

A l'heure actuelle, les approches développées en ingénierie tissulaire du cartilage reposent sur l'utilisation d'un biomatériau unique ensemencé en cellules (chondrocytes ou CSM) qui ne reproduit pas les différentes couches observées au sein du tissu (Wang et al., 2009). Leur utilisation se limiterait donc aux réparations superficielles du cartilage. Afin d'étendre les potentialités de l'ingénierie tissulaire aux lésions profondes, la construction de nouveaux biomatériaux est apparue. Ces derniers deviennent stratifiés et multiphasiques afin

de mimer l'organisation zonale du cartilage et de reproduire, *in fine*, la composition naturelle du tissu (Klein et al., 2009 ; Kim et al., 2003 ; Kon et al., 2009).

Deux approches concernant une construction zonale sont décrites dans la littérature (Klein et al., 2009) (**Figure 33**) :

- La première consiste à ensemercer des cellules différentes dans des couches de biomatériau de composition identique. Dans cette approche, les cellules, de phénotypes différents, vont synthétiser une MEC spécifique. En 2003, Kim et al ont utilisé des sous-populations chondrocytaires issues des différentes couches cartilagineuses (superficielle, moyenne, profonde) dans un polymère synthétique (Kim et al., 2003) (**Figure 34-A**).
- La seconde consiste à ensemercer des cellules identiques (chondrocytes ou CSM) dans des couches de biomatériaux de composition différente. La spécificité du biomatériau doit guider la différenciation des cellules vers un phénotype spécifique (Zhou et al., 2011). Ainsi, Kon et al ont mis au point un biomatériau triphasique composé de collagène de type I et d'hydroxyapatite en proportion différente en fonction des strates (**Figure 34-B**). Les auteurs tentent ainsi, de mimer la MEC cartilagineuse et sous-chondrale (Kon et al., 2009).

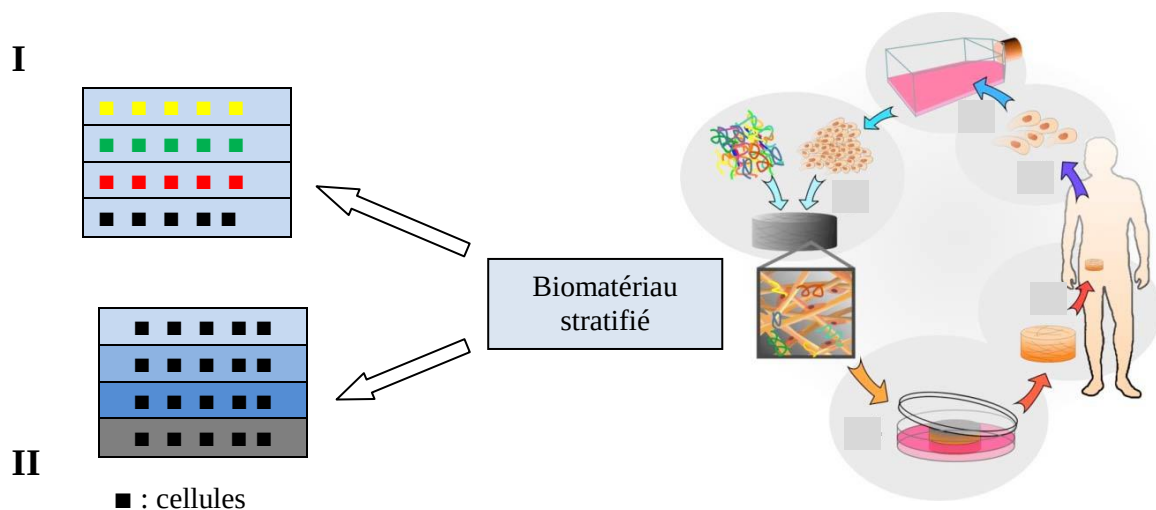


Figure 33: Deux approches différentes (I et II) de la construction d'un biomatériau stratifié.

I : La première consiste à ensemercer des cellules différentes dans des couches de biomatériau de composition identique. II : La seconde, quant à elle, consiste à ensemercer des cellules identiques dans des couches de biomatériau de composition différente.

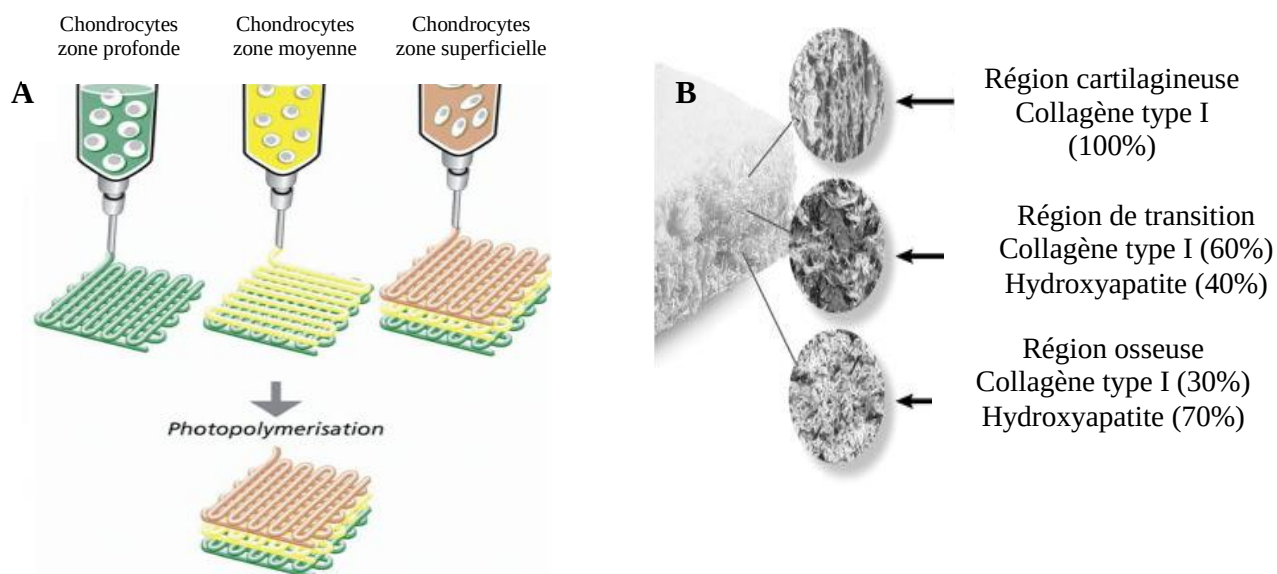


Figure 34: Représentation schématique des deux approches de l'ingénierie tissulaire stratifiée.

A : Les chondrocytes issus de la couche profonde, moyenne ou superficielle du cartilage, sontensemencés dans des couches de Polyéthylèneglycol (PEG) (d'après Kim et al., 2003). B : Biomatéériau triphasique où les couches sont de composition différente etensemencées en chondrocytes. Les auteurs tentent ainsi de mimer une structure ostéo-chondrale (d'après Kon et al., 2009).

Quelle que soit la stratégie adoptée, biomatéériau monophasique, stratifié, il est nécessaire de le fonctionnaliser afin d'orienter la différenciation cellulaire ou de permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire proche de celle observée *in vivo*.

D. Fonctionnalisation du biomatéériau

Cette fonctionnalisation du système cellules/matrices se fait par l'apport de stimulations biochimiques et/ou mécaniques. Elle tente ainsi de reproduire les conditions naturelles dans lesquelles se trouve le tissu cartilagineux. La fonctionnalisation permet aux cellules d'orienter leur différenciation (pour les CSM) mais aussi d'améliorer l'activité métabolique et par conséquent, la synthèse matricielle des cellules résidentes.

1. Fonctionnalisation par voie biochimique

De nombreux facteurs biochimiques tels que les facteurs de croissance, les vitamines (acide ascorbique), les hormones (dexaméthasone) et la teneur en oxygène, jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des chondrocytes et l'induction de la différenciation des CSM en chondrocytes. Parmi ces facteurs de croissance, la superfamille du

TGF- β (Transforming Growth Factor- β) comportant les TGF- β , les BMPs (Bone Morphogenic Proteins), les activines et les inhibines ont montré des effets chondroinductifs importants sur les CSM. Le TGF- β 1 (Elder et al., 2009) et la BMP-2 (Freyria et al., 2008) possèdent des propriétés chondrogéniques importantes.

2. Fonctionnalisation par voie mécanique

Le cartilage est soumis en permanence à plusieurs types de contraintes mécaniques. La contrainte principale est la compression, engendrant, elle-même, d'autres contraintes (flux de liquides, contraintes de cisaillement, d'étirement et pressions hydrostatiques) (Greene et al., 2010). La composition et l'organisation du cartilage lui procurent des propriétés de résistance mécanique importantes face aux sollicitations subies. De plus, ces contraintes mécaniques ont un effet bénéfique sur la qualité du tissu cartilagineux. En revanche, si ces contraintes sont en excès (obésité, vieillissement, accident), le cartilage, incapable de se régénérer efficacement, peut devenir pathologique. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage, trois principaux types de contraintes mécaniques sont utilisés dans le but de fonctionnaliser le système cellules/matrice. Il s'agit de la compression, de la pression hydrostatique et du cisaillement au sein de bioréacteurs (Chung and Burdick, 2008). La compression est la contrainte la plus importante au niveau de l'articulation et par conséquent, la plus étudiée *in vitro* (Steinmetz and Bryant, 2011). Il a été montré que la compression dynamique appliquée sur différentes constructions cellulaires, stimulait la différenciation ainsi que l'activité de biosynthèse des cellules (Xie et al., 2007). Cette compression dynamique augmenterait également les propriétés mécaniques des biosystèmes cellules/matrice (Huang et al., 2010).

Partie IV expérimentale :
Biomatériaux stratifiés sous
contraintes mécaniques : nouvelle
approche dans l'ingénierie du
cartilage

I. Hypothèse et objectifs de travail

Ce travail expérimental a été réalisé dans le cadre de mon stage de Master 2 Recherche, en 2010, au sein du laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires – Groupe Ingénierie cellulaire et tissulaire (UMR-UHP-CNRS-7561, FR3209) et sous la direction de Madame le Docteur Céline Huselstein.

Aujourd'hui, les études menées sur l'ingénierie tissulaire du cartilage reposent essentiellement sur l'utilisation de biomatériaux monophasiques (hydrogels, éponges, maillages) ensemencés en chondrocytes ou CSM. Ces constructions ne reproduisent pas la structure zonale du cartilage articulaire et par conséquent, elles se limiteraient aux réparations des lésions superficielles du tissu cartilagineux. L'ingénierie tissulaire « stratifiée » du cartilage semble, donc, être une voie de recherche prometteuse dans la prise en charge des lésions cartilagineuses. En effet, la construction de biomatériaux stratifiés mimant l'organisation zonale du cartilage permettrait de développer, *ex-vivo*, un tissu proche structurellement du cartilage natif. Cette construction pourrait être réimplantée, par la suite, au niveau d'une lésion et permettrait la synthèse d'un néo-tissu cartilagineux fonctionnel. De cette façon, les lésions profondes du tissu, atteignant l'os sous-chondral, pourraient être comblées grâce à ces biomatériaux stratifiés.

Le programme de recherche, dans lequel s'inscrit notre travail, consiste à réaliser un biomatériau stratifié et fonctionnalisé. L'architecture stratifiée de ce biomatériau est basée sur l'empilement successif de couches d'hydrogels d'alginate et de multicouches de polyélectrolytes (MPE) de poly-L-lysine / HA (PLL/HA). Ces multicouches constituent un assemblage alternatif de polyélectrolytes chargés négativement (HA) et positivement (PLL). L'alginate étant chargé négativement, les MPE permettront d'unir plusieurs couches du polysaccharide (Mjahed et al., 2008). Le projet repose donc, sur une démarche innovante et originale consistant à préparer des biomatériaux fonctionnalisés composites renfermant des cellules (CSM) et divers éléments matriciels [hyaluronate (HA), hydroxapatite (Hap)] au sein d'édifices et architectures parfaitement contrôlés. La couche supplémentée en Hap tentera de mimer la couche profonde du cartilage (zone de transition avec l'os sous-chondral) et celle enrichie en HA, se rapprochera plutôt du cartilage superficiel.

Au cours de ce travail, nous avons validé, tout d'abord, la faisabilité de construction de ce biomatériau stratifié. Après ensemencement avec des CSM, nous avons suivi le potentiel de

différenciation de ces cellules, dans chaque type de biomatériau et en présence ou non de contraintes mécaniques.

II. Matériel et Méthodes

A. Culture cellulaire

Les CSM issues de la moelle osseuse sont cultivées, amplifiées en monocouche avant d'êtreensemencées dans le biomatériau stratifié.

Réactifs:

- Milieu de culture complet : Milieu de culture DMEM-Low Glucose (1g/L) (DMEM-LG) (Gibco, France), Sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 10% (v/v dans DMEM) (Sigma, France), Glutamine à 2mM (Sigma, France), Antibiotiques (Pénicilline à 100U/mL / Streptomycine à 100µg/mL (Gibco, France)), Antifongique (Amphotéricine B à 2,5µg/mL (Gibco, France)), FGF à 1ng/mL.
- Solution de Trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, France)
- Tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma, France)
- Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) à 10% (Sigma, France)
- Solution de Bleu de Trypan à 0,4% (Sigma, France)

1. Isolation des CSM humaines de la moelle osseuse

Les CSM humaines sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse humaine obtenus lors de la mise en place de prothèse totale de hanche. La moelle osseuse est placée dans un tube hépariné de 50mL supplémenté en antibiotiques avant d'être reprise dans 25mL de milieu complet puis centrifugée (300g, 5min.) . Le culot cellulaire est suspendu dans 20mL de milieu complet afin de réaliser une numération. Un comptage cellulaire est réalisé après avoir lysé les globules rouges.

2. Culture en monocouche

Les CSM obtenues sont ensemencées à une densité de 5.10^4 cellules par cm^2 et incubées en atmosphère humide à 37°C, 5% CO₂ pendant 48h de culture. Les cellules non adhérentes sont éliminées lors du renouvellement du milieu de culture. Ce dernier est ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%). Ceci est le passage 0 (P0).

3. Passage et congélation/décongélation des cellules

A sub-confluence, les cellules sont rincées avec une solution d'HBSS. La trypsine est ajoutée dans la boîte de culture et laissée en contact des cellules pendant 5 min à 37°C. Pour inhiber l'action de la trypsine, du milieu complet est ajouté à volume égal. Le surnageant contenant les cellules est centrifugé (300g, 5 min). Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet et une numération cellulaire est effectuée avec le Bleu de Trypan afin de répartir les cellules à raison de 10^3 cellules par cm^2 dans les nouvelles boîtes de culture.

Pour la congélation des cellules, le culot cellulaire, obtenu après l'action de la trypsine, est suspendu dans une solution de SVF contenant 10% de DMSO à 4°C, de façon à obtenir 10^6 cellules/mL de milieu de congélation. La suspension cellulaire est réfrigérée pendant 30 min à 4°C, puis 30 min à -20°C et enfin conservée dans un congélateur à -80°C.

Pour la décongélation, la suspension cellulaire, conservée à -80°C, est chauffée dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la fonte totale du contenu du cryotube. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu complet pour éliminer le DMSO. Enfin, les CSM sontensemencées à raison de 10^3 cellules par cm^2 dans des boîtes de culture et cultivées jusqu'à sub-confluence.

B. Ensemencement des CSM dans un biomatériau stratifié

Réactifs :

- Solution d'alginate/HA : l'alginate de sodium (1,5%), de viscosité moyenne, issue d'une algue brune (Sigma, France), et l'acide hyaluronique (HA) (Accros, France) sont mélangés dans des proportions de 4 : 1 et stérilisés par autoclave (120°C, 50 min) avant d'être solubilisés dans du NaCl 0,9%.
- Solution d'alginate/Hap : l'alginate (1,5%) et l'hydroxyapatite (Hap) (taille des particules : 0-30 μm) sont mélangés dans des proportions de 19 : 1 et stérilisés par autoclave avant d'être solubilisés.
- Polyelectrolytes : - Poly-L-Lysine hydrobromide (PLL) (Sigma, France) à 1mg/mL
 - Acide hyaluronique 95% (HA) (Accros, France) à 1mg/mL
- Chlorure de Calcium (CaCl_2) stérile à 102mM (Sigma, France)
- Milieu de différenciation : DMEM-High Glucose (4,5g/L) (DMEM-HG) (Invitrogen, France) + 1mM de CaCl_2 , SVF à 10%, Glutamine 2mM, antibiotiques, antifongique,

pyruvate de sodium (Sigma, France) à 100µg/mL, proline (Sigma, France) à 40µg/mL, L-acide ascorbique 2P (Sigma, France) à 50µg/mL, dexaméthasone (Sigma, France) à 100nM.

Matériel :

- Système de pulvérisation : compresseur (FengHua BiDa, Chine), buse-VL + réservoir (Paasche®, USA) (**Figure 35**).
- Biopsy Punch, diamètre de 5 mm (Stiefel).



Figure 35: Système de pulvérisation.

L'ensemble hydrogel-cellule est pulvérisé sur une lame de verre à l'aide d'un aérographe.

A l'issue du 3^{ème} passage, les CSM sont suspendues dans une solution d'alginate/Hap à raison de $3 \cdot 10^6$ cellules/mL, puis pulvérisées sur une lame de verre à une pression de 0,9 bar. Le gel pulvérisé est baigné dans une solution de CaCl_2 à 102mM pendant dix minutes. Le gel ainsi polymérisé, est rincé avec du NaCl 0,9%. Cinq bicouches de polyélectrolytes (PLL/HA) sont ensuite pulvérisées à une pression de 0,4 bar. Entre chaque pulvérisation de PLL et de HA, le gel est rincé avec du NaCl 0,9% pour éliminer l'excès de polyélectrolytes. Une sixième couche de PLL est pulvérisée en surface afin d'assurer l'adhésion électrostatique entre les MPE et la couche d'alginate/HA. La seconde couche d'hydrogel composée d'alginate/HA est construite de la même façon que la première et est directement pulvérisée sur les MPE. Cette seconde couche est volontairement plus fine que la couche d'alginate/Hap (ratio de 40/60 v/v) de façon à pouvoir distinguer et séparer les deux couches au moment de l'analyse du comportement des cellules au sein des deux biomatériaux.

Lorsque le biomatériau multiphasique est obtenu, des cylindres (**Figure 36**) de 5 mm de diamètre sont découpés avec un poinçon et placés dans des plaques de compression de 6 puits (Dunn labortechnik GmbH, Allemagne). Le jour de la conception des cylindres est noté J0. De J0 à J3, les cylindres sont maintenus, en culture, en absence de contrainte mécanique.

A partir de J3, une partie des cylindres est soumise à une compression jusqu'au 28ème jour, les autres cylindres sont utilisés comme contrôle et maintenus, en culture, sans contrainte mécanique. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine.

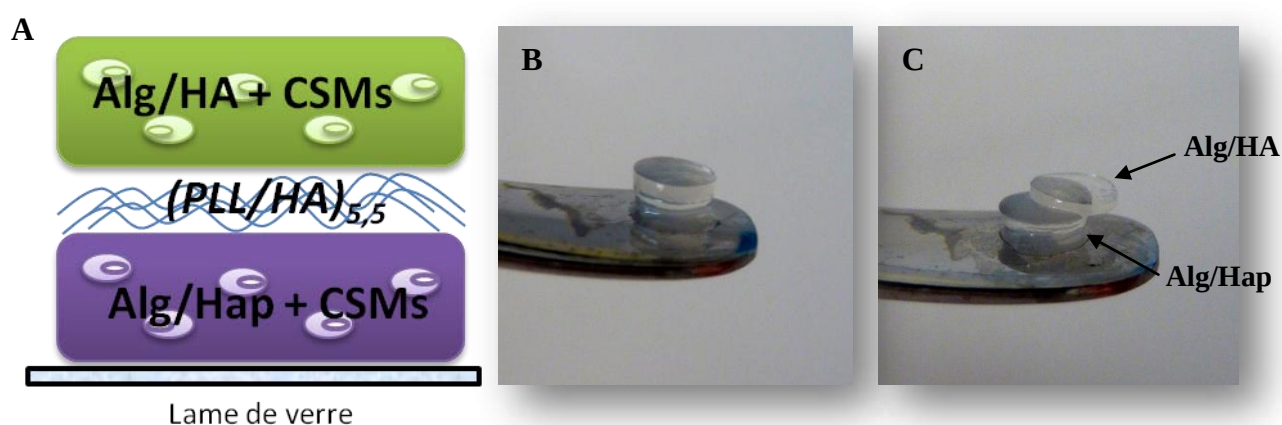


Figure 36: Construction du biomatériau stratifié.

A : Représentation schématique du biomatériau stratifié avec les 2 couches d'hydrogels séparées par des multicouches de polyelectrolytes. B : Biomatériau stratifié découpé sous forme de cylindres de 5mm de diamètre. C : Distinction des deux couches d'hydrogel après décollement.

C. Compression dynamique intermittente

Dans notre étude, la fonctionnalisation du biomatériau se fait via l'apport de contraintes mécaniques et plus particulièrement, de la compression dynamique intermittente. Cette dernière est réalisée à l'aide d'un système de compression Flexcell (Flexcell International, USA) (**Figure 37**). La forme du signal de pression, son amplitude et sa fréquence sont des paramètres pilotés par le logiciel FX-3000. Les paramètres de la compression dynamique choisis sont les suivants :

- Force : 200 KPa
- Fréquence : 1 Hertz
- Intermittence : 30min on, 30min off
- Durée de compression : 4h/jour

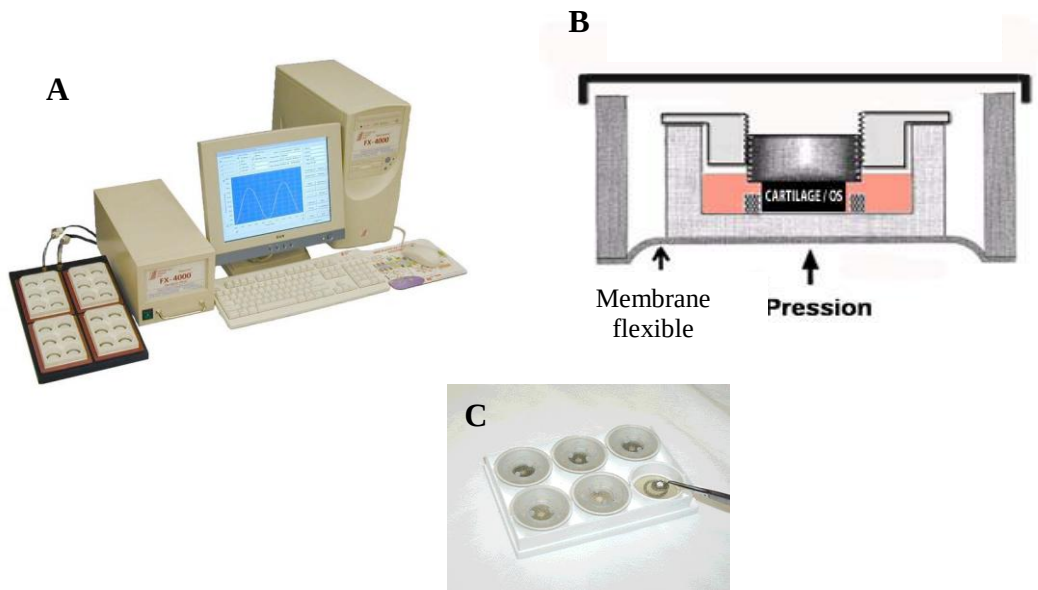


Figure 37: Fonctionnalisation du biomatériau par compression dynamique intermittente.

A et B: Système de compression Flexcell : la pression d'air, générée par un compresseur, est appliquée par le dessous du puits, dont le fond est composé d'une membrane flexible en silicone. La déformation de la membrane provoque une élévation du puits et compresse l'échantillon contre le bouchon. C : Plaque de compression 6 puits.

D. Méthodologies analytiques

Différents paramètres évaluant le comportement des cellules, leur caractérisation et leur activité de synthèse sont analysés au cours des 28 jours de culture (**Tableau 8**).

Temps de culture (en jours)	Cytométrie en flux			qRT-PCR	Microscopie confocale		Histologie	
	Viabilité cellulaire	Immuno-phénotypage	Cycle cellulaire	Expression génique	Répartition des cellules	Collagènes I, II et X	Collagènes totaux	Protéoglycannes
0		✓						
3	✓	✓	✓	✓	✓			
5					✓			
10					✓			
14	✓	✓	✓	✓				
28	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓

Tableau 8: Chronologie des paramètres analysés au cours de l'étude.

La viabilité, l'immunophénotypage et le cycle cellulaire sont analysés par cytométrie en flux. L'expression des gènes d'intérêt est appréhendée par qRT-PCR. La microscopie confocale permet de visualiser la répartition des cellules ainsi que les collagènes matriciels. Les collagènes totaux et les protéoglycannes sont visualisés par histologie.

1. Cytométrie en flux

La viabilité cellulaire, l'expression des marqueurs de surface ou encore le cycle cellulaire sont étudiés par cytométrie en flux (CMF).

Réactifs:

- Kit Vybrant/Apoptosis™ (Invitrogène, France) :
 - Tampon annexine-liant 5X, dilué 5 fois dans l'eau déionisée avant utilisation (1X) ;
 - Solution d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 ;
 - Solution d'iodure de propidium (IP) 100µg/mL.
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, France)
- Solution de Citrate-EDTA (55mM et 50mM respectivement dans de l'eau distillée)

- Milieu de culture DMEM F12 sans rouge de phénol
- Solution de blocage : 0,5% BSA (Albumine de sérum bovin) diluée dans DMEM sans rouge de phénol
- Solution d'immunomarquage : anticorps dilué dans la solution de blocage (**Tableau 9**)
- Kit DNA-Prep Reagent System (Beckman Coulter, USA): DNA PrepTM LPR, DNA PrepTM Stain: iodure de Propidium (50µg/mL)

Matériel :

- Cytomètre BD FACSCanto II (BD Biosciences, USA)

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Anti-HLADR/FITC	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (souris)	BD Pharmigen
Anti-CD44/FITC	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Anti-CD105/PE	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Anti-CD166/PE	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Contrôle isotypique/PE	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter
Contrôle isotypique/FITC	Humain	IgG (souris)	Beckman Coulter

Tableau 9: Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs.

Les anticorps sont directement couplés à un fluorochrome : Phycoérythrine (PE) ou Fluorescein Isothiocyanate (FITC). Les anticorps sont dilués au 1/10ème ou au 1/5ème dans la solution de blocage en fonction de l'anticorps.

a. Digestion des biomatériaux

Afin de récupérer les cellulesensemencées dans les biomatériaux, ces derniers sont dissous dans 500µL de solution de Citrate-EDTA, pendant 10 min. La suspension est centrifugée (300g, 10min) et le culot cellulaire peut être utilisé pour réaliser les marquages fluorescents.

b. Analyse de viabilité cellulaire, apoptose et nécrose

Les culots cellulaires sont suspendus dans 100µL de tampon annexine-liant 1X puis 2,5µL d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 et 1µL de IP (100µg/mL) sont ajoutés à la suspension cellulaire. Après 15min d'incubation, 200µL de tampon annexine-liant 1X sont ajoutés dans chaque tube. Après homogénéisation, les échantillons sont prêts pour l'analyse en cytométrie. Les cellules sont analysées en mesurant l'émission de fluorescence à 530 nm et 575 nm correspondant, respectivement, à l'émission de fluorescence de l'Alexa 488 (cellules apoptotiques) et de l'IP (cellules nécrotiques). Un contrôle négatif (cellules sans marquage) est préparé et permet d'analyser l'auto-fluorescence des cellules. De la même manière, un contrôle positif apoptose et nécrose sont réalisés.

c. Analyse de l'expression des marqueurs de surface cellulaire

Les cellules sont lavées avec 500µL de solution de blocage puis centrifugées (300g, 5min). Les culots cellulaires sont resuspendus dans 100µL de solution d'immunomarquage (**Tableau 9**). Après une incubation de 30 min, 0,5 mL de DMEM sans rouge de phénol sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation est faite afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300µL de DMEM sans rouge de phénol avant d'être analysé en cytométrie en flux. Cet immunophénotypage est réalisé à la fois sur les cellules en monocouche ainsi que sur les cellules ensemencées dans les hydrogels.

d. Analyse des phases du cycle cellulaire

Les culots cellulaires sont suspendus dans 25µL de DMEM sans rouge de phénol, puis perméabilisés en ajoutant 25µL de solution DNA Prep LPR et suivi d'une agitation pendant 60 secondes au vortex. Les cellules sont ensuite marquées avec l'iodure de propidium en ajoutant 250µL de solution DNA Prep Stain, puis mises en agitation pendant 60 secondes. Enfin, les cellules sont analysées en cytométrie en flux, dans l'heure qui suit le marquage. Cette étude du cycle cellulaire permet également d'évaluer l'indice de prolifération des cellules.

2. RT-PCR quantitative

L'étude de l'expression des gènes est réalisée par RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) quantitative. Les gènes étudiés sont les gènes codant pour des protéines matricielles (collagènes de type I, II et X, COMP), des protéoglycannes (agrécanne),

des facteurs de transcription (Sox9, RunX2), des marqueurs chondrogéniques terminaux (Métalloprotéase 13, MMP13), ou encore une protéine de référence (RP29).

Réactifs :

- Kit d'extraction des ARN : RNeasy mini kit (Qiagen, France)
- Amorces de polydT 12-18 (Invitrogen, France)
- Reverse Transcriptase i-script, tampon RT (Biorad, France)
- SYBR Green (Qiagen, France)
- Amorces de chaque gène (MWG-Biotech AG France) (**Tableau 10**)
- Eau DNase, RNase et Protease-free (5 Prime GmbH, Allemagne)

Nom de l'amorce		Séquence (5'-3')	Température de fusion
Collagène 1	Reverse	GGACCACTTTCACCCTTGT	60°C
	Forward	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	
Collagène 2	Reverse	ATCTCAGGGCTGAGGCAGT	60°C
	Forward	GCAGGATGGGCAGAGGTAT	
Collagène 10	Reverse	CTCCAGGATCACCTTTTGGA	60°C
	Forward	GCTAAGGGTGCCCCACTTAC	
Agrécanne	Reverse	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	63°C
	Forward	TCGAGGACAGCGAGGCC	
COMP	Reverse	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60°C
	Forward	ACAATGACGGAGTCCCTGAC	
Sox9	Reverse	CCTGGGATTGCCCCGA	55°C
	Forward	GAGCAGACGCACATCTC	
Runx2	Reverse	CGCTCATTTTGCCGGGCTGC	59°C
	Forward	TCCTCAGCCCCATCACCTCCA	
RP29	Reverse	AGACGCGCAAGAGCGAGAA	60°C
	Forward	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	
MMP13	Reverse	TCTAAGCCGAAGAAAGACTGC	57°C
	Forward	TGGTGGTGATGAAGATGATTT	

Tableau 10: Amorces et conditions de PCRq pour chaque gène.

Matériel :

- Thermocycler (LightCycler 1.5, Roche, USA)
- Spectrofluorimètre (Light Cycler 1.5 Roche, USA)

Protocole :

Une fois les biomatériaux dissous, les cellules sont récupérées puis lavées 5 fois avec du PBS. L'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du fournisseur en utilisant le kit d'extraction des ARN. Le dosage des ARN est réalisé par spectrofluorimétrie. La Rétro Transcription (RT) des ARN en ADNc est réalisée dans le tampon de RT, en présence des amorces polydT par une Reverse Transcriptase i-script pendant 90min à 37°C. Ensuite, la réaction de PCRq s'effectue dans des capillaires placés dans le thermocycler. 2µL de chaque échantillon sont dilués dans une solution contenant : 10µL de SYBR Green, 6µL d'eau RNase free, 1µL de chaque amorce du gène étudié. A chaque cycle, la fluorescence de chaque capillaire est mesurée et au dernier cycle de PCR, la courbe de fusion est réalisée. Afin de quantifier l'expression du gène étudié, une gamme étalon est réalisée et analysée en même temps que les échantillons.

3. Microscopie confocale

La microscopie confocale permet de visualiser la répartition des cellules dans les biomatériaux mais aussi l'expression des collagènes de type I, II et X. Pour chaque observation, les réglages de fluorescence sont effectués sur des contrôles négatifs.

Réactifs :

- PKH-26 Red Fluorescent à 1mM (Sigma, France)
- Diluent C (Sigma, France)
- SYTO 16 Green Fluorescent à 1mM (Invitrogen, France)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, France)
- Solution de Bleu de Trypan à 0,4% (Sigma, France)
- Milieu de culture DMEM F12 sans rouge de phénol
- Solution de blocage : 0,5% BSA dans DMEM sans rouge de phénol
- Anticorps primaires et secondaires (**Tableau 11**) dilués 1/50 dans la solution de blocage
- Solution de fixation : Paraformaldéhyde (Sigma, France) à 1% dans tampon PBS

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur
Anti collagène type I	Humain	IgG (Lapin)	Calbiochem
Anti collagène type II	Humain	IgG (Lapin)	Calbiochem
Anti collagène type X	Humain	IgG (Lapin)	Calbiochem
IgG-Alexa Fluor® 488	Lapin	IgG (Chèvre)	Molecular Probes

Tableau 11: Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects.

Les protéines collagéniques présentes dans la matrice néo-synthétisée sont reconnues spécifiquement par un anticorps (anticorps primaire). Un deuxième anticorps (anticorps secondaire), couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488), est dirigé spécifiquement contre le fragment Fc de l'anticorps primaire.

a. Marquage des cellules SYTO16 et PKH-26

Les culots cellulaires, obtenus après trypsination des cellules en monocouche, sont lavés avec une solution de PBS. Le PKH-26 est dilué dans le Diluent C et le SYTO 16 dans du PBS afin d'obtenir, dans les deux cas, une concentration finale de 10µM. Le marquage s'effectue sur le culot cellulaire. Les cellulesensemencées dans l'alginate/Hap sont marquées par PKH-26, marqueur de la membrane cellulaire et émettant une fluorescence rouge. Les cellulesensemencées dans l'alginate/HA sont, quant à elle, marquées par SYTO 16, marqueur des acides nucléiques et émettant une fluorescence verte. Les CSM marquées par PKH-26 et SYTO 16 sont incubées à 37°C, à l'abri de la lumière, respectivement, pendant 5 et 15 min. A l'issue de l'incubation, les cellules sont lavées dans du milieu complet et centrifugées (400g, 10min). Un test de viabilité est effectué grâce au Bleu de Trypan afin d'évaluer l'effet délétère ou non du marquage sur la viabilité des cellules. Ces dernières, une fois marquées, sontensemencées dans leur hydrogel respectif.

Des cylindresensemencés en cellules marquées sont construits comme indiqué dans le paragraphe II-B. Certain d'entre eux sont mis sous compression à J3 et d'autres sont laissés en condition statique pendant 5 jours. Une observation en microscopie confocale est effectuée à J3 et J5 afin d'apprécier la répartition des CSM au sein du biomatériau.

b. Protocole du marquage des collagènes de type I, II et X :

Les cylindres sont lavés dans 500µL de solution de blocage pendant 15min puis sont incubés (45min, température ambiante) avec 100µL de solution contenant l'anticorps primaire. Les échantillons sont lavés dans 500µL de solution de blocage pendant

10min. Ensuite, les échantillons sont incubés dans 100µL de solution d'immunomarquage incluant l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome pendant 45min, puis rincés avec du DMEM sans rouge de phénol pendant 10min. Après 10min de fixation dans 500µL de solution de fixation, les échantillons sont prêts pour être observés en microscopie confocale à balayage layer (Leica TCS SP2-AOBS, Leica Microsystems, Allemagne). Un contrôle isotypique, échantillon incubé avec la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire, est préparé en même temps.

4. Histologie : analyse de la synthèse matricielle

Les colorations à l'HES (Hématoxyline-Erythrosine-Safran), au Rouge Sirius et au Bleu Alcian sont utilisées pour visualiser, respectivement, la morphologie des cellules, les collagènes et les protéoglycannes.

Réactifs:

- Solution de fixation : Paraformaldéhyde 4%, 10mM de CaCl_2 dans un tampon cacodylate (Sigma, France) à 0,1M.
- Solution de lavage : 50 mM de BaCl_2 (Sigma, France) dans un tampon cacodylate à 0,1M.
- Solution d'acide picrique à 0,1% (Prolabo, France) : coloration au Rouge Sirius.
- Solution de bleu Alcian à 0,1% : Bleu Alcian 8GX Gurr (Searle Diagnostic, France)
- Solution d'hématoxyline (0,5%), solution d'éosine (1%), solution de safran (1%)
- Résine de montage Pertex (Baler, France)

Matériel :

- Microscope Leica DMD 108 (Leica, Allemagne)

Protocole :

Les cylindres sont fixés à l'aide d'une solution de fixation pendant 4 heures puis lavés dans une solution de lavage. Ils subissent ensuite une série de déshydratations progressives dans des bains croissants d'alcool. L'alcool est ensuite éliminé par 3 bains de 15 minutes dans du toluène. Les échantillons sont ensuite inclus dans de la paraffine liquide et les blocs se solidifient par diminution de la température. Des coupes de 5µm sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les lames sont ensuite colorées avec un appareil à coloration automatisée (Tissue TekDRS, Sakaura, Japon). Les colorants utilisés sont l'HES, le Rouge

Sirius et le Bleu Alcian. Enfin, les lames sont montées avec la résine synthétique Pertex et observées sous le microscope.

E. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne. Pour chaque étude, un minimum de 3 intra-essais est réalisé. Les différences statistiques entre les groupes d'expérience sont analysées par une analyse de variance de l'ANOVA à une ou deux directions à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test de Bonferroni est effectué et les valeurs p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives statistiquement.

III. Résultats

Au cours de ce travail, nous avons, tout d'abord, validé la faisabilité de construction du biomatériau stratifié. Pour cela, la morphologie du biomatériau, la répartition des cellules, leur viabilité et le cycle cellulaire ont été évalués. Le biomatériau composite contenant des CSM, une caractérisation de ces dernières a été réalisée *via* l'étude de l'expression des marqueurs de surface ainsi que des facteurs de transcription (Sox9 et RunX2). Enfin, une analyse de la synthèse matricielle a été investie par RT-PCRq, histologie et microscopie confocale.

A. Validation du modèle de culture

1. Morphologie du biomatériau stratifié et répartition des cellules au sein du biomatériau

Une coupe histologique du biomatériau stratifié, colorée par HES, est réalisée après 28 jours de culture (**Figure 38**). Sur cette dernière, il est possible de distinguer les cellules au sein des deux couches d'hydrogel ainsi que la présence des MPE. Il apparaît que, quelles que soient les conditions de culture (présence ou non de contraintes mécaniques), les cellules se répartissent de manière homogène au sein de la construction. De plus, aucune dégradation des MPE n'est observée.

Pour visualiser la répartition des cellules dans chaque strate du biomatériau, un marquage par PKH-26 et SYTO 16 est réalisé sur les CSM avant leur inclusion dans l'hydrogel. Ce marquage a permis de suivre les CSM, par microscopie confocale, au cours de la culture. La **figure 39** montre l'émission d'une fluorescence rouge dans la partie inférieure du biomatériau et une fluorescence verte dans la partie supérieure après 3 et 5 jours de culture.

Au-delà du 5^{ème} jour de culture, la fluorescence diminue et ne permet plus de discriminer les cellules. A J3 et J5, une répartition homogène de la fluorescence au sein du biomatériau, en absence et en présence de contraintes mécaniques, est observée sans aucun recouvrement de fluorescence (rouge ou vert) (**Figure 39**).

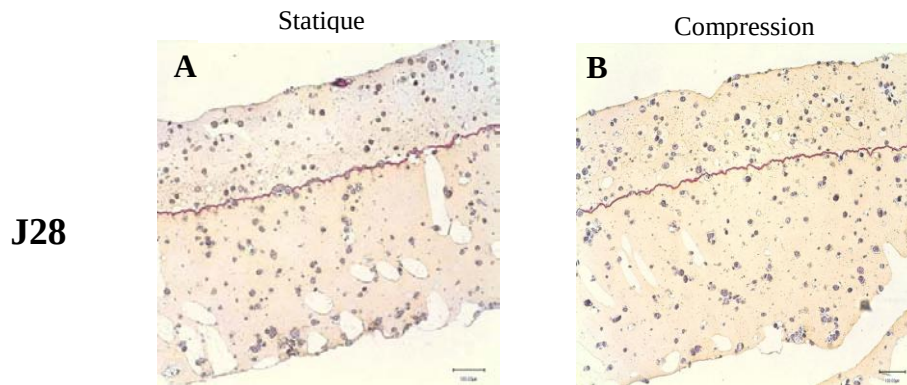


Figure 38: Coupe histologique du biomatériau stratifié à J28, coloré à l'HES.

Observation par microscopie optique, objectif x10. La structure biphasique du biomatériau est conservée au cours du temps aussi bien en condition statique (A) que sous compression (B). Aucune dégradation des MPE n'est observée, après 28 jours de culture, en présence ou non de stimulation mécanique.

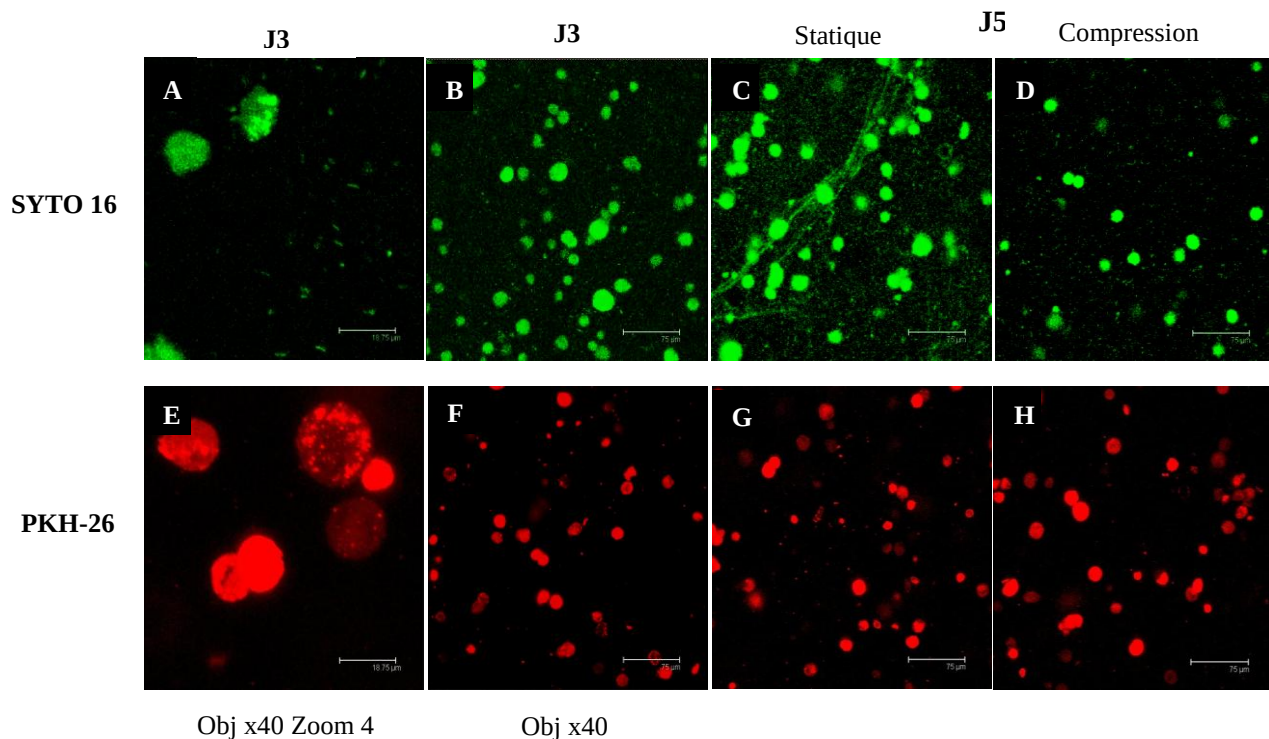


Figure 39: Répartition des cellules au sein du biomatériau.

Observation par microscopie confocale (Leica SP2-AOBS), Objectif 40 (immersion eau, O.N. = 0,8). A, B, C, D : Marquage des acides nucléiques des cellules ensemencées dans des matrices d'Alg/HA par le fluorochrome SYTO16 (fluorescence verte). E, F, G, H : Marquage de la membrane des CSM ensemencées dans des matrices d'Alg/Hap par le fluorochrome PKH-26 (fluorescence rouge).

2. Viabilité cellulaire

La viabilité des CSM est contrôlée, après 3, 14 et 28 jours de culture, en utilisant un kit Vybrant/ApoptosisTM qui permet de distinguer trois populations cellulaires : vivantes, nécrotiques et apoptotiques, en cytométrie en flux.

La **figure 40** représente la viabilité des cellules dans l'intégralité du biomatériau stratifié (**Figure 40-A**) mais aussi dans chaque hydrogel composant le biomatériau stratifié (Alg/HA et Alg/Hap; **figure 40-B**). Après 3 jours de culture, plus de 80% des cellules sont vivantes dans l'ensemble du biomatériau stratifié (**Figure 40-A**). Lorsque les cellules sont maintenues pendant 14 jours de culture, en présence ou non de contraintes mécaniques, la viabilité cellulaire reste toujours supérieure à 80%. En revanche, à J28, il semblerait que la viabilité cellulaire soit plus faible dans les biomatériaux soumis à des contraintes mécaniques que dans ceux maintenus en conditions statiques. Aucune différence significative n'est observée sur la viabilité en fonction de la nature du biomatériau (**Figure 40-B**).

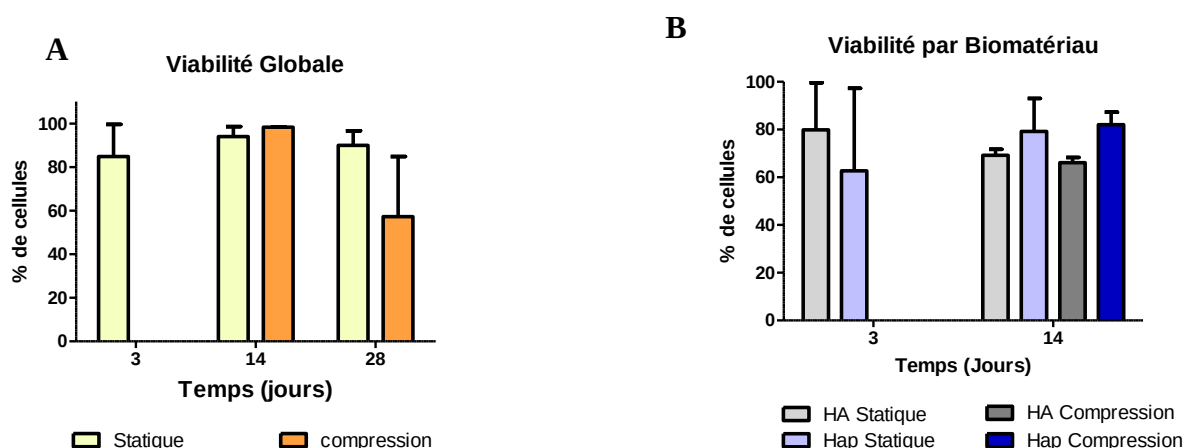


Figure 40: Influence de la contrainte mécanique (A) et de la nature des biomatériaux (B) sur la viabilité cellulaire (Kit Vybrant/ApoptosisTM).

Les résultats, obtenus en cytométrie en flux, sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N=3).

3. Cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire, réalisée par cytométrie en flux, a permis d'identifier si en fonction de la nature du biomatériau et/ou de la contrainte mécanique, les cellules s'engageaient plutôt vers une division cellulaire (phases S et G2/M ; **figure 41-B**) ou plutôt vers un état de quiescence (phase G0/G1 ; **figure 41-A**).

L'évolution du cycle cellulaire, des cellules maintenues dans le biomatériau stratifié, varie en deux temps. Tout d'abord, de J3 à J14 où environ 80% des cellules, maintenues en culture dans des conditions statiques, se trouvent dans un état quiescence. A J28, cette proportion chute à $52 \pm 8\%$ au profit des phases S et G2/M.

Lorsque les biomatériaux composites sont soumis à des contraintes mécaniques, il apparaît, à nouveau une évolution dépendant du temps puisqu'à J14, la contrainte tend à diminuer la proportion de cellules en phase G0/G1 par rapport aux cellules maintenues en conditions statiques ($p < 0,001$). En revanche, à J28, l'effet inverse est observé : la contrainte mécanique limite l'entrée des cellules en phases S et G2/M et augmente la proportion des cellules en phase G0/G1 ($p < 0,001$).

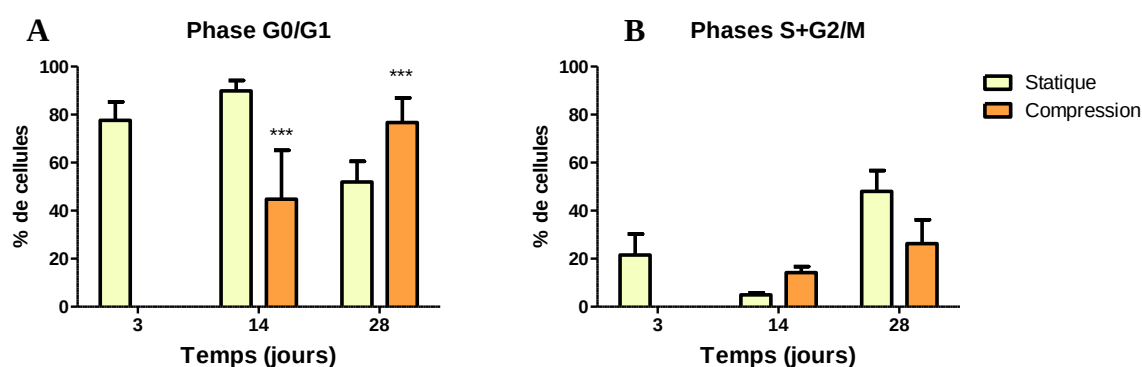


Figure 41: Influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire (A: phase G0/G1 et B: phases S+G2/M) des CSM maintenues dans le biomatériau composite.

Les résultats, obtenus en cytométrie en flux, sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N=3).

B. Caractérisation des cellules

La caractérisation des CSM, soit par l'étude de l'expression des marqueurs de surface, soit par l'analyse de l'expression de facteurs de transcription, permet de suivre la différenciation chondrocytaire de ces cellules.

1. Immunophénotypage

L'immunophénotypage des CSM est réalisé par immunomarquage direct et par cytométrie en flux. Il permet d'analyser la proportion de cellules exprimant un marqueur de surface caractérisant les CSM. Ce test est réalisé sur les cellules en monocouche et sur les cellules ensemencées dans l'hydrogel.

a. Exclusion de certains marqueurs de surface

Sur la **figure 42** sont représentés des histogrammes de fluorescence obtenus lors de l'analyse des marqueurs de surface CD34, CD45 et HLA-DR. L'histogramme blanc représente l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique. L'histogramme coloré représente l'IMF obtenue lors de l'analyse des échantillons cellulaires. La superposition de ces deux histogrammes montre que les CSM n'expriment ni les marqueurs CD34 et CD45 (**Figure 42-A et 42-B**) ni l'antigène HLA-DR (**Figure 42-C**).

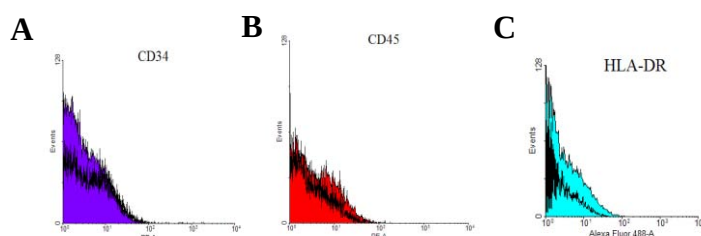


Figure 42: Expression des marqueurs CD34, CD45, (A et B) et HLA-DR (C) à la surface des CSM (CMF).

L'histogramme blanc représente l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique (PE ou FITC). L'histogramme coloré représente l'IMF obtenue lors de l'analyse des échantillons cellulaires.

b. Expression des marqueurs de surface en monocouche et en structure tridimensionnelle

La **figure 43** représente la proportion de cellules exprimant les marqueurs CD166 (**Figure 43-A**), CD105 (**Figure 43-B**), CD44 (**Figure 43-C**) et CD73 (**Figure 43-D**) à

l'issue de la culture en monocouche (P3) ou en structure tridimensionnelle (après 3 jours de culture). Il apparaît que l'expression des marqueurs CD166, CD105 et CD44 diminue, de manière significative, lorsque les cellules se trouvent dans une matrice tridimensionnelle par rapport à la culture en monocouche (respectivement **figure 43-A, -B et -C**). En revanche, la proportion de cellules exprimant le marqueur CD73 augmente significativement en culture tridimensionnelle par rapport à la culture en monocouche (**Figure 43-D**).

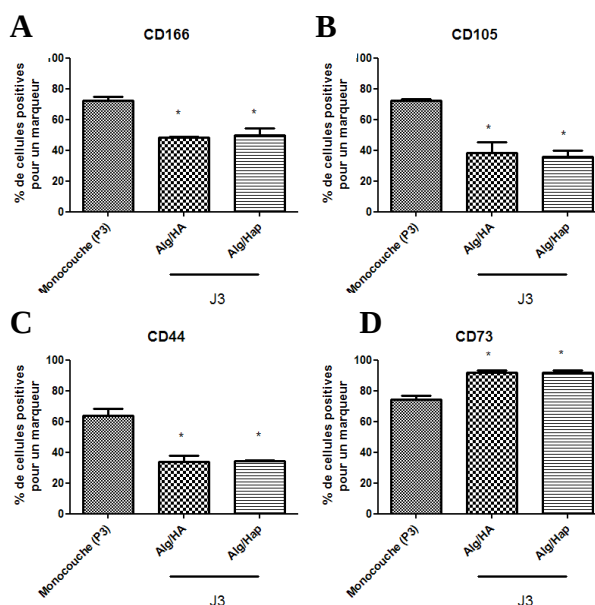


Figure 43: Analyse phénotypique des CSM cultivées en monocouche (P3) ou après 3 jours de culture dans une structure tridimensionnelle (Alg/HA et Alg/Hap).

Les cellules sont incubées en présence d'anticorps anti-CD166 (A), anti-CD105 (B), anti-CD44 (C) et anti-CD73 (D) et sont analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. N=4, * $p < 0.05$ Alg/HA et Alg/Hap versus Monocouche.

c. Influence de la contrainte mécanique et de la nature du biomatériau

La figure 43 représente l'influence de la contrainte mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression des marqueurs CD73 (**Figure 44-A**) et CD166 (**Figure 44-B**), après 3, 14 et 28 jours de culture.

Pour un même temps de culture, aucune différence significative n'est observée concernant l'influence de la contrainte et/ou la nature du biomatériau sur la proportion des cellules CD73⁺. Par contre, l'expression de ce marqueur tend à diminuer entre J14 et J28.

Pour le marqueur CD166, il apparaît que, lorsque les cellules sont soumises à des contraintes mécaniques, la proportion de cellules CD166⁺ augmente, quelle que soit la

nature du biomatériau. Cette différence est d'autant plus importante, à J14, pour des CSM maintenues dans un biomatériau enrichi en Hap.

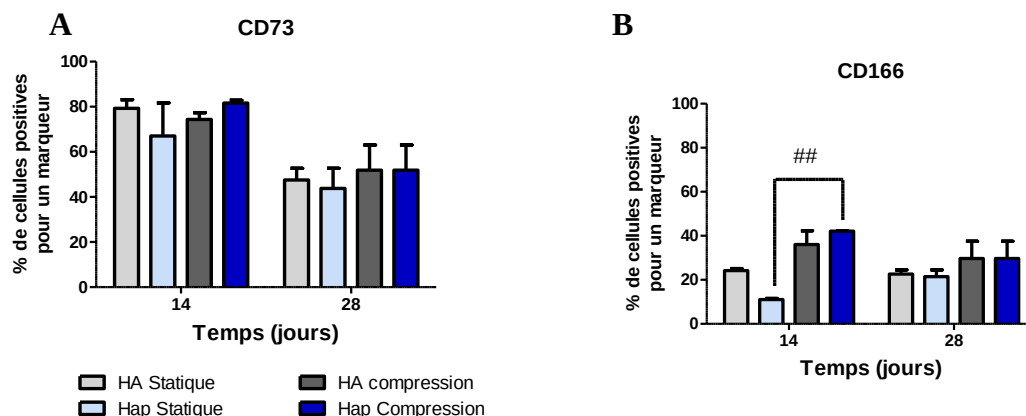


Figure 44: Influence de la contrainte mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression des marqueurs CD73 (A) et CD166 (B).

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. N=3, ## $p < 0,01$, contrainte mécanique versus condition statique.

2. Expression des facteurs de transcription

L'expression génique des facteurs de transcription Sox9 et Runx2 est analysée par la technique de RT-PCRq (respectivement **figure 45-A** et **figure 45-B**).

Après 14 jours de culture, en condition statique, la seule tendance observée concerne le facteur de transcription RunX2 qui semble davantage exprimé dans une matrice d'Alg/Hap que dans une matrice Alg/HA. Sous contraintes mécaniques, seule l'expression du gène codant pour Sox9 semble augmentée dans une matrice d'Alg/HA.

Après 28 jours de culture, en condition statique, la nature du biomatériau n'a aucune influence sur l'expression génique de Sox9 et de RunX2. En revanche, des différences sont observées sous contraintes mécaniques ; Sox9 étant surexprimé dans une matrice d'Alg/Hap et RunX2 dans une matrice d'Alg/HA.

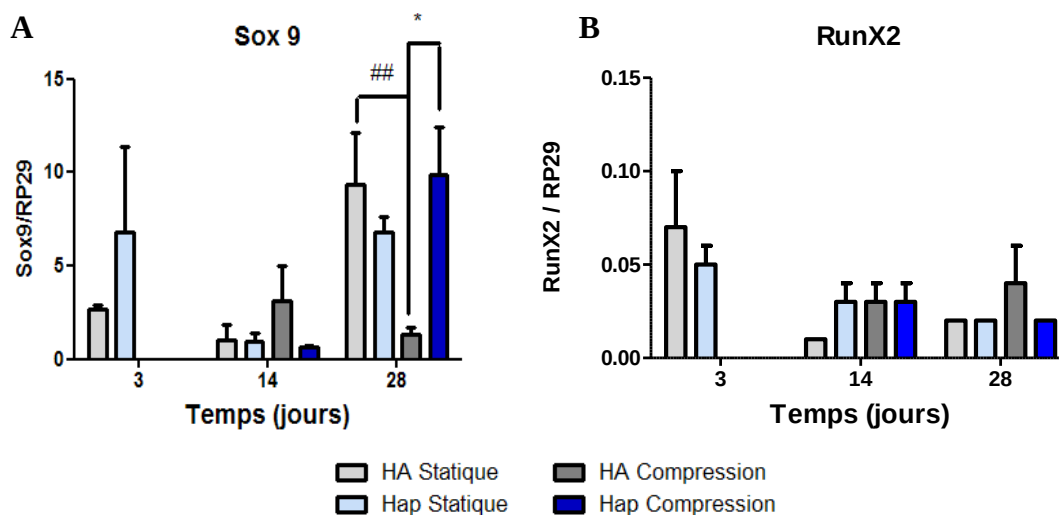


Figure 45: Influence de la stimulation mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression génique de Sox9 (A) et de RunX2 (B), après 3, 14 et 28 jours de culture.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $N=3$, ## $p<0,01$, contrainte mécanique versus condition statique et * $p<0,05$ Hap versus HA.

C. Evaluation de la synthèse matricielle

L'activité de synthèse des cellules est évaluée à différents stades :

- Au stade précoce : l'expression de certains gènes d'intérêt est analysée par RT-PCRq, après 3, 14 et 28 jours de culture.
- A un stade plus avancé : la synthèse de certaines protéines d'intérêt est évaluée par des coupes histologiques et par immunomarquage indirect suivi d'une observation en microscopie confocale. Ceci après 28 jours de culture.

1. Expression de gènes d'intérêt

La **figure 46** illustre l'influence de la stimulation mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression de gènes codant pour les protéines d'intérêt exprimés par les cellules au cours de la chondrogénèse, après 3, 14 et 28 jours de culture. Les gènes étudiés codent pour le collagène de type II (**Figure 46-A**), les agrécannes (**Figure 46-B**) et la COMP (**Figure 46-C**), caractéristiques du chondrocyte. Le gène codant pour le collagène de type I (**Figure 46-D**) est caractéristique de la CSM. Enfin, les gènes codant pour le collagène de type X (**Figure 46-E**) et la MMP13 (**Figure 46-F**) sont caractéristiques du chondrocyte hypertrophique.

Une augmentation, au cours du temps, de l'expression des gènes codant pour le collagène de type II, les agrécannes, la COMP, le collagène de type X et MMP13 est observée

en condition statique et dans une matrice d'Alg/HA. Cette tendance est inversée avec le gène codant pour le collagène de type I où son expression diminue au cours du temps. Aucune différence significative n'est observée sur l'expression génique en condition statique et entre les biomatériaux sauf à J14 où l'expression du gène codant pour les agrécannes augmente de façon significative dans une matrice Alg/Hap par rapport à une matrice Alg/HA ($p<0,05$).

L'apport de contraintes mécaniques augmente significativement l'expression génique du collagène de type II (**Figure 46-A**) et des agrécannes (**Figure 46-B**) à J14 et de la COMP (**Figure 46-C**) à J28. L'expression génique du collagène de type I (**Figure 46-D**) poursuit sa tendance à diminuer au cours du temps et sous stimulation mécanique. Ces variations liées à la contrainte mécanique sont observées quelle que soit la nature du biomatériau.

En ce qui concerne, l'expression génique du collagène de type X (**Figure 46-E**), aucune différence n'est observée après 14 jours de culture. En revanche, à J28 et en condition statique, cette expression est augmentée dans des matrices d'Alg/Hap par rapport aux matrices d'Alg/HA. Cette augmentation se confirme, de façon significative, sous contraintes mécaniques ($p<0,001$).

Enfin, peu de différences sont observées pour l'expression génique de MMP13 en fonction des conditions de culture.

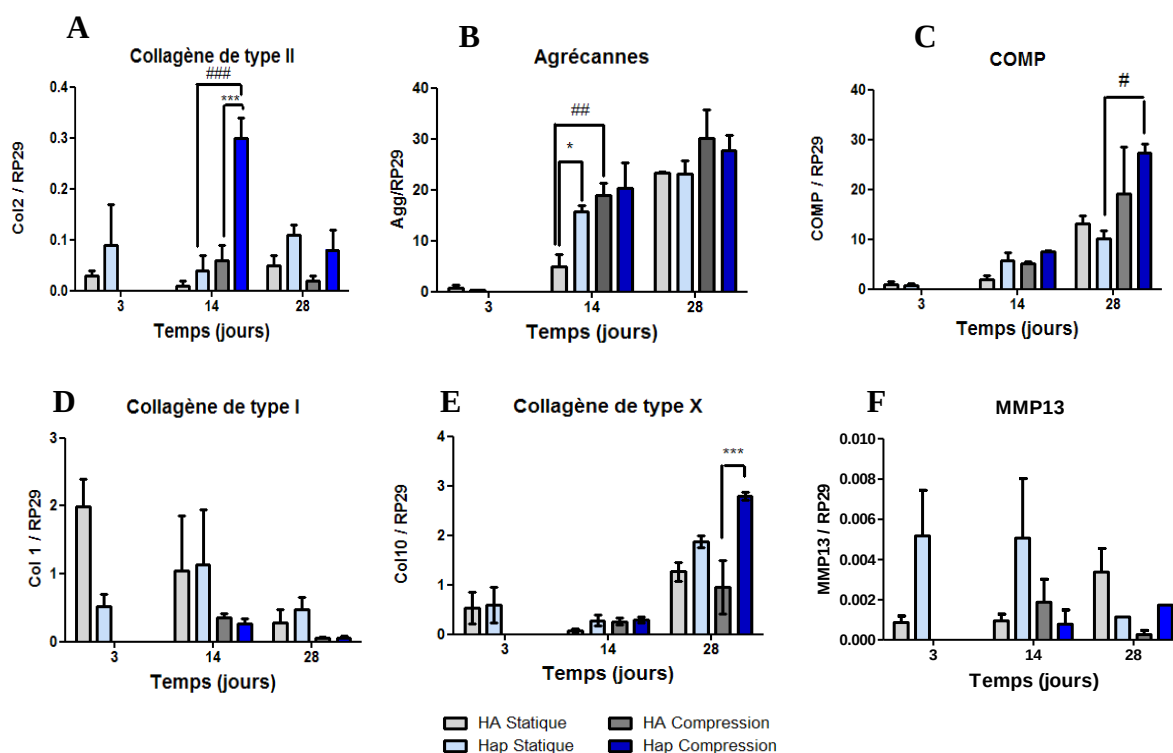


Figure 46: Influence de la stimulation mécanique et de la nature du biomatériau sur l'expression de gènes codant pour les protéines d'intérêt exprimées par les MSC au cours de la chondrogénèse, après 3, 14 et 28 jours de culture.

Les gènes codant pour le collagène de type II (A), les agrécanes (B) et la COMP (C) sont caractéristiques du chondrocyte. Le gène codant pour le collagène de type I (D) est caractéristique de la CSM. Enfin, les gènes codant pour le collagène de type X (E) et la MMP13 (F) sont caractéristiques du chondrocyte hypertrophique. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $N=3$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, contrainte mécanique versus condition statique et * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ Hap versus HA.

2. Analyse de la synthèse matricielle

Les colorations au Rouge Sirius et au Bleu Alcian sont utilisées pour visualiser respectivement la synthèse des collagènes totaux et des protéoglycannes au sein du biomatériau. La figure 46 illustre l'influence de la contrainte mécanique sur la synthèse des protéoglycannes et des collagènes totaux, après 28 jours de culture. Si aucune différence de synthèse en protéoglycannes n'est observée entre les cellules maintenues en conditions statiques et celles sous compression (**Figure 47-A** et **figure 47-B**), une augmentation de la synthèse des collagènes totaux est observée sous contraintes mécaniques (**Figure 47-D**) par rapport aux conditions statiques (**Figure 47-C**). Cette augmentation de synthèse est essentiellement péricellulaire.

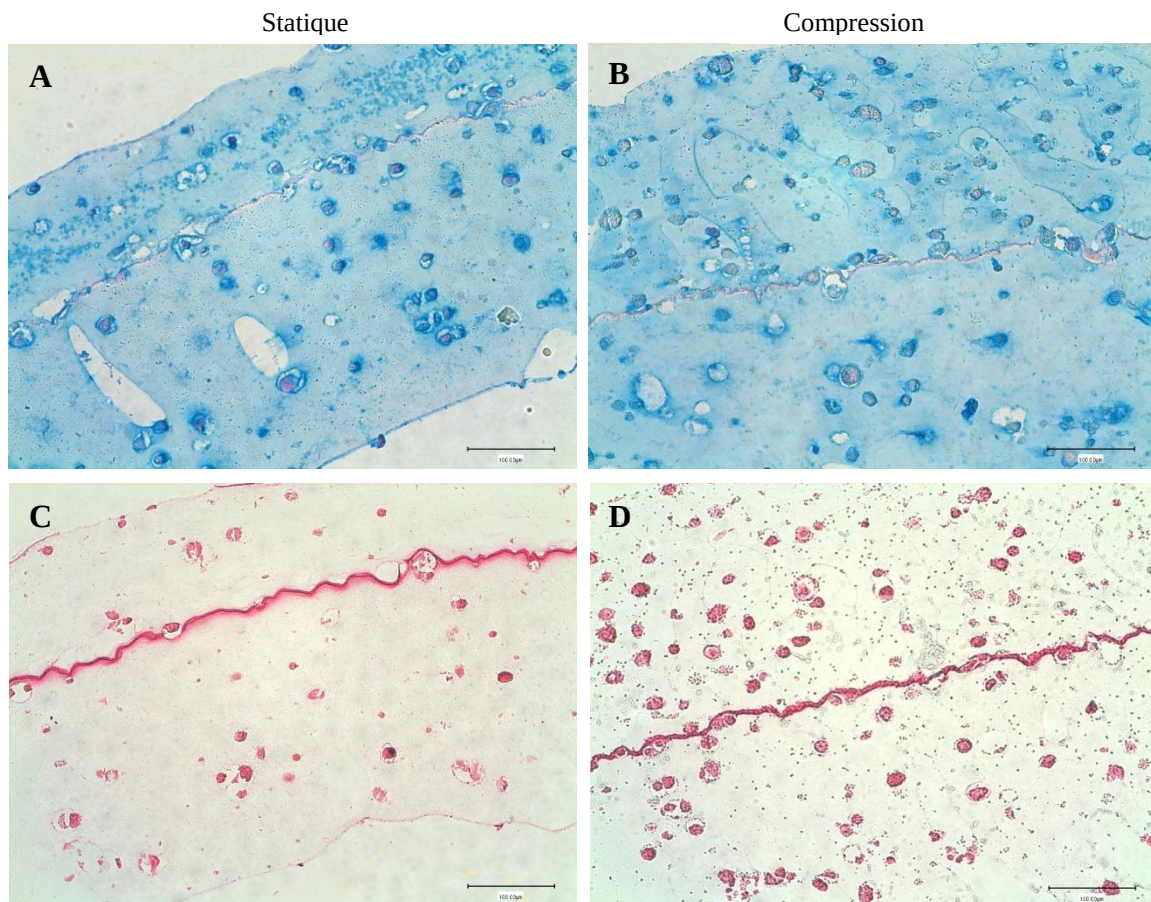


Figure 47: Influence de la contrainte mécanique sur la synthèse des protéoglycannes et des collagènes totaux, après 28 jours de culture.

Etude réalisée par la coloration au Bleu Alcian (coloration des protéoglycannes) (A et B) et au Rouge Sirius (coloration des collagènes totaux) (C et D). (Objectif x20). Aucune différence de synthèse en protéoglycannes n'est observée entre la condition statique et sous compression (respectivement figures A et B). En revanche, une augmentation de la synthèse des collagènes totaux est observée sous contrainte (D) par rapport à la condition statique (C).

Afin d'affiner l'incidence de la compression dynamique intermittente ainsi que la nature du biomatériau sur l'expression des protéines collagéniques, une analyse de l'expression des collagènes de type I, II et X est réalisée par immunomarquage indirect puis observation du biomatériau par microscopie confocale, après 28 jours de culture (**Figure 48**).

Il semblerait, tout d'abord, qu'en absence de contrainte mécanique, les collagènes de type I, II et X soient peu exprimés par les CSM ensemencées dans les hydrogels d'Alg/HA et d'Alg/Hap (**Figures 48-A, -B, -E, -F, -I, -J**).

En revanche, sous contraintes mécaniques, l'expression des collagènes de type I et II est plus importante dans des biomatériaux enrichis en HA que dans ceux enrichis en Hap (**Figures 48-D et 22-H**).

Enfin, en ce qui concerne la synthèse du collagène de type X, marqueur caractéristique du chondrocyte hypertrophique, cette protéine est largement surexprimée par des CSM incluses dans des biomatériaux enrichis en Hap et sous contraintes mécaniques par rapport aux autres conditions de culture (**Figure 48-K**).

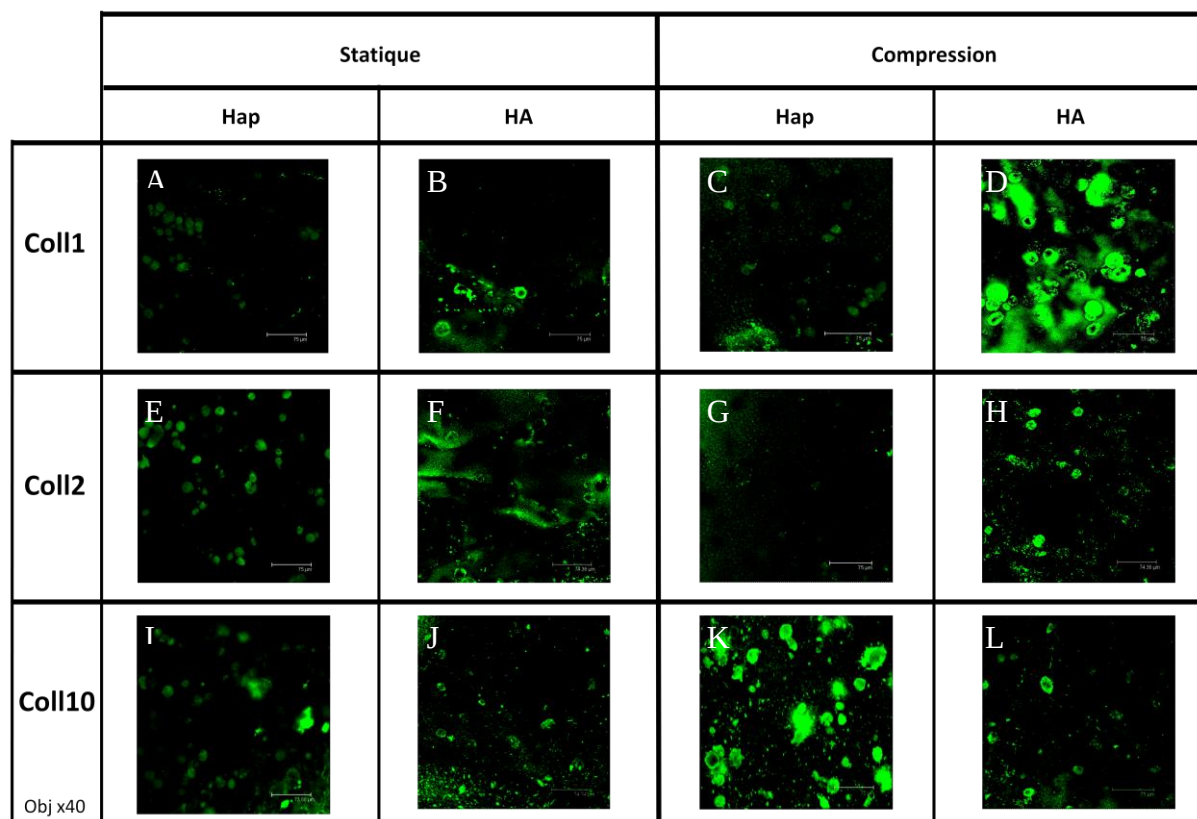


Figure 48: Influence de la nature du biomatériau et de la contrainte mécanique sur la synthèse des collagènes I, II et X.

Etude réalisée par immunofluorescence indirecte et observation par microscopie confocale (Leica SP2-AOBS, objectif x40, immersion eau, O.N = 0,8). Aucune différence de synthèse protéique entre les deux biomatériaux n'est observée en condition statique (A, B, E, F, I, J). En revanche, sous compression, une augmentation de la synthèse de collagène de type I et II dans les matrices d'Alg/HA est observée par rapport aux matrices d'Alg/Hap (D et H). La synthèse du collagène de type X est plus importante dans des matrices d'Alg/Hap soumises à une contrainte mécanique par rapport à la condition statique et aux matrices d'Alg/HA (K).

IV. Discussion et perspectives

A. Discussion

L'ingénierie tissulaire du cartilage a pour but de synthétiser un tissu *de novo*. Les cellules sontensemencées dans une matrice tuteur et l'ensemble est fonctionnalisé par facteur biochimique et/ou mécanique (Chung and Burdick, 2008). Cependant, très peu d'études proposent des constructions tridimensionnelles capables de reproduire l'architecture zonale du cartilage.

L'objectif de ce travail consiste à réaliser un biomatériau stratifié et fonctionnalisé par contraintes mécaniques. L'architecture stratifiée du biomatériau est basée sur l'empilement successif de couches d'hydrogels d'alginate et de multicouches de polyélectrolytes (PLL/HA). La couche inférieure du biomatériau stratifié, devant mimer la couche la plus profonde du cartilage, est composée d'alginate enrichi en un composant naturel de l'os : l'hydroxyapatite tandis que la couche supérieure du biomatériau, doit mimer la couche superficielle du cartilage et se compose d'alginate enrichi en hyaluronate de sodium.

Dans le cadre de ce travail, la première étape a été de valider le biomatériau stratifié comme modèle de culture lorsque des CSM étaient ensemencées dans chaque hydrogel. Puis, à travers une caractérisation phénotypique des cellules ainsi que l'analyse de leur synthèse matricielle, nous avons voulu savoir si la fonctionnalisation par contraintes mécaniques pouvait guider la différenciation des CSM soit vers un phénotype chondrocytaire (pour les CSM maintenues dans les matrices d'Alg/HA) soit en chondrocytes hypertrophiques (pour les CSM maintenues dans les matrices d'Alg/Hap).

Après 28 jours de culture, **le biomatériau composite comporte deux parties distinctes, d'épaisseurs différentes**. Compte tenu des volumes d'hydrogels pulvérisés, la partie la plus fine correspond à l'hydrogel d'Alg/HA tandis que la partie la plus épaisse correspond à l'hydrogel d'Alg/Hap. La démarcation des deux strates se visualise grâce à la présence des MPE jusqu'à 28 jours de culture avec ou sans contraintes mécaniques. Aucune dégradation des multicouches de PLL/HA n'est alors observée, contrairement à ce qui a été rapporté par Garza et al. En effet ces auteurs ont constaté que lorsque des CSM étaient déposées sur des multicouches de PLL/HA, ces cellules étaient capables de dégrader les MPE après 5 jours de culture (Garza et al., 2005). Le modèle de culture tridimensionnel, proposé

dans notre travail, dans lequel les cellules ne sont pas directement en contact avec les MPE explique certainement les résultats obtenus.

Par ailleurs, les cellules semblent réparties de manière homogène dans chacune des strates composant le biomatériau. Comme l'ont déjà rapporté Tritz et al, le procédé de fabrication des hydrogels par pulvérisation permet une répartition homogène des cellules, ce qui pourrait favoriser la différenciation cellulaire (Tritz et al., 2010). Cette homogénéité des cellules dans chaque strate du biomatériau est confirmée lors de l'observation des CSM par microscopie confocale. Ainsi, en marquant les CSM incluses dans l'Alg/HA par le SYTO16 (marqueur des acides nucléiques) et les CSM incluses dans l'Alg/Hap par le pKH26 (marqueur membranaire), il a été possible de suivre, sur un même biomatériau, la répartition des CSM dans le temps et en fonction des conditions de culture. Ainsi, les cellules présentes dans l'Alg/HA émettent une fluorescence verte tandis que les cellules incluses dans l'Alg/Hap émettent une fluorescence rouge. La cinétique n'a été réalisée que sur 5 jours de culture car au-delà, la fluorescence diminuant, il était devenu difficile de visualiser les cellules. Les observations réalisées ont mis en évidence, qu'à la jonction des deux biomatériaux, au niveau des MPE, aucune fluorescence verte n'était observée dans l'hydrogel d'Alg/Hap et inversement dans l'hydrogel d'Alg/HA. Il apparaît alors qu'aucune migration des cellules à travers les MPE n'a eu lieu que se soit en présence ou absence de stimulation mécanique.

A l'issue du 3^{ème}, 14^{ème} et 28^{ème} jour de culture, la **viabilité des cellules** a été mesurée, par cytométrie en flux. Quelle que soit la nature du biomatériau, la technique de pulvérisation n'est pas délétère pour les CSM puisqu'en condition statique plus de 80% des cellules sont vivantes. L'excellente viabilité des cellules, en condition statique, à J3, J14 et J28, témoigne d'un environnement tridimensionnel favorable pour ces dernières. En effet, il est connu que les hydrogels à base d'alginate favorisent, grâce à leur porosité, les échanges entre les cellules et la diffusion de macromolécules, constituant ainsi un véritable milieu opportun pour les cellules (Puppi et al., 2010). La nature du biomatériau n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire puisque cette dernière reste satisfaisante aussi bien dans les hydrogels d'Alg/HA que d'Alg/Hap. Ces deux composés étant des éléments naturels retrouvés au niveau de l'organisme (cartilage et os), ils présentent une bonne cyto-compatibilité (Puppi et al., 2010).

Lorsque les cellules sont soumises à une contrainte dynamique et intermittente, la viabilité se maintient à plus de 80% après 14 jours de culture et à plus de 60% après 28 jours de culture.

Sur les cellules vivantes, une **analyse du cycle cellulaire** a été réalisée afin d'évaluer l'activité proliférative des cellules. Si à J3, 20% des cellules se trouvent dans une phase de synthèse d'ADN ou de mitose, à J14 et en absence de stimulation mécanique, les cellules, préférentiellement en phase G0/G1, ont une activité proliférative qui diminue. Cela peut conduire les cellules à une sortie temporaire du cycle cellulaire (état de repos) ou à une sortie définitive (différenciation ou sénescence). Compte tenu de la proportion de cellules vivantes, à J14, la sénescence des cellules est à exclure. L'ajout de stimulation mécanique, à J14, semble limiter l'entrée des cellules en phase de quiescence. A J28, il semblerait que les cellules soient plus actives compte tenu de l'augmentation de la proportion de cellules en phase S/G2/M en présence ou non de stimulation mécanique.

La caractérisation des CSM a, ensuite, été réalisée à la fois, par l'étude de l'expression des marqueurs de surface et par l'analyse de l'expression de Sox9 et RunX2, caractérisant, respectivement la différenciation chondrocytaire et la différenciation terminale (chondrocyte hypertrophique) (Vinatier et al., 2009).

A l'issue de la culture en monocouche et avant d'inclure les CSM dans les hydrogels, un immunophénotypage a permis de s'assurer que les cellules étaient bien positives pour les marqueurs caractérisant les CSM à savoir CD73 (SH3 et SH4), CD105 (SH2), CD44, CD90 (Thy-1) et CD166 et négatifs pour les marqueurs hématopoïétiques (CD34 et CD45) ou encore pour l'antigène HLA-DR. L'analyse de ce dernier fait partie du contrôle qualité auquel les CSM sont soumises en vu de leur potentielle application clinique.

Lorsque les CSM sontensemencées dans une matrice tridimensionnelle, l'expression des marqueurs étudiés diminue par rapport à la culture en monocouche : dès J3 pour CD166, CD105 et CD44 et à partir de J14 pour CD73. Chacun de ces marqueurs caractérisant le potentiel indifférencié des CSM, cette diminution d'expression traduirait une entrée des CSM dans une voie de différenciation (Lee et al., 2009). Il apparaît également que, tout au long de la culture, la nature du biomatériau ne semble pas influencer le phénotype des CSM.

L'engagement des CSM dans une voie de différenciation se confirme avec l'étude de l'expression des facteurs de transcription Sox9, RunX2 ainsi que des gènes d'intérêt. Après 14 jours de culture, en condition statique, une différenciation des CSM est observée, dans les hydrogels enrichis en Hap, impliquant le facteur de transcription RunX2 ainsi que l'expression des gènes ColIII, Agrécanne, COMP, ColX et MMP13. L'apport de stimulations

mécaniques, sur ces biomatériaux n'a en revanche peu ou pas d'effet. L'évolution inverse est observée pour les CSM ensemencées dans des hydrogels enrichis en HA : seule la compression dynamique et intermittente induit une augmentation des gènes étudiés en particulier de Sox9, Agrécanne et COMP. **La nature du biomatériau possède donc une influence sur l'orientation de la différenciation des cellules.** Ainsi, après 14 jours de culture, les CSM ont tendance à se différencier, en condition statique, plutôt dans une matrice enrichie en Hap alors que sous contraintes mécaniques, ces dernières se différencient dans une matrice enrichie en HA.

Rappelons cependant qu'un des objectifs de ce travail est de savoir si, dans le biomatériau stratifié, la fonctionnalisation par contraintes mécaniques peut guider la différenciation des CSM vers un phénotype chondrocytaire (pour les CSM maintenues dans les matrices d'Alg/HA) et vers des chondrocytes hypertrophiques (pour les CSM maintenues dans les matrices d'Alg/Hap). D'après les résultats obtenus à J14, cet objectif ne peut être atteint.

Si la culture des biomatériaux composites est poursuivie pendant 28 jours, il apparaît qu'en condition statique, comme à J14, la différenciation des CSM est plus favorable lorsque celles-ci sont maintenues dans une matrice d'Alg/Hap. En revanche, la sollicitation mécanique semble avoir une action non seulement sur les CSM maintenues dans une matrice d'Alg/HA mais aussi sur celles maintenues dans une matrice d'Alg/Hap. En effet, dans la matrice d'Alg/HA, une augmentation de l'expression des gènes RunX2, agrécanne ainsi qu'une diminution des gènes codant pour le colI et MMP13 est observée. Dans les matrices d'Alg/Hap, l'expression des gènes codant pour Sox9, COMP, ColX et MMP13 se trouve surexprimée. Ces derniers résultats sont en accord avec ceux récemment publiés par Kupcsik et al qui ont montré, que la stimulation mécanique pouvait conjointement augmenter les expressions de Sox9, ColX et de la COMP (Kupcsik et al., 2010).

L'**analyse de la synthèse matricielle** vient confirmer les résultats obtenus au niveau génique. L'observation des collagènes totaux, par histologie, et après 28 jours de culture montre une augmentation de ces protéines sous contraintes mécaniques. L'analyse plus fine de la synthèse des collagènes de type I, II et X par immunomarquage indirect montre clairement que si en absence de contrainte mécanique, peu de différence n'est observée entre les biomatériaux ; sous contraintes mécaniques, les matrices enrichies en HA synthétisent préférentiellement du collagène de type II tandis que dans les matrices enrichies en Hap synthétisent plus de collagène de type X.

L'ensemble de ces données montrent qu'à J28, dans un même biomatériau composite, les CSMs peuvent s'engager dans deux voies de différenciation différentes, sous contraintes mécaniques et en fonction de la nature des différentes strates du biomatériau. Selon Wang et al, la composition du biomatériau peut influencer la synthèse de la matrice extracellulaire (Wang et al., 2010). Nos résultats indiquent que cet effet dû à la composition du biomatériau est potentialisé par l'apport de contrainte mécanique.

B. Conclusion et perspectives

Dans un premier temps, cette étude a permis de démontrer la possibilité de réaliser, par pulvérisation alternative, un biomatériau stratifié composé d'hydrogels d'alginate enrichi en HA et en Hap, et séparés par des multicouches de polyélectrolytes. Cette construction a montré une bonne stabilité structurelle au cours du temps.

Dans un second temps, la fonctionnalisation des biomatériaux stratifiés a été réalisée par compression dynamique et intermittente. Il en ressort, qu'après un temps de culture de 28 jours et uniquement en présence de contraintes mécaniques, dans un même biomatériau composite, il est possible d'orienter les CSM vers deux voies de différenciation différentes en fonction de la nature des différentes strates du biomatériau : l'hydrogel enrichi en Hap tend plutôt à orienter les CSM vers un phénotype de chondrocyte hypertrophique tandis que celui enrichi en HA permet la synthèse de marqueur caractérisant un phénotype chondrocytaire.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Tout d'abord, il serait intéressant d'affiner la construction du biomatériau stratifié en réalisant une construction à trois ou quatre couches. De cette façon, le biomatériau se rapprocherait davantage de la structure zonale du cartilage physiologique.

Il serait, également, nécessaire d'optimiser les paramètres de la contrainte mécanique. En effet, les paramètres utilisés pour notre étude sont ceux utilisés précédemment par Y. Wang, durant sa thèse au sein du laboratoire en 2007. Ces derniers étaient appliqués à un biomatériau composé d'Alg/HA. Il conviendrait d'adapter ces paramètres à un biomatériau composite, à la fois composé d'Alg/HA et d'Alg/Hap. Cette optimisation des paramètres de stimulation mécanique permettrait probablement de pallier la diminution de viabilité cellulaire observée après 28 jours de culture et sous contraintes mécaniques.

Ensuite, il serait pertinent d'utiliser les MPE comme un réservoir de molécules actives contenant par exemple des facteurs de croissance. Cette approche a été récemment étudiée par

Grossin et al, en utilisant des mélanocytes ensemencés dans un hydrogel d'alginate (Grossin et al., 2009). Ainsi, la fonctionnalisation du biomatériau, à la fois par contraintes mécaniques et par l'apport de facteurs biochimiques, pourrait améliorer la synthèse matricielle et la rendre plus fonctionnelle.

Enfin, dans des perspectives à plus long terme, il serait intéressant de réaliser des essais pré-cliniques, en implantant cette matrice support composite dans un modèle animal présentant des lésions cartilagineuses. Ainsi, la biocompatibilité et la biofonctionnalité de cette construction, pourront être évaluées *in vivo*.

CONCLUSIONS ET

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Aujourd'hui, les cellules souches offrent de belles perspectives en tant que nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment dans le domaine de la médecine régénératrice. De l'embryon à l'Homme adulte, les sources de cellules souches sont multiples. Mais selon leur origine, ces cellules n'ont pas toutes les mêmes capacités de différenciation. Les cellules souches pluripotentes seraient capables de remplacer tous les types cellulaires de l'organisme. Aussi, de par leur fort pouvoir de multiplication, il serait alors possible de traiter un grand nombre de patients. Cependant, certaines de ces cellules (les CSE) se heurtent, en France, à des considérations d'ordres éthiques qui limitent considérablement leur utilisation. Une autre population de cellules souches pluripotentes (les iPS) suscite beaucoup d'intérêt. Toutefois, une meilleure connaissance de leur mode d'obtention sera nécessaire avant de les utiliser en clinique. Les scientifiques et les cliniciens se sont alors tournés vers d'autres populations cellulaires : les cellules souches multipotentes que sont les CSM et les CSH. Ces dernières ont déjà démontré leur intérêt clinique dans des indications hématologiques. Les CSM, quant à elles, de par leurs propriétés de réparation tissulaire et d'immunomodulation, représenteraient d'excellentes candidates à la thérapie cellulaire et à l'ingénierie tissulaire, dans de nombreuses indications.

Avant d'envisager une thérapie cellulaire, utilisant des cellules souches, à grande échelle, de nombreuses avancées dans certains domaines (scientifiques, médicaux, éthiques, réglementaires, etc.) devront être réalisées. Il sera important de connaître le mécanisme d'action des cellules souches *in vivo* et notamment, le rôle des CSM dans la réparation tissulaire. Ce mécanisme d'action a longtemps été envisagé sous l'angle du remplacement de cellules déficientes par différenciation des CSM. Aujourd'hui, certains auteurs mettent en avant les propriétés trophiques des CSM, c'est-à-dire leur capacité à moduler les signaux de l'environnement dans lequel elles se trouvent, pour expliquer, en partie, le phénomène de réparation tissulaire (Martinaud et al., 2010). Ensuite, il sera indispensable de garantir une sécurité clinique de ces cellules souches. Ces dernières seront soumises à un contrôle qualité très strict de façon à libérer des lots de cellules souches de grade clinique. Cette libération d'un produit thérapeutique à base de cellules souches pourrait être réalisée sous la responsabilité d'un pharmacien. L'approche la plus réaliste, en terme de santé publique, serait de constituer des banques de cellules souches, constituant ainsi, une source cellulaire constamment disponible et permettant de traiter un grand nombre de patients. Enfin, si l'utilité

clinique des cellules souches, et plus particulièrement des CSM, est confirmée, un encadrement juridique spécifique de ces cellules sera nécessaire.

L'ingénierie tissulaire du cartilage tente d'apporter de nouvelles stratégies thérapeutiques aux lésions cartilagineuses. Dans ce domaine, les CSM ont montré leur intérêt et représentent une véritable alternative aux chondrocytes autologues. Nos travaux ont permis de démontrer, dans un même biomatériau stratifié, qu'il est possible d'orienter les CSM vers deux voies de différenciation différentes en fonction de la nature de la matrice dans laquelle sont ensemencées les cellules. Cet effet est potentialisé par l'apport de contraintes mécaniques et après 28 jours de culture. L'environnement (composition chimique et stimulations mécaniques) dans lequel se trouvent les CSM a donc une influence directe sur le phénotype chondrocytaire de ces dernières. L'interaction entre les CSM et les molécules de la matrice (HA ou Hap), ainsi que la stimulation mécanique du biomatériau, semblent activer des voies de transduction intracellulaire influençant le comportement des cellules. Cette étude a été réalisée *in vitro* et par conséquent, elle ne reflète pas parfaitement l'environnement physiologique du cartilage. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la biofonctionnalité de ce biomatériau stratifié *in vivo* sur un modèle animal. Par la suite, il serait nécessaire de développer un biomatériau stratifié à trois ou quatre couches de façon à se rapprocher le plus possible de l'organisation zonale du cartilage. Cette perspective permettrait une réparation complète des lésions profondes du tissu cartilagineux. Enfin, il serait pertinent d'associer aux contraintes mécaniques, une fonctionnalisation supplémentaire par l'apport de facteurs de croissance, dans le but d'améliorer la synthèse d'un néo-tissu cartilagineux fonctionnel.

Aujourd'hui, une grande majorité des CSM utilisées en thérapie cellulaire ou en ingénierie tissulaire sont issues de la moelle osseuse. Cependant, depuis quelques années, des scientifiques ont montré que des CSM prélevées à partir d'une moelle osseuse d'un sujet âgé, présentaient des capacités de prolifération et de différenciation *in vitro* diminuées (Kretlow et al., 2008). C'est la raison pour laquelle, les chercheurs se sont tournés vers une autre source de CSM : la gelée de Wharton du cordon ombilical. Ces cellules présenteraient des capacités de prolifération, de différenciation et d'immunomodulation, supérieures aux cellules de la moelle osseuse. De plus, leur isolement est relativement facile puisque dans ce cas précis, le cordon ombilical est considéré comme un déchet opératoire. Par conséquent, il s'agit d'une source potentiellement illimitée de cellules qui pourrait permettre de réaliser des lots, de grade clinique, stockés dans des banques de cellules. Toutefois, beaucoup de travaux restent encore à effectuer sur ces cellules avant d'envisager leur potentielle utilisation clinique. L'objet de la

thèse d'Université que je réalise actuellement, s'intéresse à la caractérisation fine de ces cellules de la gelée de Wharton et à leur utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage. Dans cette perspective, ces cellules constituent une source alternative aux CSM de moelle osseuse au regard des limites que présentent ces cellules chez les sujets âgés, eux-mêmes concernés majoritairement par les pathologies ostéo-articulaires.

L'ingénierie tissulaire du cartilage se trouve au carrefour de nombreuses disciplines scientifiques (sciences des matériaux, biologie moléculaire et cellulaire, ingénierie chimique, mécanique, physiopathologie, etc.). La diversité des connaissances acquises au cours des études de pharmacie, donne au pharmacien des compétences solides pour aborder ce domaine pluridisciplinaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26:1276-1284.
- Aggarwal S, Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140.
- Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. 2002. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 8:901-910.
- Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28:707-715.
- Barbosa CM, Leon CM, Nogueira-Pedro A, Wasinsk F, Araujo RC, Miranda A, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ. 2011. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell Death Dis* 2:e165.
- Bargues L, Prat M, Leclerc T, Bey E, Lataillade JJ. 2011. [Present and future of cell therapy in burns]. *Pathol Biol (Paris)* 59:e49-56.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30:42-48.
- Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. 2007. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* 25:1753-1760.
- Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. 1995. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 267:104-108.
- Bergmann G, Deuretzbacher G, Heller M, Graichen F, Rohlmann A, Strauss J, Duda GN. 2001. Hip contact forces and gait patterns from routine activities. *J Biomech* 34:859-871.

- Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. 2007. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 128:445-458.
- Boccaccio C, Esperou H, Rouard H, Pautas C, Robin M, Maury S, Cordonnier C. 2008. Le programme JACIE (Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT). Pourquoi? Pour qui? *Hématologie* 14:48-55.
- Bradley TR, Metcalf D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:287-299.
- Bretzner F, Gilbert F, Baylis F, Brownstone RM. 2011. Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 8:468-475.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889-895.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650.
- Caplan AI, Dennis JE. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076-1084.
- Cavaleri F, Scholer HR. 2003. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 113:551-552.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. 2008. Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Med Hypotheses* 71:900-908.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 40:815-820.
- Chung C, Burdick JA. 2008. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60:243-262.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7841-7845.
- Coulombel L. 2010. Cellules souches: un seul nom pour de multiples entités. *Revue Francophone des Laboratoires* 427:29-39.
- Darr H, Benvenisty N. 2009. Genetic analysis of the role of the reprogramming gene LIN-28 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:352-362.

- Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, Shahram F, Nikbin B. 2011. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 14:211-215.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. 2006. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 20:161-171.
- De Guerra A, Faucher C, Prada-Bordenave E. 2010. Cellules souches hématopoïétiques, du cordon, embryonnaires et autres: un aperçu réglementaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 427:69-77.
- Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RC. 2005. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSb mice. *DNA Cell Biol* 24:458-463.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Domm C, Schunke M, Christesen K, Kurz B. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 10:13-22.
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9864-9869.
- Duprat S, Lemaître G, Onteniente B. 2010. Cellules souches embryonnaires et applications thérapeutiques. *Revue Francophone des Laboratoires* 427:41-46.
- Elder SH, Cooley AJ, Jr., Borazjani A, Sowell BL, To H, Tran SC. 2009. Production of hyaline-like cartilage by bone marrow mesenchymal stem cells in a self-assembly model. *Tissue Eng Part A* 15:3025-3036.
- Freyria AM, Courtes S, Mallein-Gerin F. 2008. [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. *Pathol Biol (Paris)* 56:326-333.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-274.
- Galois L, Bensoussan D, Diligent J, Pinzano A, Henrionnet C, Choufani E, Stoltz JF, Mainard D. 2009. Autologous bone marrow graft and treatment of delayed and non-unions of long bones: technical aspects. *Biomed Mater Eng* 19:277-281.

- Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Lavallo P. 2005. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films. *Langmuir* 21:12372-12377.
- Gigant-Huselstein C, Hubert P, Dumas D, Dellacherie E, Netter P, Payan E, Stoltz JF. 2004. Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses. *Biorheology* 41:423-431.
- Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Feugier P, Bordigoni P, Stoltz JF. 2001. [Quantitative expression of the adhesion receptors VLA-4, VLA-5, L-selectin, MAC-1, and ICAM-1 on the surface of CD34+ cells]. *Transfus Clin Biol* 8:453-459.
- Green H, Easley K, Iuchi S. 2003. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15625-15630.
- Greene GW, Zappone B, Soderman O, Topgaard D, Rata G, Zeng H, Israelachvili JN. 2010. Anisotropic dynamic changes in the pore network structure, fluid diffusion and fluid flow in articular cartilage under compression. *Biomaterials* 31:3117-3128.
- Grossin L, Cortial D, Saulnier B, Félix O, Chassepot A, Decher G, Netter P, Schaaf P, Gillet P, Mainard D, Voegel JC, Benkirane-Jessel N. 2009. Step-by-Step Build-Up of Biologically Active Cell-Containing Stratified Films Aimed at Tissue Engineering. *Advanced materials* 21:650-655.
- Guettier C. 2005. [Which stem cells for adult liver?]. *Ann Pathol* 25:33-44.
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. 1998. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 21:751-756.
- Hangody L, Vasarhelyi G, Hangody LR, Sukosd Z, Tibay G, Bartha L, Bodo G. 2008. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury* 39 Suppl 1:S32-39.
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318:1920-1923.
- Hayes AJ, Hall A, Brown L, Tubo R, Caterson B. 2007. Macromolecular organization and in vitro growth characteristics of scaffold-free neocartilage grafts. *J Histochem Cytochem* 55:853-866.
- Hermange MT. 2010. Bioéthique et cellules souches. *Revue Francophone des Laboratoires* 427:61-67.

- Hoffman LM, Carpenter MK. 2005. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:699-708.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8932-8937.
- Huang AH, Farrell MJ, Kim M, Mauck RL. 2010. Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19:72-85.
- Jakobsen RB, Shahdadfar A, Reinholt FP, Brinchmann JE. 2009. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
- Kemppainen JM, Hollister SJ. 2010. Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes and bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 31:279-287.
- Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A. 2002. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci* 59:27-35.
- Kieffer E, Kuntz S, Viville S. 2010. [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Med Sci (Paris)* 26:848-854.
- Kim J, Hematti P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37:1445-1453.
- Kim TK, Sharma B, Williams CG, Ruffner MA, Malik A, McFarland EG, Elisseeff JH. 2003. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11:653-664.
- Klein TJ, Rizzi SC, Reichert JC, Georgi N, Malda J, Schuurman W, Crawford RW, Hutmacher DW. 2009. Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. *Macromol Biosci* 9:1049-1058.
- Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G, Francioli S, Martin I, Pressato D, Arcangeli E, Quarto R, Sandri M, Marcacci M. 2009. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res* 28:116-124.
- Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, Baggett LS, Mikos AG, Cao Y. 2008. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol* 9:60.

- Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, Benneker LM, Alini M. 2010. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16:1845-1855.
- Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15:226-231.
- Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana MC, Zanella-Cleon I, Kiger L, Wattenhofer-Donze M, Puccio H, Hebert N, Francina A, Andreu G, Viville S, Douay L. 2010. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95:1651-1659.
- Laustriat D, Gide J, Hechard C, Peschanski M. 2009. [Embryonic stem cells in pharmacology]. *Med Sci (Paris)* 25 Spec No 2:32-38.
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. 1995. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 16:557-564.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579-1586.
- Le Pen C, Reygrobelle C, Gerentes I. 2005. Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study. *Joint Bone Spine* 72:567-570.
- Lee HJ, Choi BH, Min BH, Park SR. 2009. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. *Arthritis Rheum* 60:2325-2332.
- Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH. 2007. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells* 25:2964-2971.
- Lissandre S, Tanguy-Schmidt A, Moles MP, Ifrah N. 2007. Place de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement des hémopathies de l'adulte. *Revue Francophone des Laboratoires* 395:37-44.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476-5479.
- Lowry WE, Plath K. 2008. The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* 26:1246-1248.

- Maherali N, Hochedlinger K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3:595-605.
- Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S. 2005. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res*:96-105.
- Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Bistoni G, Calvi EM, Lumare E, Ederli F, Locci P. 2010. Effects of hydroxyapatite and Biostite on osteogenic induction of hMSC. *Ann Biomed Eng* 38:640-648.
- Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattnig S. 2006. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol* 57:16-23.
- Martinaud C, Thepenier C, Trouillas M, Peltzer J, Uzan G, Le Bousse Kerdilès MC, Prat M, Lataillade JJ. 2010. Les cellules souches mésenchymateuses: des cellules pour la médecine régénérative du futur? *Revue Francophone des Laboratoires* 427:47-59.
- Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournie JJ, Poupot R. 2009. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 39:752-762.
- McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. 1991. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans* 19:29S.
- Menard C, Tarte K. 2011. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. *Med Sci (Paris)* 27:269-274.
- Michallet M. 2011. [Allogeneic hematopoietic stem cell transplantations]. *Transfus Clin Biol* 18:235-245.
- Mjahed H, Porcel C, Senger B, Chassepot A, Netter P, Gillet P, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Benkirane-Jessel N, Boulmedais F. 2008. Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)-hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering. *Soft Matter* 4:1422-1429.
- Mohty M, Ho AD. 2011. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 39:723-729.
- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-2740.

- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177:2080-2087.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Ohyabu Y, Adegawa T, Yoshioka T, Ikoma T, Shinozaki K, Uemura T, Tanaka J. 2009. A collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitinsulfate composite as a scaffold for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 20:1861-1874.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322:949-953.
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-245.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. 1999. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283:845-848.
- Peltari K, Wixmerten A, Martin I. 2009. Do we really need cartilage tissue engineering? *Swiss Med Wkly* 139:602-609.
- Phinney DG, Prockop DJ. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25:2896-2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Pittenger MF, Martin BJ. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95:9-20.
- Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. 2004. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 94:223-229.
- Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Polymer Science* 35:403-440.
- Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, Forner K, Boivin MN, Doody K, Tremblay M, Annabi B, Galipeau J. 2008. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 112:4991-4998.

- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. 2003. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 299:363.
- Rannou F, Sellam J, Berenbaum F. 2010. [Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts]. *Presse Med* 39:1159-1163.
- Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang BQ, He BC, Chen L, Zuo GW, Luo Q, Shi Q, Wagner ER, Huang E, Gao Y, Gao JL, Kim SH, Zhou JZ, Bi Y, Su Y, Zhu G, Luo J, Luo X, Qin J, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, Deng ZL, He TC. 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2:67-80.
- Riaz A, Javeed A, Zhou Q. 2011. Therapeutic cloning by xenotransplanted oocytes, supplemented with species specific reprogramming factors. *Med Hypotheses* 76:527-529.
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69:5331-5339.
- Roux S, Leotot J, Chevallier N, Bierling P, Rouard H. 2011. [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. *Transfus Clin Biol* 18:1-12.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256.
- Selmi TA, Verdonk P, Chambat P, Dubrana F, Potel JF, Barnouin L, Neyret P. 2008. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J Bone Joint Surg Br* 90:597-604.
- Seminatore C, Polentes J, Ellman D, Kozubenko N, Itier V, Tine S, Tritschler L, Brenot M, Guidou E, Blondeau J, Lhuillier M, Bugi A, Aubry L, Jendelova P, Sykova E, Perrier AL, Finsen B, Onteniente B. 2010. The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke* 41:153-159.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553.
- Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 56:509-538.
- Stadtfield M, Hochedlinger K. 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24:2239-2263.

- Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322:945-949.
- Steinmetz NJ, Bryant SJ. 2011. The effects of intermittent dynamic loading on chondrogenic and osteogenic differentiation of human marrow stromal cells encapsulated in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomater.*
- Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3584-3588.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Splingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebe L. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115:1549-1553.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Till JE, Mc CE. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-222.
- Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. 2007. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 21:1992-1999.
- Toh WS, Lee EH, Cao T. 2011. Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 7:544-559.
- Tritz J, Rahouadj R, De Isla N, Charif N, Pinzano A, Mainard D, Bensoussan D, Netter P, Stoltz JF, Benkirane-Jessel N, Huselstein C. 2010. Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering. *Soft Matter.*
- Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. 2011. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 9:52.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8:726-736.

- Ungerstedt JS, Watz E, Uttervall K, Johansson BM, Wahlin BE, Nasman P, Ljungman P, Gruber A, Axdorph Nygell U, Nahi H. 2011. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma and lymphoma: an analysis of factors influencing stem cell collection and hematological recovery. *Med Oncol*.
- Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D. 2009. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27:307-314.
- Von Keudell A, Atzwanger J, Forstner R, Resch H, Hoffelner T, Mayer M. 2011. Radiological evaluation of cartilage after microfracture treatment: A long-term follow-up study. *Eur J Radiol*.
- Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. 2007. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 1:74-79.
- Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H. 2011. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 5:146-150.
- Wang QG, Hughes N, Cartmell SH, Kuiper NJ. 2010. The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profile. *Eur Cell Mater* 19:86-95.
- Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2009. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J Control Release* 134:81-90.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618-630.
- Weissman IL, Shizuru JA. 2008. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112:3543-3553.
- Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34:461-475.
- Wong M, Siegrist M, Wang X, Hunziker E. 2001. Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. *J Orthop Res* 19:493-499.

- Wu AG, Michejda M, Mazumder A, Meehan KR, Menendez FA, Tchabo JG, Slack R, Johnson MP, Bellanti JA. 1999. Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Pediatr Res* 46:163-169.
- Xie J, Han Z, Kim SH, Kim YH, Matsuda T. 2007. Mechanical loading-dependence of mRNA expressions of extracellular matrices of chondrocytes inoculated into elastomeric microporous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Tissue Eng* 13:29-40.
- Yamanaka S. 2009. A fresh look at iPS cells. *Cell* 137:13-17.
- Yan H, Yu C. 2007. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 23:178-187.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
- Yuan H, Yamashita YM. 2010. Germline stem cells: stems of the next generation. *Curr Opin Cell Biol* 22:730-736.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:1129-1133.
- Zhou J, Xu C, Wu G, Cao X, Zhang L, Zhai Z, Zheng Z, Chen X, Wang Y. 2011. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomater*.
- Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, Dowey SN, Cheng L, Malech HL. 2011. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 117:5561-5572.
- Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C. 2008. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* 43:986-997.

Thèses :

- Thèse de Wang Y, 2007.

Textes législatifs et réglementaires :

- Loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (cf. annexe).
- Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.
- Loi n°2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique.
- Décret n°2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain et modifiant le code de la santé publique.
- Décret n° 2006-73 du 24 janvier 2006 relatif aux activités de soins faisant l'objet d'un schéma interrégional d'organisation sanitaire prévu à l'article L. 6121-4 du code de la santé publique.

Sites internet :

- <http://www.afssaps.fr/>
- <http://www.agence-biomedecine.fr/>
- <http://clinicaltrials.gov/>
- <http://www.istem.eu/>
- <http://kneesurgeonbristol.co.uk/>
- <http://www.legifrance.gouv.fr/>
- <http://www.tbf-lab.com/>

(Dernière consultation des sites internet : 08/2011).

Annexe

LOIS

LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (1)

NOR : ETSX1117652L

L'Assemblée nationale et le Sénat ont adopté,
Le Président de la République promulgue la loi dont la teneur suit :

Article 1^{er}

Est autorisée la ratification de la convention du Conseil de l'Europe pour la protection des droits de l'homme et de la dignité de l'être humain à l'égard des applications de la biologie et de la médecine : convention sur les droits de l'homme et la biomédecine, signée à Oviedo le 4 avril 1997.

TITRE I^{er}

EXAMEN DES CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES À DES FINS MÉDICALES

Article 2

Le chapitre I^{er} du titre III du livre I^{er} de la première partie du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° Les quatre derniers alinéas de l'article L. 1131-1 sont supprimés ;

2° Après le même article L. 1131-1, sont insérés des articles L. 1131-1-2 et L. 1131-1-3 ainsi rédigés :

« *Art. L. 1131-1-2.* – Préalablement à la réalisation d'un examen des caractéristiques génétiques d'une personne, le médecin prescripteur informe celle-ci des risques qu'un silence ferait courir aux membres de sa famille potentiellement concernés si une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins était diagnostiquée. Il prévoit avec elle, dans un document écrit qui peut, le cas échéant, être complété après le diagnostic, les modalités de l'information destinée aux membres de la famille potentiellement concernés afin d'en préparer l'éventuelle transmission. Si la personne a exprimé par écrit sa volonté d'être tenue dans l'ignorance du diagnostic, elle peut autoriser le médecin prescripteur à procéder à l'information des intéressés dans les conditions prévues au quatrième alinéa.

« En cas de diagnostic d'une anomalie génétique grave, sauf si la personne a exprimé par écrit sa volonté d'être tenue dans l'ignorance du diagnostic, l'information médicale communiquée est résumée dans un document rédigé de manière loyale, claire et appropriée, signé et remis par le médecin. La personne atteste de cette remise. Lors de l'annonce de ce diagnostic, le médecin informe la personne de l'existence d'une ou plusieurs associations de malades susceptibles d'apporter des renseignements complémentaires sur l'anomalie génétique diagnostiquée. Si la personne le demande, il lui remet la liste des associations agréées en application de l'article L. 1114-1.

« La personne est tenue d'informer les membres de sa famille potentiellement concernés dont elle ou, le cas échéant, son représentant légal possède ou peut obtenir les coordonnées, dès lors que des mesures de prévention ou de soins peuvent leur être proposées.

« Si la personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille potentiellement concernés, elle peut demander par un document écrit au médecin prescripteur, qui atteste de cette demande, de procéder à cette information. Elle lui communique à cette fin les coordonnées des intéressés dont elle dispose. Le médecin porte alors à leur connaissance l'existence d'une information médicale à caractère familial susceptible de les concerner et les invite à se rendre à une consultation de génétique, sans dévoiler ni le nom de la personne ayant fait l'objet de l'examen, ni l'anomalie génétique, ni les risques qui lui sont associés.

« Le médecin consulté par la personne apparentée est informé par le médecin prescripteur de l'anomalie génétique en cause.

« Lorsqu'est diagnostiquée une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins chez une personne qui a fait un don de gamètes ayant abouti à la conception d'un ou plusieurs enfants ou chez l'un des membres d'un couple ayant effectué un don d'embryon, cette personne peut autoriser le médecin prescripteur à saisir le responsable du centre d'assistance médicale à la procréation afin qu'il procède à l'information des enfants issus du don dans les conditions prévues au quatrième alinéa.

« Art. L. 1131-1-3. – Par dérogation au deuxième alinéa de l'article L. 1111-2 et à l'article L. 1111-7, seul le médecin prescripteur de l'examen des caractéristiques génétiques est habilité à communiquer les résultats de cet examen à la personne concernée ou, le cas échéant, aux personnes mentionnées au second alinéa de l'article L. 1131-1. »

Article 3

L'article L. 1131-2 du même code est ainsi rédigé :

« Art. L. 1131-2. – Un arrêté du ministre chargé de la santé, pris sur proposition de l'Agence de la biomédecine et de la Haute Autorité de santé, définit les règles de bonnes pratiques applicables à la prescription et la réalisation de l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales. Cet arrêté définit également les règles de bonnes pratiques applicables, le cas échéant, au suivi médical de la personne. »

Article 4

I. – Après l'article L. 1131-2 du même code, il est inséré un article L. 1131-2-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 1131-2-1. – L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou son identification par empreintes génétiques à des fins médicales ne peuvent être pratiqués que dans des laboratoires de biologie médicale autorisés à cet effet dans les conditions prévues au chapitre II du titre II du livre I^{er} de la sixième partie et accrédités dans les conditions prévues au chapitre I^{er} du titre II du livre II de la même partie.

« Lorsque le laboratoire dépend d'un établissement de santé, l'autorisation est délivrée à cet établissement.

« Un laboratoire de biologie médicale établi dans un autre Etat membre de l'Union européenne ou partie à l'accord sur l'Espace économique européen peut réaliser la phase analytique de l'examen des caractéristiques génétiques ou de l'identification par empreintes génétiques s'il est autorisé dans cet Etat à pratiquer cette activité, sous réserve qu'il ait adressé une déclaration si les conditions d'autorisation dans cet Etat ont été préalablement reconnues comme équivalentes à celles qui résultent du premier alinéa ou, à défaut, qu'il ait obtenu une autorisation après vérification que ses normes de fonctionnement sont équivalentes à celles qui résultent du premier alinéa.

« Les autorisations et accréditations prévues aux trois premiers alinéas peuvent être retirées ou suspendues, respectivement dans les conditions prévues aux articles L. 6122-13 et L. 6221-2 ou en cas de manquement aux prescriptions législatives et réglementaires applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreintes génétiques. »

II. – Au début du premier alinéa de l'article L. 1131-3 du même code, sont ajoutés les mots : « Sous réserve des dispositions du troisième alinéa de l'article L. 1131-2-1, ».

III. – Le second alinéa de l'article 226-28 du code pénal et le dernier alinéa de l'article L. 1133-4 du code de la santé publique sont ainsi modifiés :

1^o Après le mot : « procéder », sont insérés les mots : « à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou » ;

2^o Sont ajoutés les mots : « et de l'autorisation prévue à l'article L. 1131-2-1 du même code ».

Article 5

I. – A l'intitulé du titre III du livre I^{er} de la première partie du code de la santé publique, les mots : « génétique et recherche génétique » sont remplacés par les mots : « par empreintes génétiques et profession de conseiller en génétique ».

II. – L'article L. 1131-6 du même code est ainsi modifié :

1^o Au 1^o, après le mot : « personne », sont insérés les mots : « ou son identification par empreintes génétiques » ;

2^o Sont ajoutés des 3^o et 4^o ainsi rédigés :

« 3^o Les conditions d'application de l'article L. 1131-1-2, après avis de l'Agence de la biomédecine ;

« 4^o Les conditions que doivent remplir les laboratoires de biologie médicale mentionnés à l'article L. 1131-2-1 pour être autorisés à pratiquer l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou son identification par empreintes génétiques à des fins médicales. »

Article 6

I. – Après l'article 226-28 du code pénal, il est inséré un article 226-28-1 ainsi rédigé :

« Art. 226-28-1. – Le fait, pour une personne, de solliciter l'examen de ses caractéristiques génétiques ou de celles d'un tiers ou l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques en dehors des conditions prévues par la loi est puni de 3 750 € d'amende. »

II. – Après l'article L. 1133-4 du code de la santé publique, il est inséré un article L. 1133-4-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 1133-4-1. – Le fait, pour une personne, de solliciter l'examen de ses caractéristiques génétiques ou de celles d'un tiers ou l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques en dehors des conditions prévues par la loi est puni de la peine prévue à l'article 226-28-1 du code pénal. »

TITRE II

ORGANES ET CELLULES

Article 7

I. – Le chapitre I^{er} du titre III du livre II de la première partie du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° L'article L. 1231-1 est ainsi modifié :

a) La seconde phrase du deuxième alinéa est complétée par les mots : « ainsi que toute personne pouvant apporter la preuve d'un lien affectif étroit et stable depuis au moins deux ans avec le receveur » ;

b) Après le même deuxième alinéa, il est inséré un alinéa ainsi rédigé :

« En cas d'incompatibilité entre la personne ayant exprimé l'intention de don et la personne dans l'intérêt de laquelle le prélèvement peut être opéré en vertu des premier ou deuxième alinéas, rendant impossible la greffe, le donneur et le receveur potentiels peuvent se voir proposer le recours à un don croisé d'organes. Celui-ci consiste pour le receveur potentiel à bénéficier du don d'une autre personne ayant exprimé l'intention de don et également placée dans une situation d'incompatibilité à l'égard de la personne dans l'intérêt de laquelle le prélèvement peut être opéré en vertu des premier ou deuxième alinéas, tandis que cette dernière bénéficie du don du premier donneur. En cas de mise en œuvre d'un don croisé, les actes de prélèvement et de greffe sont engagés de façon simultanée respectivement sur les deux donneurs et sur les deux receveurs. L'anonymat entre donneur et receveur est respecté. » ;

c) A la première phrase du troisième alinéa, les mots : « et des conséquences éventuelles du prélèvement, doit exprimer son consentement » sont remplacés par les mots : « , des conséquences éventuelles du prélèvement et, le cas échéant, des modalités du don croisé, doit exprimer son consentement au don et, le cas échéant, au don croisé » et les références : « premier et deuxième alinéas » sont remplacées par les mots : « premier, deuxième et, le cas échéant, troisième alinéas » ;

d) Au quatrième alinéa, le mot : « prévue » est remplacé par les mots : « de prélèvement sur une personne mentionnée » ;

2° L'article L. 1231-3 est ainsi modifié :

a) A la dernière phrase du premier alinéa, le mot : « troisième » est remplacé par le mot : « quatrième » ;

b) A la première phrase du troisième alinéa, les mots : « de l'opération, les risques que celle-ci » sont remplacés par les mots : « d'un prélèvement et d'une greffe d'organe, les risques que le prélèvement » et est ajouté le mot : « potentiels » ;

3° A l'article L. 1231-4, après le mot : « notamment », sont insérés les mots : « les dispositions applicables aux dons croisés d'organes, ».

II. – Au premier alinéa de l'article 511-3 du code pénal et au deuxième alinéa de l'article L. 1272-2 du code de la santé publique, les mots : « troisième » et « cinquième » sont remplacés respectivement par les mots : « quatrième » et « sixième ».

III. – Au 7° de l'article L. 1418-1 du code de la santé publique, après les mots : « celle-ci et », sont insérés les mots : « de celle du registre des paires associant donneurs vivants et receveurs potentiels ayant consenti à un don croisé d'organes ainsi que ».

IV. – La seconde phrase du 1° de l'article 225-3 du code pénal est complétée par les mots : « ou qu'elles se fondent sur la prise en compte des conséquences sur l'état de santé d'un prélèvement d'organe tel que défini à l'article L. 1231-1 du code de la santé publique ».

Article 8

La section 9 du chapitre II du titre I^{er} du livre III de la deuxième partie du code de l'éducation est complétée par un article L. 312-17-2 ainsi rédigé :

« Art. L. 312-17-2. – Une information est dispensée dans les lycées et les établissements d'enseignement supérieur sur la législation relative au don d'organes à fins de greffe et sur les moyens de faire connaître sa position de son vivant soit en s'inscrivant sur le registre national automatisé prévu à l'article L. 1232-1 du code de la santé publique, soit en informant ses proches. Ces séances peuvent associer les personnels contribuant à la mission de santé scolaire ainsi que des intervenants extérieurs, issus notamment des associations militant pour le don d'organes. De même, une sensibilisation au don du sang est dispensée dans les lycées et les établissements d'enseignement supérieur, au besoin avec l'assistance d'intervenants extérieurs. »

Article 9

La première phrase du premier alinéa de l'article L. 1111-14 du code de la santé publique est complétée par les mots : « et comportant la mention : "a été informé de la loi sur le don d'organes" ».

Article 10

La Journée nationale de réflexion sur le don d'organes et la greffe prend le nom de « Journée nationale de réflexion sur le don d'organe et la greffe et de reconnaissance envers les donneurs ».

Article 11

Après l'article L. 1211-6 du code de la santé publique, il est inséré un article L. 1211-6-1 ainsi rédigé :
« Art. L. 1211-6-1. – Nul ne peut être exclu du don de sang en dehors de contre-indications médicales. »

Article 12

Le chapitre I^{er} du titre I^{er} du livre I^{er} du code des assurances est complété par un article L. 111-8 ainsi rédigé :
« Art. L. 111-8. – Toute discrimination directe ou indirecte fondée sur la prise en compte d'un don d'organes comme facteur de refus de contrat d'assurance ou dans le calcul des primes et des prestations du donneur ayant pour effet des différences en matière de primes et de prestations est interdite. »

Article 13

La deuxième phrase du II de l'article L. 161-31 du code de la sécurité sociale est complétée par les mots : « ainsi que la mention : "A été informé de la législation relative au don d'organes" ».

Article 14

La seconde phrase du deuxième alinéa de l'article L. 114-3 du code du service national est remplacée par deux phrases ainsi rédigées :

« Il est délivré une information générale sur le don de sang, de plaquettes, de moelle osseuse, de gamètes et sur le don d'organes à fins de greffe. S'agissant du don d'organes, une information spécifique est dispensée sur la législation en vigueur, sur le consentement présumé et sur la possibilité pour une personne d'inscrire son refus sur le registre national automatisé prévu à l'article L. 1232-1 du code de la santé publique. »

Article 15

Avant le 1^{er} octobre 2011, le Gouvernement remet au Parlement un rapport relatif à l'amélioration de l'indemnisation, par l'office mentionné à l'article L. 1142-22 du code de la santé publique, des personnes subissant des dommages en raison d'un don d'organes, de tissus et de cellules du corps humain, et à ses conséquences financières sur les comptes de l'assurance maladie.

Article 16

Avant le 1^{er} octobre 2011, le Gouvernement remet au Parlement un rapport sur l'amélioration des conditions de remboursement de l'ensemble des frais engagés par les donneurs vivants d'organes, de tissus et de cellules du corps humain à l'occasion de leur prélèvement ou de leur collecte.

Article 17

I. – Au début du titre II du livre II de la première partie du code de la santé publique, il est ajouté un article L. 1220-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 1220-1. – Le présent titre s'applique au sang, à ses composants et aux produits sanguins labiles, à l'exception des cellules hématopoïétiques et des cellules mononucléées sanguines qui relèvent du titre IV du présent livre. »

II. – Le titre IV du même livre II est ainsi modifié :

1^o L'article L. 1241-1 est ainsi modifié :

a) A la première phrase du deuxième alinéa, les mots : « issues de la moelle osseuse » sont supprimés ;
b) Au début de la première phrase du dernier alinéa, les mots : « Le prélèvement de cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse en vue de don à des fins thérapeutiques » sont remplacés par les mots : « Le prélèvement, en vue de don à des fins thérapeutiques, de cellules hématopoïétiques recueillies par prélèvement dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique » ;

2^o L'article L. 1241-3 est ainsi modifié :

a) Au premier alinéa, les mots : « issues de la moelle osseuse » sont remplacés par les mots : « recueillies par prélèvement dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique » ;

b) Au deuxième alinéa, après le mot : « thérapeutique », il est inséré le mot : « appropriée » ;

c) A la première phrase du dernier alinéa, après le mot : « préalable », sont insérés les mots : « que, notamment au regard des règles de bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 1245-6, les conditions de réalisation du prélèvement ne comportent aucun risque pour le mineur compte tenu de son âge ou de son développement, » et, après le mot : « majeur », il est inséré le mot : « suffisamment » ;

3° L'article L. 1241-4 est ainsi modifié :

a) Au premier alinéa, les mots : « issues de la moelle osseuse » sont remplacés par les mots : « recueillies par prélèvement dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique » ;

b) A la première phrase du quatrième alinéa, après le mot : « thérapeutique », il est inséré le mot : « appropriée » ;

c) A l'avant-dernier alinéa, après le mot : « majeur », il est inséré le mot : « suffisamment » ;

4° Le cinquième alinéa de l'article L. 1245-5 est supprimé.

III. – Au 3° de l'article L. 222-1 du code de la recherche, le mot : « huitième » est remplacé par le mot : « septième ».

Article 18

Le titre IV du livre II de la première partie du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° L'article L. 1241-1 est complété par un alinéa ainsi rédigé :

« Le prélèvement de cellules hématopoïétiques du sang de cordon et du sang placentaire ainsi que de cellules du cordon et du placenta ne peut être effectué qu'à des fins scientifiques ou thérapeutiques, en vue d'un don anonyme et gratuit, et à la condition que la femme, durant sa grossesse, ait donné son consentement par écrit au prélèvement et à l'utilisation de ces cellules, après avoir reçu une information sur les finalités de cette utilisation. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu. Par dérogation, le don peut être dédié à l'enfant né ou aux frères ou sœurs de cet enfant en cas de nécessité thérapeutique avérée et dûment justifiée lors du prélèvement. » ;

2° Le dernier alinéa de l'article L. 1243-2 est ainsi rédigé :

« Seules peuvent être préparées, conservées, distribuées ou cédées les cellules du sang de cordon et du sang placentaire ainsi que les cellules du cordon et du placenta prélevées dans les conditions mentionnées au dernier alinéa de l'article L. 1241-1. Chacun de ces établissements consacre une part de son stockage au don dédié mentionné à ce même dernier alinéa. » ;

3° Au premier alinéa de l'article L. 1245-2, les mots : « ainsi que le placenta » sont remplacés par les mots : « à l'exception des cellules du sang de cordon et du sang placentaire ainsi que des cellules du cordon et du placenta, ».

Article 19

I. – Le deuxième alinéa de l'article L. 1242-1 du même code est ainsi rédigé :

« Les cellules à fins d'administration autologue ou allogénique ne peuvent être prélevées que dans des établissements de santé autorisés à cet effet par le directeur général de l'agence régionale de santé après avis de l'Agence de la biomédecine. Les cellules du sang destinées à la préparation de produits cellulaires à finalité thérapeutique mentionnés à l'article L. 1243-1 peuvent également être prélevées par l'Etablissement français du sang soit dans ses établissements de transfusion sanguine, s'ils ont été autorisés dans les conditions applicables aux établissements de santé, soit dans des établissements de santé autorisés. »

II. – L'article 511-5 du code pénal est ainsi modifié :

1° Au premier alinéa, les mots : « deuxième et troisième » sont remplacés par les mots : « trois derniers » ;

2° Au second alinéa, après le mot : « osseuse », sont insérés les mots : « , qu'elles soient recueillies par prélèvement osseux ou dans le sang périphérique, ».

III. – L'article L. 1272-4 du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° Au deuxième alinéa, les mots : « deuxième et troisième » sont remplacés par les mots : « trois derniers » ;

2° Au dernier alinéa, après le mot : « osseuse », sont insérés les mots : « , qu'elles soient recueillies par prélèvement osseux ou dans le sang périphérique, ».

TITRE III

DIAGNOSTIC PRÉNATAL, DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE ET ÉCHOGRAPHIE OBSTÉTRICALE ET FŒTALE

Article 20

I. – L'intitulé du chapitre I^{er} du titre III du livre I^{er} de la deuxième partie du code de la santé publique est ainsi rédigé : « Diagnostics anténataux : diagnostic prénatal et diagnostic préimplantatoire ».

II. – L'article L. 2131-1 du même code est ainsi rédigé :

« Art. L. 2131-1. – I. – Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité.

« II. – Toute femme enceinte reçoit, lors d'une consultation médicale, une information loyale, claire et adaptée à sa situation sur la possibilité de recourir, à sa demande, à des examens de biologie médicale et d'imagerie permettant d'évaluer le risque que l'embryon ou le fœtus présente une affection susceptible de modifier le déroulement ou le suivi de sa grossesse.

« III. – Le prescripteur, médecin ou sage-femme, communique les résultats de ces examens à la femme enceinte et lui donne toute l'information nécessaire à leur compréhension.

« En cas de risque avéré, la femme enceinte et, si elle le souhaite, l'autre membre du couple sont pris en charge par un médecin et, le cas échéant ou à sa demande, orientés vers un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal. Ils reçoivent, sauf opposition de leur part, des informations sur les caractéristiques de l'affection suspectée, les moyens de la détecter et les possibilités de prévention, de soin ou de prise en charge adaptée du fœtus ou de l'enfant né. Une liste des associations spécialisées et agréées dans l'accompagnement des patients atteints de l'affection suspectée et de leur famille leur est proposée.

« IV. – En cas de risque avéré, de nouveaux examens de biologie médicale et d'imagerie à visée diagnostique peuvent être proposés par un médecin, le cas échéant membre d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal, au cours d'une consultation adaptée à l'affection recherchée.

« V. – Préalablement à certains examens mentionnés au II et aux examens mentionnés au IV du présent article, le consentement prévu au troisième alinéa de l'article L. 1111-4 est recueilli par écrit auprès de la femme enceinte par le médecin ou la sage-femme qui prescrit ou, le cas échéant, qui effectue les examens. La liste de ces examens est déterminée par arrêté du ministre chargé de la santé au regard notamment de leurs risques pour la femme enceinte, l'embryon ou le fœtus et de la possibilité de détecter une affection d'une particulière gravité chez l'embryon ou le fœtus.

« VI. – Préalablement au recueil du consentement mentionné au V et à la réalisation des examens mentionnés aux II et IV, la femme enceinte reçoit, sauf opposition de sa part dûment mentionnée par le médecin ou la sage-femme dans le dossier médical, une information portant notamment sur les objectifs, les modalités, les risques, les limites et le caractère non obligatoire de ces examens.

« En cas d'échographie obstétricale et fœtale, il lui est précisé en particulier que l'absence d'anomalie détectée ne permet pas d'affirmer que le fœtus soit indemne de toute affection et qu'une suspicion d'anomalie peut ne pas être confirmée ultérieurement.

« VII. – Les examens de biologie médicale destinés à établir un diagnostic prénatal sont pratiqués dans des laboratoires de biologie médicale faisant appel à des praticiens en mesure de prouver leur compétence, autorisés selon les modalités prévues au titre II du livre I^{er} de la sixième partie et accrédités selon les modalités prévues au chapitre I^{er} du titre II du livre II de la même partie. Lorsque le laboratoire dépend d'un établissement de santé, l'autorisation est délivrée à cet établissement.

« VIII. – La création de centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal, mentionnés au III, dans des organismes et établissements de santé publics et privés d'intérêt collectif est autorisée par l'Agence de la biomédecine. »

Article 21

I. – L'article L. 2131-4 du même code est ainsi modifié :

1^o Avant le premier alinéa, il est ajouté un alinéa ainsi rédigé :

« On entend par diagnostic préimplantatoire le diagnostic biologique réalisé à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro*. » ;

2^o Au deuxième alinéa, les mots : « centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire » sont remplacés par les mots : « centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal ».

II. – Au premier alinéa du même article L. 2131-4 et au 3^o de l'article L. 2131-5 du même code, les mots : « biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro* » sont remplacés par le mot : « préimplantatoire ».

Article 22

Le premier alinéa de l'article L. 2131-4-1 du même code est ainsi rédigé :

« Par dérogation au sixième alinéa de l'article L. 2131-4, et sous réserve d'avoir épuisé toutes les possibilités offertes par les articles L. 1241-1 à L. 1241-7, le diagnostic préimplantatoire peut également être autorisé lorsque les conditions suivantes sont réunies : ».

Article 23

Le chapitre I^{er} du titre III du livre I^{er} de la deuxième partie du même code est ainsi modifié :

1^o A l'article L. 2131-2, les mots : « activités de » sont remplacés par les mots : « examens de biologie médicale destinés à établir un » ;

2^o Au deuxième alinéa de l'article L. 2131-3, après les mots : « de l'autorisation », sont insérés les mots : « d'un établissement ou d'un laboratoire » ;

3^o A la seconde phrase du dernier alinéa de l'article L. 2131-4 et au 2^o de l'article L. 2131-5, les mots : « analyses de cytogénétiques et de biologie en vue d'établir » sont remplacés par les mots : « examens de biologie médicale destinés à établir » ;

4° Au 2° de l'article L. 2131-5, le mot : « elles » est remplacé par le mot : « ils ».

Article 24

Dans un délai d'un an à compter de la publication de la présente loi, puis tous les trois ans, le Gouvernement remet au Parlement un rapport établissant le bilan détaillé des fonds publics affectés à la recherche sur les anomalies cytogénétiques, en particulier ceux affectés à la recherche réalisée au bénéfice de la santé des patients atteints de ces maladies.

TITRE IV

INTERRUPTION DE GROSSESSE PRATiquÉE POUR MOTIF MÉDICAL

Article 25

Le deuxième alinéa de l'article L. 2213-1 du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° A la première phrase, les mots : « trois personnes qui sont un médecin qualifié en gynécologie-obstétrique » sont remplacés par les mots : « quatre personnes qui sont un médecin qualifié en gynécologie-obstétrique, membre d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal, un praticien spécialiste de l'affection dont la femme est atteinte » ;

2° Au début de la seconde phrase, les mots : « Les deux médecins précités » sont remplacés par les mots : « Le médecin qualifié en gynécologie-obstétrique et le médecin qualifié dans le traitement de l'affection dont la femme est atteinte ».

Article 26

Le troisième alinéa de l'article L. 2213-1 du même code est complété par une phrase ainsi rédigée :

« Hors urgence médicale, la femme se voit proposer un délai de réflexion d'au moins une semaine avant de décider d'interrompre ou de poursuivre sa grossesse. »

TITRE V

ANONYMAT DU DON DE GAMÈTES

Article 27

L'article L. 1244-6 du code de la santé publique est complété par trois alinéas ainsi rédigés :

« En application de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, toute personne, autorité publique, service ou organisme, et notamment les centres d'études et de conservation des œufs et du sperme humains, qui recueille et conserve des données à caractère personnel relatives aux donneurs de gamètes ou d'embryons, aux couples receveurs ou aux personnes issues des techniques d'assistance médicale à la procréation avec tiers donneur est soumis au contrôle de la Commission nationale de l'informatique et des libertés.

« Celle-ci contrôle les conditions dans lesquelles est effectué le recueil des données à caractère personnel à l'occasion des procréations médicalement assistées. La mise en place de tout traitement automatisé concernant ces données est soumise au respect des modalités de déclarations et d'autorisations préalables selon le type de données conservées, en application de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 précitée. La commission peut réaliser des contrôles sur place afin de s'assurer de la bonne conservation de ces données, quel qu'en soit le support.

« En cas de non-respect de cette même loi, elle peut mettre en œuvre les mesures prévues aux articles 45 à 52 de ladite loi. »

Article 28

L'article L. 2141-1 du même code est complété par un alinéa ainsi rédigé :

« Un arrêté du ministre chargé de la santé, pris sur proposition de l'Agence de la biomédecine, définit les règles de bonnes pratiques applicables à l'assistance médicale à la procréation avec tiers donneur. »

TITRE VI

ASSISTANCE MÉDICALE À LA PROCRÉATION

Article 29

I. – Après l'article L. 1244-1 du code de la santé publique, sont insérés des articles L. 1244-1-1 et L. 1244-1-2 ainsi rédigés :

« Art. L. 1244-1-1. – Les médecins gynécologues informent régulièrement leurs patientes sur le don d'ovocytes.

« Art. L. 1244-1-2. – Les médecins traitants informent régulièrement leurs patients sur le don de gamètes. »

II. – L'article L. 1244-2 du même code est ainsi modifié :

1° Le début de la seconde phrase du premier alinéa est ainsi rédigé : « Le consentement des donneurs et, s'ils font partie d'un couple,... (*le reste sans changement*). » ;

2° Il est ajouté un alinéa ainsi rédigé :

« Lorsqu'il est majeur, le donneur peut ne pas avoir procréé. Il se voit alors proposer le recueil et la conservation d'une partie de ses gamètes ou de ses tissus germinaux en vue d'une éventuelle réalisation ultérieure, à son bénéfice, d'une assistance médicale à la procréation, dans les conditions prévues au titre IV du livre I^{er} de la deuxième partie. Ce recueil et cette conservation sont subordonnés au consentement du donneur. »

III. – Après l'article L. 1244-4 du même code, il est rétabli un article L. 1244-5 ainsi rédigé :

« Art. L. 1244-5. – La donneuse bénéficie d'une autorisation d'absence de son employeur pour se rendre aux examens et se soumettre aux interventions nécessaires à la stimulation ovarienne et au prélèvement ovocytaire. Lorsque la donneuse est salariée, l'autorisation est accordée dans les conditions prévues au second alinéa de l'article L. 1225-16 du code du travail. »

Article 30

I. – Au 11° de l'article L. 1418-1 du même code, les références : « , L. 2131-4-2 et L. 2142-1-1 » sont remplacées par la référence : « et L. 2131-4-2 ».

II. – L'article L. 2131-4-2 est ainsi modifié :

1° Au premier alinéa, les mots : « au diagnostic prénatal et » sont supprimés ;

2° Le second alinéa est supprimé.

III. – Le chapitre II du titre IV du livre I^{er} de la deuxième partie du même code est ainsi modifié :

1° Au cinquième alinéa de l'article L. 2142-1, après le mot : « doivent », sont insérés les mots : « faire appel à des praticiens en mesure de prouver leur compétence et » ;

2° L'article L. 2142-1-1 est abrogé ;

3° La seconde phrase du premier alinéa de l'article L. 2142-3-1 est supprimée ;

4° Le 3° de l'article L. 2142-4 est abrogé.

Article 31

L'article L. 2141-1 du même code est ainsi modifié :

1° Le premier alinéa est remplacé par cinq alinéas ainsi rédigés :

« L'assistance médicale à la procréation s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception *in vitro*, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle. La liste des procédés biologiques utilisés en assistance médicale à la procréation est fixée par arrêté du ministre chargé de la santé après avis de l'Agence de la biomédecine. Un décret en Conseil d'Etat précise les modalités et les critères d'inscription des procédés sur cette liste. Les critères portent notamment sur le respect des principes fondamentaux de la bioéthique prévus en particulier aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître. L'Agence de la biomédecine remet au ministre chargé de la santé, dans les trois mois après la promulgation de la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, un rapport précisant la liste des procédés biologiques utilisés en assistance médicale à la procréation ainsi que les modalités et les critères d'inscription des procédés sur cette liste.

« Toute technique visant à améliorer l'efficacité, la reproductibilité et la sécurité des procédés figurant sur la liste mentionnée au premier alinéa du présent article fait l'objet, avant sa mise en œuvre, d'une autorisation délivrée par le directeur général de l'Agence de la biomédecine après avis motivé de son conseil d'orientation.

« Lorsque le conseil d'orientation considère que la modification proposée est susceptible de constituer un nouveau procédé, sa mise en œuvre est subordonnée à son inscription sur la liste mentionnée au même premier alinéa.

« La technique de congélation ultra-rapide des ovocytes est autorisée.

« La mise en œuvre de l'assistance médicale à la procréation privilégie les pratiques et procédés qui permettent de limiter le nombre des embryons conservés. L'Agence de la biomédecine rend compte, dans son rapport annuel, des méthodes utilisées et des résultats obtenus. » ;

2° Le second alinéa est ainsi modifié :

a) Le mot : « recommandations » est remplacé par le mot : « règles » ;

b) Sont ajoutés les mots : « fixées par arrêté du ministre chargé de la santé ».

Article 32

L'article L. 2141-11 du même code est complété par un alinéa ainsi rédigé :

« Les procédés biologiques utilisés pour la conservation des gamètes et des tissus germinaux sont inclus dans la liste prévue à l'article L. 2141-1, selon les conditions déterminées par cet article. »

Article 33

L'article L. 2141-2 du même code est ainsi modifié :

1° Les deux premiers alinéas sont remplacés par un alinéa ainsi rédigé :

« L'assistance médicale à la procréation a pour objet de remédier à l'infertilité d'un couple ou d'éviter la transmission à l'enfant ou à un membre du couple d'une maladie d'une particulière gravité. Le caractère pathologique de l'infertilité doit être médicalement diagnostiqué. » ;

2° A la première phrase du dernier alinéa, les mots : « , mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans et consentant » sont remplacés par les mots : « et consentir ».

Article 34

L'article L. 2141-4 du même code est ainsi modifié :

1° Au début du premier alinéa, est insérée la mention : « I. – » ;

2° Le deuxième alinéa est remplacé par un II ainsi rédigé :

« II. – S'ils n'ont plus de projet parental ou en cas de décès de l'un d'entre eux, les deux membres d'un couple, ou le membre survivant, peuvent consentir à ce que :

« 1° Leurs embryons soient accueillis par un autre couple dans les conditions fixées aux articles L. 2141-5 et L. 2141-6 ;

« 2° Leurs embryons fassent l'objet d'une recherche dans les conditions prévues à l'article L. 2151-5 ou, dans les conditions fixées par cet article et l'article L. 1125-1, à ce que les cellules dérivées à partir de ceux-ci entrent dans une préparation de thérapie cellulaire à des fins exclusivement thérapeutiques ;

« 3° Il soit mis fin à la conservation de leurs embryons.

« Dans tous les cas, le consentement ou la demande est exprimé par écrit et fait l'objet d'une confirmation par écrit après un délai de réflexion de trois mois. En cas de décès de l'un des membres du couple, le membre survivant ne peut être consulté avant l'expiration d'un délai d'un an à compter du décès, sauf initiative anticipée de sa part. » ;

3° Au début des troisième et dernier alinéas, sont insérées respectivement les mentions : « III. – » et « IV. – ».

Article 35

I. – Au début du premier alinéa de l'article L. 2141-5 du même code, les mots : « A titre exceptionnel, » sont supprimés.

II. – Le premier alinéa de l'article L. 2141-6 du même code est ainsi rédigé :

« Un couple répondant aux conditions prévues à l'article L. 2141-2 peut accueillir un embryon lorsque les techniques d'assistance médicale à la procréation au sein du couple ne peuvent aboutir ou lorsque le couple, dûment informé dans les conditions prévues à l'article L. 2141-10, y renonce. »

Article 36

Le chapitre I^{er} du titre IV du livre I^{er} de la deuxième partie du même code est ainsi modifié :

1° L'article L. 2141-3 est ainsi modifié :

a) A la fin de la première phrase du premier alinéa, la référence : « L. 2141-2 » est remplacée par la référence : « L. 2141-1 » ;

b) Après la première phrase du deuxième alinéa, il est inséré une phrase ainsi rédigée :

« Dans ce cas, ce nombre est limité à ce qui est strictement nécessaire à la réussite de l'assistance médicale à la procréation, compte tenu du procédé mis en œuvre. » ;

2° A la fin de l'article L. 2141-7, les mots : « y renonce » sont remplacés par les mots : « renonce à une assistance médicale à la procréation au sein du couple » ;

3° Au dernier alinéa de l'article L. 2141-10, après le mot : « époux », sont insérés les mots : « , les partenaires liés par un pacte civil de solidarité ».

Article 37

Le 4^o de l'article L. 1418-1 du même code est complété par une phrase ainsi rédigée :

« Elle prévoit la publication régulière des résultats de chaque centre d'assistance médicale à la procréation selon une méthodologie prenant en compte notamment les caractéristiques de leur patientèle et en particulier l'âge des femmes ; au vu de ces données, elle diligente des missions d'appui et de conseil dans certains centres, voire propose des recommandations d'indicateurs chiffrés à certains centres ; ».

Article 38

L'article L. 4151-1 du même code est complété par un alinéa ainsi rédigé :

« Les sages-femmes sont autorisées à concourir aux activités d'assistance médicale à la procréation, dans des conditions fixées par décret. »

Article 39

I. – L'article L. 1121-3 du même code est ainsi modifié :

1^o Au cinquième alinéa, les mots : « et d'un » sont remplacés par les mots : « ou d'un » ;

2^o Après le cinquième alinéa, il est inséré un alinéa ainsi rédigé :

« Les recherches biomédicales concernant le domaine de la maïeutique et conformes aux dispositions du dernier alinéa de l'article L. 1121-5 ne peuvent être effectuées que sous la direction et la surveillance d'un médecin ou d'une sage-femme. »

II. – L'article L. 1121-11 du même code est ainsi modifié :

1^o Après le troisième alinéa, sont insérés deux alinéas ainsi rédigés :

« Lorsque les recherches biomédicales concernent le domaine de la maïeutique et répondent aux conditions fixées au dernier alinéa de l'article L. 1121-5, les résultats de cet examen leur sont communiqués directement ou par l'intermédiaire du médecin ou de la sage-femme de leur choix. »

« Lorsque les recherches biomédicales concernent le domaine de l'odontologie, les résultats de cet examen leur sont communiqués directement ou par l'intermédiaire du médecin ou du chirurgien-dentiste de leur choix. » ;

2^o Au quatrième alinéa, la référence : « à l'alinéa précédent » est remplacée par la référence : « au troisième alinéa ».

III. – Après le huitième alinéa de l'article L. 1122-1 du même code, sont insérés deux alinéas ainsi rédigés :

« Lorsque la recherche biomédicale concerne le domaine de la maïeutique et répond aux conditions fixées au dernier alinéa de l'article L. 1121-5, l'investigateur peut confier à une sage-femme ou à un médecin le soin de communiquer à la personne qui se prête à cette recherche les informations susvisées et de recueillir son consentement. »

« Lorsque la recherche biomédicale concerne le domaine de l'odontologie, l'investigateur peut confier à un chirurgien-dentiste ou à un médecin le soin de communiquer à la personne qui se prête à cette recherche les informations susvisées et de recueillir son consentement. »

IV. – Le 2^o de l'article L. 1541-4 du même code est ainsi modifié :

1^o Au premier alinéa du b, le mot : « sixième » est remplacé par le mot : « septième » ;

2^o Au premier alinéa du c, le mot : « quatrième » est remplacé par le mot : « sixième ».

TITRE VII**RECHERCHE SUR L'EMBRYON
ET LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES****Article 40**

L'article L. 2151-2 du code de la santé publique est complété par un alinéa ainsi rédigé :

« La création d'embryons transgéniques ou chimériques est interdite. »

Article 41

L'article L. 2151-5 du même code est ainsi rédigé :

« Art. L. 2151-5. – I. – La recherche sur l'embryon humain, les cellules souches embryonnaires et les lignées de cellules souches est interdite. »

« II. – Par dérogation au I, la recherche est autorisée si les conditions suivantes sont réunies :

« 1° La pertinence scientifique du projet de recherche est établie ;

« 2° La recherche est susceptible de permettre des progrès médicaux majeurs ;

« 3° Il est expressément établi qu'il est impossible de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des cellules souches embryonnaires ou des lignées de cellules souches ;

« 4° Le projet de recherche et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

« Les recherches alternatives à celles sur l'embryon humain et conformes à l'éthique doivent être favorisées.

« III. – Une recherche ne peut être menée qu'à partir d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. La recherche ne peut être effectuée qu'avec le consentement écrit préalable du couple dont les embryons sont issus, ou du membre survivant de ce couple, par ailleurs dûment informés des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation. Dans le cas où le couple ou le membre survivant du couple consent à ce que ses embryons surnuméraires fassent l'objet de recherches, il est informé de la nature des recherches projetées afin de lui permettre de donner un consentement libre et éclairé. A l'exception des situations mentionnées au dernier alinéa de l'article L. 2131-4 et au troisième alinéa de l'article L. 2141-3, le consentement doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Dans tous les cas, le consentement des deux membres du couple ou du membre survivant du couple est révocable sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté.

« IV. – Les protocoles de recherche sont autorisés par l'Agence de la biomédecine après vérification que les conditions posées aux II et III du présent article sont satisfaites. La décision motivée de l'agence, assortie de l'avis également motivé du conseil d'orientation, est communiquée aux ministres chargés de la santé et de la recherche qui peuvent, lorsque la décision autorise un protocole, interdire ou suspendre la réalisation de ce protocole si une ou plusieurs des conditions posées aux II et III ne sont pas satisfaites.

« En cas de violation des prescriptions législatives et réglementaires ou de celles fixées par l'autorisation, l'agence suspend l'autorisation de la recherche ou la retire. Les ministres chargés de la santé et de la recherche peuvent, en cas de refus d'un protocole de recherche par l'agence, demander à celle-ci, dans l'intérêt de la santé publique ou de la recherche scientifique, de procéder dans un délai de trente jours à un nouvel examen du dossier ayant servi de fondement à la décision.

« V. – Les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation.

« VI. – A titre exceptionnel, des études sur les embryons visant notamment à développer les soins au bénéfice de l'embryon et à améliorer les techniques d'assistance médicale à la procréation ne portant pas atteinte à l'embryon peuvent être conduites avant et après leur transfert à des fins de gestation si le couple y consent, dans les conditions fixées au IV. »

Article 42

Le Gouvernement présente au Parlement, avant le 1^{er} juillet 2012, un rapport relatif aux conditions de mise en place de centres de ressources biologiques sous la forme d'un système centralisé de collecte, de stockage et de distribution des embryons surnuméraires dont il a été fait don à la science.

Article 43

Le titre V du livre I^{er} de la deuxième partie du code de la santé publique est ainsi modifié :

1° Dans l'intitulé, après le mot : « cellules », il est inséré le mot : « souches » ;

2° L'article L. 2151-6 est ainsi modifié :

a) Au premier alinéa, au début de la première phrase, les mots : « L'importation de tissus ou de cellules embryonnaires ou fœtaux » sont remplacés par les mots : « L'importation de cellules souches embryonnaires » et, à la seconde phrase, les mots : « tissus ou cellules ont été obtenus » sont remplacés par les mots : « cellules souches ont été obtenues » ;

b) Le second alinéa est ainsi modifié :

– au début de la première phrase, les mots : « L'exportation de tissus ou de cellules embryonnaires ou fœtaux » sont remplacés par les mots : « L'exportation de cellules souches embryonnaires » ;

– la seconde phrase est supprimée ;

3° L'article L. 2151-7 est ainsi modifié :

a) Au premier alinéa, les mots : « scientifiques, la conservation » sont remplacés par les mots : « de recherche, la conservation d'embryons ou » ;

b) A l'avant-dernier alinéa, les mots : « à des fins scientifiques de cellules souches embryonnaires » sont remplacés par les mots : « d'embryons ou de cellules souches embryonnaires à des fins de recherche » ;

c) A la première phrase du dernier alinéa, après le mot : « céder », sont insérés les mots : « des embryons ou » ;

4° A la fin de l'article L. 2151-8, les mots : « sur des embryons humains » sont remplacés par les mots : « sur des embryons et sur des cellules souches embryonnaires ».

Article 44

Dans un délai d'un an à compter de la publication de la présente loi, le Gouvernement remet un rapport au Parlement sur les pistes de financement, notamment public, et de promotion de la recherche en France sur les cellules souches adultes et issues du cordon ombilical ainsi que sur les cellules souches pluripotentes induites.

TITRE VIII

NEUROSCIENCES ET IMAGERIE CÉRÉBRALE

Article 45

I. – Le titre I^{er} du livre I^{er} du code civil est complété par un chapitre IV ainsi rédigé :

« CHAPITRE IV

« *De l'utilisation des techniques d'imagerie cérébrale*

« Art. 16-14. – Les techniques d'imagerie cérébrale ne peuvent être employées qu'à des fins médicales ou de recherche scientifique, ou dans le cadre d'expertises judiciaires. Le consentement exprès de la personne doit être recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle a été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionne la finalité de l'examen. Il est révocable sans forme et à tout moment. »

II. – Après le titre III du livre I^{er} de la première partie du code de la santé publique, il est inséré un titre III *bis* ainsi rédigé :

« TITRE III BIS

« *NEUROSCIENCES ET IMAGERIE CÉRÉBRALE*

« CHAPITRE UNIQUE

« Art. L. 1134-1. – Un arrêté du ministre chargé de la santé définit les règles de bonnes pratiques applicables à la prescription et à la réalisation des examens d'imagerie cérébrale à des fins médicales. Ces règles tiennent compte des recommandations de la Haute Autorité de santé. »

TITRE IX

APPLICATION ET ÉVALUATION DE LA LOI RELATIVE À LA BIOÉTHIQUE

Article 46

Le code de la santé publique est ainsi modifié :

1° Après l'article L. 1412-1, il est inséré un article L. 1412-1-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 1412-1-1. – Tout projet de réforme sur les problèmes éthiques et les questions de société soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé doit être précédé d'un débat public sous forme d'états généraux. Ceux-ci sont organisés à l'initiative du Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, après consultation des commissions parlementaires permanentes compétentes et de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

« A la suite du débat public, le comité établit un rapport qu'il présente devant l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, qui procède à son évaluation.

« En l'absence de projet de réforme, le comité est tenu d'organiser des états généraux de la bioéthique au moins une fois tous les cinq ans. » ;

2° Après l'article L. 1412-3, il est inséré un article L. 1412-3-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 1412-3-1. – Les états généraux mentionnés à l'article L. 1412-1-1 réunissent des conférences de citoyens choisis de manière à représenter la société dans sa diversité. Après avoir reçu une formation préalable, ceux-ci débattent et rédigent un avis ainsi que des recommandations qui sont rendus publics. Les experts participant à la formation des citoyens et aux états généraux sont choisis en fonction de critères d'indépendance, de pluralisme et de pluridisciplinarité. »

Article 47

I. – La présente loi fait l'objet d'un nouvel examen d'ensemble par le Parlement dans un délai maximal de sept ans après son entrée en vigueur.

II. – Elle fait en outre l'objet, dans un délai de six ans, d'une évaluation de son application par l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

Article 48

Le premier alinéa de l'article L. 1412-3 du code de la santé publique est complété par une phrase ainsi rédigée :

« Ce rapport comporte une analyse des problèmes éthiques soulevés dans les domaines de compétence de l'Agence de la biomédecine et dans le domaine des neurosciences. »

Article 49

Après le premier alinéa de l'article L. 1412-6 du même code, il est inséré un alinéa ainsi rédigé :

« Ils établissent chaque année un rapport d'activité qui est communiqué au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé ; celui-ci en fait la synthèse dans le rapport annuel mentionné à l'article L. 1412-3. »

Article 50

I. – L'article L. 1418-1 du même code est ainsi modifié :

1° Le 9° est ainsi rédigé :

« 9° De mettre à disposition du public une information sur l'utilisation des tests génétiques en accès libre et d'élaborer un référentiel permettant d'en évaluer la qualité ; »

2° Après le 12°, il est inséré un 13° ainsi rédigé :

« 13° D'assurer une information permanente du Parlement et du Gouvernement sur le développement des connaissances et des techniques dans le domaine des neurosciences. » ;

3° Le dernier alinéa est ainsi rédigé :

« Le directeur général et le président du conseil d'orientation de l'Agence de la biomédecine peuvent demander à être entendus par l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques si le développement des connaissances et des techniques dans les activités relevant de la compétence de l'agence ou dans le domaine des neurosciences est susceptible de poser des problèmes éthiques nouveaux. »

II. – Après le même article L. 1418-1, il est inséré un article L. 1418-1-1 ainsi rédigé :

« *Art. L. 1418-1-1.* – L'Agence de la biomédecine établit un rapport annuel d'activité qui est rendu public et qu'elle adresse au Parlement, qui en saisit l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, au Gouvernement et au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé.

« Ce rapport expose les principaux développements des connaissances et des techniques pour les activités relevant de sa compétence ainsi que dans le domaine des neurosciences.

« Il comporte également :

« 1° Une analyse des autorisations et agréments accordés au titre des 10° et 11° de l'article L. 1418-1 ainsi que les avis du conseil d'orientation ;

« 2° Une évaluation de l'état d'avancement des recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires, incluant un comparatif avec les recherches concernant les cellules souches adultes, les cellules pluripotentes induites et les cellules issues du sang de cordon, du cordon ombilical et du placenta, ainsi qu'un comparatif avec la recherche internationale ;

« 3° Un bilan sur la mise en œuvre des diagnostics préimplantatoire et prénatal ;

« 4° Un état des lieux d'éventuels trafics d'organes ou de gamètes et des mesures de lutte contre ces trafics.

« Sous réserve de l'application des deuxième et troisième alinéas de l'article 48 de la Constitution, ce rapport fait l'objet d'un débat devant chaque assemblée parlementaire dans le cadre d'une semaine de séance réservée au contrôle de l'action du Gouvernement et à l'évaluation des politiques publiques. »

Article 51

L'Institut national de la santé et de la recherche médicale remet, avant le 30 juin 2012, au Parlement un rapport sur la recherche sur les causes de la stérilité.

Article 52

Après la première phrase du troisième alinéa de l'article L. 1418-6 du code de la santé publique, sont insérées trois phrases ainsi rédigées :

« Ils adressent au directeur général, à l'occasion de leur nomination ou de leur entrée en fonctions, puis annuellement, une déclaration mentionnant leurs liens, directs ou indirects, avec les entreprises ou

établissements dont les activités entrent dans le champ de compétence de l'agence ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les secteurs correspondants. Cette déclaration est actualisée à leur initiative dès qu'une modification intervient concernant ces liens ou que de nouveaux liens sont noués. Elle est rendue publique. »

Article 53

Après l'article L. 2151-7 du même code, il est inséré un article L. 2151-7-1 ainsi rédigé :

« *Art. L. 2151-7-1.* – Aucun chercheur, aucun ingénieur, technicien ou auxiliaire de recherche quel qu'il soit, aucun médecin ou auxiliaire médical n'est tenu de participer à quelque titre que ce soit aux recherches sur des embryons humains ou sur des cellules souches embryonnaires autorisées en application de l'article L. 2151-5. »

Article 54

Au plus tard un an après la promulgation de la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, le Gouvernement remet au Parlement un rapport portant sur les enjeux éthiques des sciences émergentes, et notamment de la convergence entre les nanotechnologies, les biotechnologies, l'informatique et les sciences cognitives. Ce rapport est rendu public.

Article 55

Au deuxième alinéa de l'article L. 1418-4 du code de la santé publique, après le mot : « président », sont insérés les mots : « , trois députés et trois sénateurs ».

TITRE X

DISPOSITIONS RELATIVES À L'OUTRE-MER

Article 56

I. – Dans les conditions prévues à l'article 38 de la Constitution, le Gouvernement est autorisé à prendre par ordonnances, dans un délai de douze mois à compter de la promulgation de la présente loi, les mesures législatives nécessaires à l'extension et à l'adaptation des dispositions de la présente loi dans les territoires des îles Wallis et Futuna et des Terres australes et antarctiques françaises et, en tant qu'elles concernent les compétences de l'Etat, en Polynésie française et en Nouvelle-Calédonie.

II. – Un projet de loi de ratification des ordonnances prévues au présent article est déposé devant le Parlement au plus tard six mois à compter de la publication des ordonnances.

TITRE XI

DISPOSITIONS TRANSITOIRES ET DIVERSES

Article 57

I. – Jusqu'à la publication de l'arrêté du ministre chargé de la santé mentionné au premier alinéa de l'article L. 2141-1 du code de la santé publique et au plus tard dans un délai d'un an à compter de la publication de la présente loi, les établissements et laboratoires mentionnés à l'article L. 2142-1 du même code continuent à mettre en œuvre les procédés biologiques régulièrement utilisés à cette date.

II. – A titre transitoire, jusqu'à la date de publication du décret en Conseil d'Etat qui, sur le fondement de l'article L. 2151-8 du même code, prévoira les modalités d'application des dispositions introduites par la présente loi au titre V du livre I^{er} de la deuxième partie dudit code, les recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires sont autorisées selon le régime en vigueur au 1^{er} janvier 2011.

La présente loi sera exécutée comme loi de l'Etat.

Fait à Paris, le 7 juillet 2011.

NICOLAS SARKOZY

Par le Président de la République :

Le Premier ministre,
FRANÇOIS FILLON

*Le ministre d'Etat,
ministre des affaires étrangères
et européennes,*
ALAIN JUPPÉ

*Le garde des sceaux,
ministre de la justice et des libertés,*
MICHEL MERCIER

*Le ministre du travail,
de l'emploi et de la santé,*
XAVIER BERTRAND

*Le ministre de l'enseignement supérieur
et de la recherche,*
LAURENT WAUQUIEZ

*Le ministre de l'intérieur,
de l'outre-mer, des collectivités territoriales
et de l'immigration,*
CLAUDE GUÉANT

*La ministre du budget, des comptes publics
et de la réforme de l'État,
porte-parole du Gouvernement,*
VALÉRIE PÉCRESSE

*La ministre auprès du ministre de l'intérieur,
de l'outre-mer, des collectivités territoriales
et de l'immigration, chargée de l'outre-mer,*
MARIE-LUCE PENCHARD

(1) *Travaux préparatoires* : loi n° 2011-814.

Assemblée nationale :

Projet de loi n° 2911 ;

Rapport de M. Jean Leonetti, au nom de la commission spéciale chargée d'examiner le projet de loi relatif à la bioéthique, n° 3111 ;

Discussion les 8, 9 et 10 février 2011 et adoption le 15 février 2011 (TA n° 606).

Sénat :

Projet de loi, adopté par l'Assemblée nationale, n° 304 (2010-2011) ;

Rapport de M. Alain Milon, au nom de la commission des affaires sociales, n° 388 (2010-2011) ;

Avis de M. François-Noël Buffet, au nom de la commission des lois, n° 381 (2010-2011) ;

Texte de la commission n° 389 (2010-2011) ;

Discussion les 5, 6, 7 et 8 avril 2011 et adoption le 8 avril 2011 (TA n° 95, 2010-2011).

Assemblée nationale :

Projet de loi, modifié par le Sénat, n° 3324 ;

Rapport de M. Jean Leonetti, au nom de la commission spéciale chargée d'examiner le projet de loi relatif à la bioéthique, n° 3403 ;

Discussion les 24 et 25 mai 2011 et adoption le 31 mai 2011 (TA n° 671).

Sénat :

Projet de loi, adopté avec modifications par l'Assemblée nationale, n° 567 (2010-2011) ;

Rapport de M. Alain Milon, au nom de la commission des affaires sociales, n° 571 (2010-2011) ;

Texte de la commission n° 572 (2010-2011) ;

Discussion les 8 et 9 juin 2011 et adoption le 9 juin 2011 (TA n° 139, 2010-2011) ;

Assemblée nationale :

Projet de loi, modifié par le Sénat en deuxième lecture, n° 3526 ;

Rapport de M. Jean Leonetti, au nom de la commission mixte paritaire, n° 3536 ;

Discussion et adoption le 21 juin 2011 (TA n° 690).

Sénat :

Rapport de M. Alain Milon, au nom de la commission mixte paritaire, n° 637 (2010-2011) ;

Texte de la commission n° 638 (2010-2011) ;

Discussion et adoption le 23 juin 2011 (TA n° 146, 2010-2011).

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27/09/2011

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**présenté par **Loïc REPPEL**

Sujet : L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire
et en ingénierie tissulaire : nouvelle approche thérapeutique ?
Application à l'ingénierie du cartilage.

Jury :

Président : M. Pierre LABRUDE, Professeur, Faculté de
Pharmacie de Nancy.

Directeurs : Mme Danièle BENSOUSSAN, Praticien
Hospitalier, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de
Nancy.

Mme Céline HUSELSTEIN, Maître de
Conférences-HDR, Faculté de Médecine de Nancy.

Juge : M. Didier Mainard, Professeur, Faculté de
Médecine de Nancy.

Vu,

Nancy, le 26 Août 2011

Le Président du Jury

Les Directeurs de Thèse


M. Pierre LABRUDE
Mme Danièle BENSOUSSAN
Mme Céline HUSELSTEIN

Vu et approuvé,

Nancy, le 02.09.2011

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine KEDZIEREWICZ

Vice-doyen



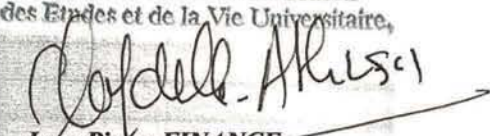
Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 8.9.2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,


Jean-Pierre FINANCE
C. CAPDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3704

TITRE

**L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire : nouvelle approche thérapeutique ?
Application à l'ingénierie du cartilage**

Thèse soutenue le 27 Septembre 2011

Par Loïc REPPEL

RESUME :

Aujourd'hui, les cellules souches humaines représentent, pour les scientifiques et les cliniciens, un espoir thérapeutique majeur. Leur capacité d'autorenouvellement et de prolifération *in vitro* permettraient de constituer des lots de cellules, de grade clinique, en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique. Par ailleurs, leur potentiel de différenciation permettrait d'utiliser ces cellules souches (CS) à des fins de réparation tissulaire et de médecine régénératrice suite à une lésion tissulaire accidentelle ou pathologique. Les différentes populations de CS humaines possèdent des caractéristiques propres permettant d'envisager leur utilisation thérapeutique à plus ou moins long terme.

En 2011, la loi de bioéthique, qui encadre, entre autres, l'utilisation des CS, a fait l'objet d'une révision. Cette nouvelle loi maintient l'interdiction d'effectuer des recherches sur les cellules souches embryonnaires sauf dérogations spéciales. A présent, elle régit de façon précise l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques provenant du sang placentaire.

Face aux traitements actuels des lésions cartilagineuses, non satisfaisants à long terme, l'utilisation de CS, et notamment les cellules souches mésenchymateuses (CSM), en tant que produit de thérapie cellulaire, a montré des résultats très encourageants. De plus, ces CSM se sont trouvées être d'excellentes candidates à l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette dernière consiste, à partir de cellulesensemencées dans un biomatériau fonctionnalisé, à préparer *in vitro*, un néo-tissu cartilagineux qui sera réimplanté au niveau d'une lésion chondrale.

L'objectif de notre travail expérimental est de développer un biomatériau stratifié,ensemencé en CSM et qui sera fonctionnalisé à l'aide de contraintes mécaniques (compression dynamique intermittente, CDI). Nous avons montré qu'il était possible de construire, par pulvérisation alternative, un biomatériau stratifiéensemencé en CSM et de guider leur différenciation par CDI. La réponse cellulaire aux CDI est apparue différente selon la composition de la matrice dans laquelle se trouvaient les cellules.

MOTS CLES : Cellules souches, loi de bioéthique, thérapie cellulaire, ingénierie tissulaire, cartilage, cellules souches mésenchymateuses, biomatériau stratifié, contraintes mécaniques.

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Danièle BENSOUSSAN Céline HUSELSTEIN	Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires Faculté de Médecine, Nancy	Expérimentale ☒ Bibliographique ☒ Thèmes 1, 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle