

poreux et l'ensemble est transplanté. Cette approche aura un intérêt particulier chez les patients âgés dont le nombre de cellules souches est limité, mais encore faudra-t-il que le transplant s'intègre dans le tissu environnant.

## La source des cellules souches

Pour régénérer les tissus squelettiques, on pourrait théoriquement utiliser toute cellule souche ayant un fort potentiel de prolifération et capable de se différencier en cellules squelettiques. Cependant, alors que la vie du patient n'est pas menacée, il paraît difficile d'envisager l'utilisation de cellules souches issues d'un donneur nécessitant l'administration à vie d'immunosuppresseurs pour éviter le rejet des cellules greffées.

C'est pourquoi, dans ce cas, les cellules souches embryonnaires ne semblent pas une solution réaliste à court terme. Néanmoins, le développement de banques de cellules souches embryonnaires, compatibles avec les antigènes du soi existant dans la population, pallierait cette difficulté. Cette approche éviterait les risques d'incompatibilité immunologique et garantirait un approvisionnement suffisant en cellules souches dans les cas d'urgence. Toutefois, jusqu'à présent, la majorité des études ont été effectuées avec des cellules souches adultes autologues (issues du patient lui-même), car elles évitent les problèmes de compatibilité immunologique.

Où peut-on prélever ces cellules chez le patient ? Le tissu source idéal serait riche en cellules souches capables de proliférer de se différencier en cellules squelettiques, et leur prélèvement serait peu invasif. Bien que l'on ait démontré la présence de cellules souches squelettiques dans de nombreux tissus, dont le tissu adipeux ou le muscle, la moelle osseuse reste la principale source de cellules souches pour la médecine régénératrice du squelette.

La moelle osseuse est une source majeure de cellules souches pluripotentes hématopoïétiques (cellules primitives ayant un haut pouvoir de prolifération et de différenciation vers toutes les lignées de cellules sanguines), mais c'est aussi un réservoir de cellules souches non hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules contribueraient à la régénération des tissus d'origine mésenchymateuse (os, cartilage, tendon, tissu adipeux, etc.). On les isole assez facilement à partir d'un prélèvement de moelle osseuse, et on sait les amplifier : après quelques semaines de culture, on obtient une centaine de millions de cellules à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Cependant, elles ne prolifèrent pas de façon infinie et après 30 à 40 divisions, elles meurent. Lorsqu'elles sont utilisées sous forme d'allogreffes, elles ne semblent pas engendrer de réactions de rejet, car elles auraient des propriétés immunosuppressives. De ce fait, on pourrait envisager la constitution de banques de cellules souches mésenchymateuses

## Des cellules souches au cartilage

Après avoir obtenu une quantité suffisante de cellules souches, encore faut-il les assembler en une structure tridimensionnelle capable, après transplantation, de se transformer en un tissu fonctionnel. Toutefois, l'enjeu semble davantage d'orienter les cellules vers le phénotype désiré (os ou cartilage) que d'organiser ces cellules en un tissu dont

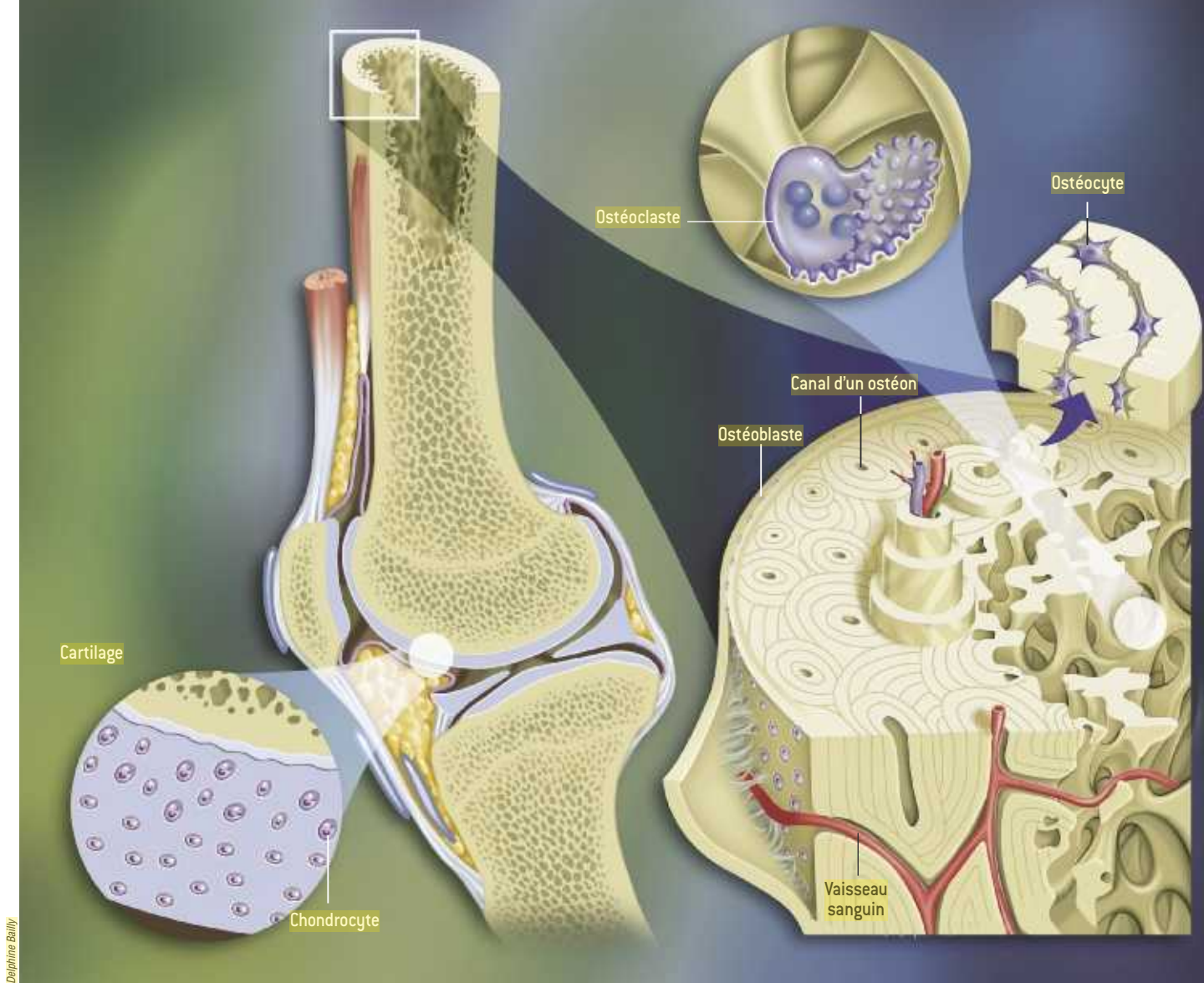
la micro-architecture serait identique à celle du tissu à réparer : l'étape d'organisation des cellules s'effectuera après transplantation chez le patient et dépendra surtout du biomatériau où les cellules auront été ensemencées et de l'environnement biomécanique du transplant.

La cascade biologique conduisant, lors du développement embryonnaire, à la formation de cartilage chez l'embryon à partir de cellules souches est complexe. Elle est régulée par des molécules bioactives (de nombreux facteurs de croissance) et par l'environnement biophysique (concentration en oxygène, sollicitations mécaniques). Les protocoles expérimentaux utilisés pour déclencher la différenciation des cellules souches en chondrocytes recréent *in vitro* une version simplifiée de leur environnement naturel. L'engagement vers la voie chondrocytaire est amorcé par le facteur de croissance TGF $\beta$ 1 ajouté au milieu de culture. Certains protocoles de culture stimulent la différenciation en chondrocytes par le biais de différents facteurs et en imposant des sollicitations mécaniques proches de celles subies par le cartilage ou une faible concentration en oxygène (le cartilage n'étant pas vascularisé, les cellules sont exposées à une concentration en oxygène très inférieure à celle du reste de l'organisme).

Toute cellule mésenchymateuse produit spontanément en culture des macromolécules s'auto-assemblant en une matrice extracellulaire, laquelle interagit directement avec la cellule et module ses propriétés d'adhérence, de migration, de prolifération, d'apoptose (la mort cellulaire programmée) et de différenciation. Hélas, l'essentiel de cette matrice se dissout rapidement dans le milieu de culture et la cellule doit sans cesse recommencer son travail de Sisyphe et reconstruire son environnement. Afin de pallier cette difficulté, les cellules sont, de plus en plus souvent, cultivées sur des hydrogels qui retiennent les macromolécules synthétisées permettant aux cellules d'élaborer progressivement un environnement macromoléculaire de type cartilage et de renforcer leur identité. Ces hydrogels d'origine naturelle ou synthétique ont aussi pour rôle de faciliter l'intégration à la lésion du cartilage préparé en laboratoire. Plusieurs équipes recherchent actuellement des supports injectables offrant des niches propices à la différenciation des cellules souches en chondrocytes, par exemple des matrices qui polymérisent *in situ* sous l'action d'ultraviolets.

Aujourd'hui, on sait obtenir à partir de cellules souches mésenchymateuses des cellules exprimant les marqueurs spécifiques des chondrocytes. Il faudra vérifier que les cellules cartilagineuses obtenues expriment uniquement les marqueurs chondrocytaires et n'ont pas une « double identité » (par exemple os-cartilage) et que les cellules gardent leurs caractéristiques de chondrocytes après transplantation. Malgré ces difficultés techniques, et même s'il n'existe pas encore d'études cliniques publiées prouvant l'efficacité de cette stratégie thérapeutique, l'obtention de chondrocytes à partir de cellules souches adultes est la voie d'avenir, car, à terme, elle permettrait l'obtention aisée d'un nombre important de cellules fonctionnelles à partir d'un prélèvement limité.

La transplantation de chondrocytes autologues est aujourd'hui la seule stratégie thérapeutique utilisée pour régénérer le cartilage en clinique. Le chirurgien prélève sous arthroscopie des petits copeaux de cartilage articulaire au niveau de zones non portantes (généralement en périphérie)



**2. Structure de l'os et du cartilage.** Le cartilage est un tissu homogène, une sorte de gel dense non vascularisé et contenant des chondrocytes. L'os est traversé de nombreux canaux où passent les vaisseaux sanguins et les nerfs. L'unité structurale de l'os compact est nommée ostéon. Chaque ostéon est constitué d'un ensemble de cylindres creux emboîtés, l'ensemble formant un cylindre orienté

selon l'axe de l'os. Chacun des cylindres est une lamelle constituée de fibres de collagène parallèles, et les fibres de deux lamelles adjacentes sont toujours orientées dans des directions différentes, ce qui confère sa résistance au matériau. Les ostéoblastes fabriquent la matrice osseuse, les ostéocytes assurent l'entretien de la matrice osseuse que les ostéoclastes résorbent.

et il les envoie à un centre de thérapie cellulaire. Là, les chondrocytes sont isolés de leur matrice, puis cultivés et multipliés (pour obtenir entre 3 et 30 millions de cellules). Ces cellules sont alors réinjectées dans la lésion sans support. Le faible potentiel de prolifération des chondrocytes et l'absence de matériau support limitent les indications cliniques de cette technique au comblement de perte de substance cartilagineuse d'origine traumatique chez le patient jeune. La méthode ne s'adresse pas pour l'instant aux lésions arthrosiques ou aux lésions d'origine inflammatoire même si, à moyen terme, le but sera de traiter des débuts d'arthrose par thérapie cellulaire afin de retarder la mise en place d'une prothèse.

## Le cas de l'os

Les cellules souches mésenchymateuses sont aussi utilisées pour préparer du tissu osseux au laboratoire. Dans ce cas, elles sont mises en culture pour qu'elles se multiplient et se différencient en un phénotype osseux. La veille de la chirurgie, les cellules sont placées sur un biomatériau poreux

et résorbable. Les résultats précliniques de ces études sont très encourageants puisque, chez l'animal, on répare de grandes pertes de substance osseuse. Les cellules peuvent être cultivées sur un biomatériau poreux ; l'ensemble est placé dans un bioréacteur, où les fluides en mouvement stimulent la production de tissu par les cellules. On a observé que la production de tissu minéralisé par des cellules osseuses est multipliée par six quand on met en mouvement le fluide où elles se développent.

La transplantation de ces cellules exige un support physique sur lequel les cellules adhèrent, migrent, prolifèrent et se différencient. Il doit être poreux, pour permettre à de nombreuses cellules de s'y développer et pour autoriser une revascularisation rapide de l'implant. La lésion est progressivement recolonisée par de l'os, et le matériau support se « dissout ». Les matrices préparées à partir de polymères naturels sont généralement bien tolérées par l'organisme. En ingénierie tissulaire osseuse, les céramiques à base de phosphate ou carbonate de calcium ont donné jusqu'à présent les meilleurs résultats.