

UNIVERSITE DE STRASBOURG  
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2016

N°33

**THESE**

Présentée pour le Diplôme d'Etat De Docteur en Chirurgie Dentaire  
le 17 octobre 2016

par

**CUISINIER Raphaëlle**

Née le 27 mars 1992, à Strasbourg (67000)

**L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES  
DENTAIRES : UNE AVANCEE MEDICALE A FORT  
POTENTIEL ?**

**Président :** M. le Professeur HAIKEL Youssef  
**Assesseurs :** M. le Professeur HUCK Olivier  
Mme. le Docteur FIORETTI Florence  
Mme. le Docteur BENKIRANE-JESSEL Nadia  
**Invité :** M. le Professeur CUISINIER Frédéric

# SOMMAIRE

<b>1. Qu'est ce qu'une cellule souche ? et en particulier une cellule souche d'origine dentaire ?</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Définition d'une cellule souche</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Les différents types de cellules souches</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Origine des cellules souches.....	9
1.2.2 Classement des cellules souches .....	13
1.2.3 Le concept de niche cellulaire .....	16
<b>1.3 Les cellules souches mésenchymateuses orales</b> .....	<b>17</b>
1.3.1 L'organe dentaire.....	17
1.3.2 Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses .....	20
1.3.3 Les MSCs issues de la moëlle osseuse : BMMSCs (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells).....	22
1.3.4 Les cellules souches de la pulpe dentaire : DPSCs (Dental Pulp Stem Cells) .....	23
1.3.5 Les dents déciduales exfoliées : SHED (Stem Cells from Human exfoliated deciduous teeth).....	25
1.3.6 Le ligament parodontal : PDLSCs (Periodontal Ligament Stem Cells) .....	26
1.3.7 La zone de la papille dentaire apicale : SCAPs (Stem Cells From Apical Papilla).....	27
1.3.8 Le follicule dentaire : DFPCs (Dental Follicle Precursor Cells) .....	29
1.3.9 Comparaison des potentiels entre les différentes sources de cellules souches dentaires.....	30
<b>2. Extraction, isolation des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs)</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Information du patient, prélèvement dentaire et isolement pulpaire</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2 Isolation des cellules souches</b> .....	<b>34</b>
2.2.1 Les techniques d'isolation des cellules souches dentaires : .....	34
2.2.2 Tri et filtration cellulaire : les techniques de purifications .....	37
<b>2.3 La mise en culture des cellules souches</b> .....	<b>40</b>
<b>2.4 La cryopréservation des cellules souches dentaires</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5 La comparaison des cellules souches mésenchymateuses dentaires : ambigüités et facteurs de variation</b> .....	<b>42</b>

<b>3. Les cellules souches adipeuses, une alternative envisageable aux cellules souches dentaires ? .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 La valeur de ces cellules souches.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 L'utilisation des ASCs en dentisterie .....</b>	<b>45</b>
<b>4. La conservation des cellules souches : biobanques, éthique et législation... 46</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Existe t'il une modification du potentiel des cellules souches autologues au cours du vieillissement ? Si oui, cela impose t'il la nécessité du développement des biobanques à usage privé ? .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 La place des biobanques dans le développement des médecines régénératives .....</b>	<b>48</b>
4.2.1 La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire .....	48
4.2.2 Les acteurs de la médecine régénérative.....	49
4.2.3 Allogénique ou autologue ? .....	50
4.2.4 La stabilité génomique, un risque majeur de la médecine régénérative .....	51
4.2.5 Les modèles animaux de la recherche en médecine régénérative : un souci pour l'extrapolation à l'Homme ? .....	52
4.2.6 La place de la France dans la recherche sur l'évolution des médecines régénératives .....	53
<b>4.3 Réglementation en vigueur .....</b>	<b>54</b>
4.3.1 La loi de bioéthique .....	54
4.3.2 Sur la recherche et la thérapie cellulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses dentaires .....	56
4.3.3 Sur les biobanques.....	57
4.3.4 Sur les brevets.....	58
<b>4.4 La mise en réseau des biobanques : challenges pour parvenir à une harmonisation.....</b>	<b>59</b>
4.4.1 La différence entre standardisation et harmonisation.....	59
4.4.2 La gouvernance des biobanques .....	60
4.4.3 Législation comparée des biobanques .....	62
<b>4.5 Éthique .....</b>	<b>64</b>
4.5.1 Le consentement.....	65
4.5.2 Confidentialité, intimité et protection des données .....	68
4.5.3 Biobanques et médecine personnalisée.....	68

## TABLE DES ABBREVIATIONS

<b>ABMSCs</b> : Alveolar Bone Marrow Stem Cells	<b>ES</b> : Embryonic Stem cells
<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>ESTO</b> : European Science and Technology Observatory
<b>ABM</b> : Agence de la BioMédecine	
<b>AFSSAPS</b> : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé	<b>FACS</b> : Fluorescent Activated Cell Sorting
<b>ANSM</b> : Agence Nationale de Sécurité du Médicament	<b>HLA</b> : Human Leukocyte Antigen
<b>ASCs</b> : Adipose Stem Cells	<b>iPS</b> : induce Pluripotent Stem cells
	<b>IPTS</b> : Institut for Prospective Technological Studies
<b>BBMRI</b> : Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure	<b>ISCT</b> : International Society for Cellular Therapy
<b>BMMSC</b> : Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells	
	<b>MACS</b> : Magnetic Activated Cell Sorting
<b>CCNE</b> : Comité Consultatif National d'Éthique	<b>MSC</b> : Mesenchymal Stem Cell
<b>CFU-F</b> : Colony-Forming Unit Fibroblast	<b>OCDE</b> : Organisation de Coopération et de Développement Économique
<b>CNIL</b> : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés	<b>OEB</b> : Office Européen des Brevets
<b>DFSCs</b> : Dental Follicle Stem Cells	<b>PDLSCs</b> : Periodontal Ligament Stem Cells
<b>DPI</b> : Diagnostic Pré Implantaire	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin
<b>DPSCs</b> : Dental Pulp Stem Cells	
<b>DSCs</b> : Dental Stem Cells	
	<b>SCAP</b> : Stem Cells of Apical Papilla
<b>EDTA</b> : Ethylène Diamine TétraAcétique	<b>SHED</b> : Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth
<b>EMA</b> : European Medicines Agency	<b>SNP</b> : Single Nucléotide Polymorphism

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Illustration 1 : Génération d'iPS présentant des caractéristiques proches des ES tout en provenant d'individus adultes.....</i>	<i>15</i>
<i>Illustration 2 : Schéma représentant les différents stades de formation d'une dent. Tout d'abord à gauche, la placode dentaire puis le bourgeon, la cupule, la cloche et enfin l'organe dentaire .....</i>	<i>18</i>
<i>Illustration 3 : Représentation de quelques différenciations possibles des cellules souches dentaires.....</i>	<i>18</i>
<i>Illustration 4 : Localisation des cellules souches d'origines dentaire en fonction du développement de la dent, d'après Egusa et al (8) .....</i>	<i>19</i>
<i>Illustration 5 : Marqueurs de surfaces principaux retrouvés chez DSCs et BMMSCs. 20</i>	
<i>Illustration 6 : Photo représentant une dent de sagesse humaine ainsi que le ligament périodontal attaché à la surface radiculaire. Photo prise par l'équipe de recherche du Pr Séo (26). .....</i>	<i>27</i>
<i>Illustration 7 : Situation anatomique des SCAPs et de leur prélèvement ; en A, photographie de la dent et de son tissu; en B, coloration à l'hématoxylineéosine d'une racine en développement ; en C, illustration du prélèvement de la papille apicale (23). .....</i>	<i>28</i>
<i>Illustration 8 : en A, germe de la troisième molaire mandibulaire et son sac folliculaire ; en B, dent extraite avec son sac folliculaire ; en C, isolation du sac folliculaire. Le tout fût réalisé par l'équipe de recherche de M. Chen (65).....</i>	<i>29</i>
<i>Illustration 9 Tableau récapitulatif des capacités de différenciations in vitro et in vivo des cellules souches dentaires d'après les travaux de Liu et son équipe (69).....</i>	<i>30</i>
<i>Illustration 10 : Procédés d'extraction de la pulpe d'une dent. En A, la dent est sectionnée à l'aide d'un disque diamanté ; en B, on observe la pulpe (72).....</i>	<i>33</i>
<i>Illustration 11 : Fragmentation de la pulpe à l'aide d'un scalpel avant l'isolation des DPSCs (80).....</i>	<i>34</i>
<i>Illustration 12 : Culture d'explants dans le processus d'isolation des DPSCs dans un milieu de culture contenant de la streptomycine, de la pénicilline et de l'amphotéricine B. Photos réalisées par une équipe de recherche sous la direction de M. Guzman-Uribe (80) .....</i>	<i>36</i>

Illustration 13 : Schémas représentant en A la cytométrie de flux et en B le tri cellulaire magnétique .....	38
<i>Illustration 14 : Schéma représentant la fixation de la molécule fluorescente sur la cellule souche .....</i>	<i>39</i>
<i>Illustration 15 : Photos montrant les cuves d'azote de l'unité de Thérapie Cellulaire du CHRU de Montpellier.....</i>	<i>42</i>
<i>Illustration 16 : Cartographie de la recherche mondiale sur la médecine régénérative en 2016.....</i>	<i>53</i>
<i>Illustration 17 : Cartographie Européenne de la recherche sur la médecine régénérative en 2016.....</i>	<i>53</i>

# INTRODUCTION

Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes en quantités variables au sein des conjonctifs de l'ensemble de l'organisme, dont la cavité orale. Elles possèdent la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire.

L'engouement envers ces cellules est parfaitement illustré dans la littérature par une croissance exponentielle des publications les concernant.

Par ailleurs, la médecine personnalisée basée sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses dentaires apparaît comme une voie prometteuse dans le développement des thérapies cellulaires et de l'ingénierie tissulaire.

Elles représentent une source très accessible de cellules souches, notamment au niveau des germes des dents de sagesse qui sont extraites et jetées quotidiennement dans les cabinets dentaires.

Toutefois, dans l'objectif d'un usage autologue hypothétique, ces cellules ont le gros inconvénient de nécessiter une cryoconservation. Actuellement, le développement des banques de stockage, couramment appelées biobanques, met les cellules souches face à une nouvelle problématique industrielle et commerciale qui divise les états.

Par exemple, la législation française n'autorise pas le développement de biobanques à usage autologue, les seules existantes étant réservées à la recherche scientifique ou éventuellement à une utilisation allogénique non lucrative. Tandis qu'en Suisse, ces banques de stockage sont déjà effectives.

Ce manque d'homogénéité entre les pays entraîne une absence d'uniformité des données et des échantillons, nuisant ainsi à la collaboration internationale.

Il est nécessaire de préciser que les applications cliniques chez l'homme restent limitées et sont loin d'être arrivées à maturité, ce qui impose de rester prudent vis à vis du stockage systématique de ces cellules. Les risques observés, lors d'études sur des animaux, ne sont pas anodins et portent sur la formation de tumeurs, de réponses immunitaires non désirées et la transmission accidentelle d'agents pathogènes.

En outre, le stockage à long terme est relativement onéreux, risquant de conduire à une forte discrimination entre ceux pouvant s'acquitter des frais de prestations et les autres.

En l'état actuel des choses, peut-on fonder un échange à but commercial sur une perspective thérapeutique encore incertaine ?

Dans un premier temps, nous présenterons ce que sont les cellules souches et en particulier celles d'origine dentaire.

Nous aborderons ensuite les procédés utilisés pour les isoler, les trier et les conserver.

Dans une troisième partie, nous évoquerons les cellules souches adipeuses comme une autre source cellulaire prometteuse.

Enfin, nous exposerons synthétiquement ce qu'est la médecine régénérative, ainsi que le rôle des biobanques sur l'avancée des recherches et la nécessité de les réformer. Effectivement, tandis que la réglementation des biobanques demeure nationale, la recherche est, quant à elle, de plus en plus mondiale, entraînant un nombre important d'échanges de données et d'échantillons. Ainsi, la création de mécanismes globaux pour les encadrer du mieux possible, tant sur le plan éthique que réglementaire, est de plus en plus recommandée par divers institutions, telle que la commission européenne. Il est important que les règles éthiques relatives à la recherche soient appliquées de manière claire et cohérente afin de promouvoir un savoir-faire équitable et pertinent.

# **1. Qu'est ce qu'une cellule souche ? et en particulier une cellule souche d'origine dentaire ?**

## **1.1 Définition d'une cellule souche**

Une cellule souche peut-être décrite comme une cellule indifférenciée, caractérisée par deux propriétés fondamentales : l'auto renouvellement permettant d'assurer la prolifération cellulaire et la différenciation en lignée cellulaire.

Lors de la division cellulaire asymétrique, une cellule souche donnera deux cellules filles :

- L'une non spécialisée dont le rôle est d'éviter le tarissement du réservoir de cellules souches grâce à une capacité d'auto renouvellement quasi illimitée et permanente.
- L'autre capable de se différencier de façon irréversible en un type cellulaire spécifique selon les conditions physiologiques ou expérimentales appliquées.

Précisons que leur capacité de mise en culture et de prolifération *in vitro* n'est pas prédictive de leur potentiel de prolifération *in vivo* mais est essentielle pour leur manipulation dans un but thérapeutique.

## **1.2 Les différents types de cellules souches**

### **1.2.1 Origine des cellules souches**

#### **1.2.1.1 Cellules souches anténatales (embryonnaires)**

En préambule, les cellules souches embryonnaires (ou ES pour Embryonic Stem cells) proviennent de la masse interne du blastocyste. Cette structure de 16-40 cellules, issues des divisions de l'ovocyte fécondé, est à l'origine de l'épiblaste ; lui même initiateur des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme). Ces trois feuillets

précéderont la formation de tous les tissus du fœtus en cours de développement, tandis que le feuillet externe du blastocyste sera à l'origine du placenta.

Par ailleurs, les ES sont l'unique population cellulaire possédant la capacité de s'auto renouveler tout en maintenant une pluripotentialité, pouvant ainsi se différencier en tout type cellulaire d'un organisme.

Néanmoins elles ont perdu la capacité de se développer en un embryon à moins d'être réintroduite dans un blastocyste appelé hôte. En effet, à elles seules, elles ne peuvent former un embryon viable (1).

Qui plus est, dans un cadre juridique bien défini, ces cellules peuvent être prélevées après la dissociation du blastocyste et placées en culture pour les travaux de recherches.

En effet, les scientifiques ont obtenu en France l'autorisation de travailler à partir de :

- ES prélevées sur des embryons surnuméraires obtenus par fécondation in vitro suite à un projet de parenté non abouti. Ce procédé est plutôt rare et réservé à des recherches sur de nouvelles lignées cellulaires afin d'étudier une pathologie spécifique à partir d'un embryon diagnostiqué porteur de la maladie en question lors d'un diagnostic prénatal (DPI). Les parents biologiques doivent donner un consentement écrit pour céder l'embryon à la recherche.
- Lignées cellulaires détenues et commercialisées par des laboratoires, procédé le plus souvent utilisé.

Ajoutons également que dans des conditions adéquates de cultures, elles se multiplient spontanément tout en conservant leur état indifférencié, leur caractère pluripotent ainsi qu'un génome intact. Autrement dit, leur prolifération quasi illimitée permet d'accumuler un grand nombre de cellules et ainsi de multiplier les recherches. D'ailleurs, en modifiant les conditions de culture, il est possible d'induire et d'orienter leur différenciation en cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, neurones, sang..) y compris celle de la lignée germinale (2).

Toutefois, le degré de plasticité de ces cellules décroît au fur et à mesure du développement et de l'apparition des tissus et des organes. Ainsi, on observe une spécialisation des cellules corrélée à une déperdition de l'information.

Les cellules embryonnaires pluripotentes représentent donc une source idéale de cellules tant sur le plan médical que sur celui de la recherche.

Néanmoins, malgré leur intérêt scientifique majeur, de nombreuses questions éthiques font obstacles à leur utilisation à des fins thérapeutiques. En effet, leur prélèvement nécessite la destruction de l'embryon dont elles proviennent (3).

Actuellement il n'existe ni thérapeutiques ni essais clinique appliqués à l'homme basés sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires.

Finalement, l'alternative à l'emploi des ES est le recueil de cellules souches adultes à partir de tissus spécialisés mais également la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes par génie génétique.

### **1.2.1.2 Cellules souches périnatales**

#### **1.2.1.2.1 Issues du cordon ombilical**

Le sang du cordon ombilical contient un nombre important de cellules souches hématopoïétiques (4) mais également des cellules souches mésenchymateuses en quantité plus restreinte. Elles présentent des caractéristiques intermédiaires entre les cellules souches embryonnaires et adultes (5) :

- prélèvement bien plus aisé que les cellules ES (6)
- elles ont un fort potentiel de prolifération, de différenciation et sont facilement localisables contrairement aux cellules souches adultes
- elles sont plus assimilables par l'organisme et provoquent moins de rejet du fait de leur immaturité
- elles présentent un taux faible de contamination par des agents infectieux

Toutefois, le nombre de cellules thérapeutiques récupérées par cordon est faible. De surcroît, l'étape de cryoconservation est incontournable, posant des problèmes éthiques et fonctionnels.

### **1.2.1.2 Les cellules souches amniotiques**

Le liquide amniotique contient différents types cellulaires provenant du fœtus en cours de développement. Ces cellules peuvent être isolées lors d'une amniocentèse, suivie d'une centrifugation et d'une mise en culture du culot cellulaire.

Les cellules obtenues forment une population hétérogène exprimant à la fois des marqueurs de cellules souches embryonnaires et ceux des cellules souches mésenchymateuses (7).

Par ailleurs, la membrane amniotique semble être intéressante comme source de MSCs (8). Elles sont considérées comme des cellules souches multipotentes et présentent peu d'immunogénicité ainsi que des propriétés anti-inflammatoires similaires aux cellules dérivées de la moëlle osseuse (9).

### **1.2.1.3 Cellules souches postnatales (adultes)**

Les cellules souches adultes somatiques peuvent être définies par leur fonction.

Théoriquement, elles sont présentes dans tous les tissus d'un organisme après la naissance (10). En effet, leur rôle est d'assurer l'homéostasie tissulaire c'est à dire de permettre le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après lésion. Ainsi, elles permettent aux tissus de rester fonctionnels.

Elles remplissent cette fonction de par :

- leur capacité d'auto renouvellement, évitant le tarissement du réservoir de cellules souches
- leur différenciation, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer.

Par ailleurs, les cellules souches adultes se différencient des cellules souches embryonnaires par les propriétés suivantes :

- ne sont pas considérées comme pluripotentes et sont généralement programmées pour un tissu donné
- ne se multiplient pas à l'infini à l'état indifférencié
- population cellulaire hétérogène compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent.

En outre, elles représentent le plus souvent un pourcentage infime de la population cellulaire du tissu considéré et sont donc plus difficiles à détecter et à étudier. En plus de leur rareté, elles n'expriment en général aucun marqueur de surface spécifique mais partagent plutôt une combinaison de certains antigènes qui ne leur sont pas spécifiques. C'est cet arrangement qui permet tout de même de les distinguer des autres types cellulaires.

Enfin, l'hétérogénéité des différentes populations cellulaires a été établie (11). En effet, au sein d'une même source de cellules souches adultes, il peut exister différentes sous-populations possédant des potentialités spécifiques. Une lignée cellulaire deviendrait prédominante grâce à une réponse à des signaux inductifs environnementaux.

## **1.2.2 Classement des cellules souches**

Les cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation, reconnaissable par la modification de la morphologie cellulaire et/ou par l'expression de protéines spécifiques à un tissu.

### **1.2.2.1 Cellules souches totipotentes**

Les cellules souches totipotentes s'autosuffisent pour générer un être vivant entier et normal. En effet, elles ont la capacité de se différencier en tous tissus de l'organisme autant embryonnaires que extra embryonnaires.

Ces cellules composent l'embryon dans les 4 premiers jours de son développement jusqu'au stade blastocyste.

### **1.2.2.2 Cellules souches pluripotentes**

Les cellules souches pluripotentes ont déjà subi une première étape de différenciation et peuvent donner naissance à la plupart, voire à tous les tissus de l'organisme adulte.

Néanmoins, ils ne peuvent pas générer les tissus extra embryonnaires tels que le placenta ou le cordon ombilical. Ces cellules sont donc dans l'incapacité de fournir l'environnement propice au développement de l'organisme.

On les retrouve au stade blastocyste (40 cellules) après le cinquième jour du développement embryonnaire.

### **1.2.2.3 Cellules souches multipotentes**

Les cellules souches multipotentes peuvent se différencier en cellules provenant du même feuillet embryonnaire :

- Mésoderme (reins, gonades, vaisseaux sanguins...)
- Ectoderme (épiderme, cornée, moelle épinière, système nerveux...)
- Endoderme (glandes digestives, épithéliums du tube digestif et respiratoire)

Elles sont présentes chez l'embryon et chez l'adulte.

### **1.2.2.4 Cellules souches unipotentes**

Elles se différencient en un seul type cellulaire spécialisé et conservent leur capacité d'autorenouvellement.

### **1.2.2.5 Progéniteurs et précurseurs cellulaires : cellules en cours de différenciation**

Les progéniteurs se différencient en un type cellulaire défini et perdent progressivement leur capacité d'auto renouvellement.

Les précurseurs ont, quant à eux, perdu toute capacité d'auto renouvellement mais continuent leur division ainsi que leur maturation. Ils représentent les premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignée.

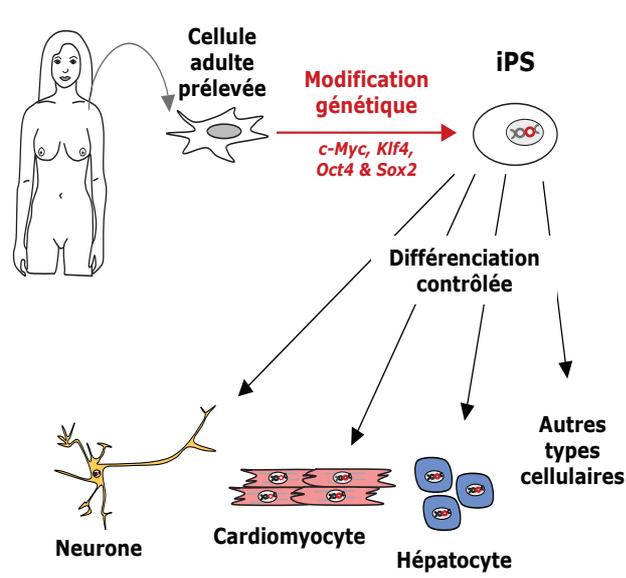
On observe des modifications spécifiques au niveau :

- noyau : polylobulation
- cytoplasme : granulations
- membranes : expression de marqueurs de surface

La faculté de division et de différenciation *in vivo* des cellules souches leur permet de conserver le potentiel de reconstituer à long terme la fonction d'un tissu de manière efficace.

Cela les distingue des cellules progénitrices qui présentent des capacités plus limitées.

### 1.2.2.6 Cellules souches pluripotentes induites (iPS)



*Illustration 1 : Génération d'iPS présentant des caractéristiques proches des ES tout en provenant d'individus adultes*

Takahashi et Yamanaka (prix Nobel de médecine en 2012) furent les premiers à proposer en 2006 la génération de cellules souches pluripotentes à partir de cellules adultes chez la souris (12). Les cellules somatiques ont été manipulées génétiquement puis converties en cellules pluripotentes, nommées iPS cells. Ceci fût rendu possible par l'adjonction à la cellule différenciée, via un rétrovirus, d'une combinaison de plusieurs gènes clés (Oct-3/4, Sox2, c-Myc et Klf4), retrouvés actif dans les cellules souches embryonnaires.

Dans un second temps, cette reprogrammation fût démontrée chez l'homme (13) (14). Mieux encore, Yan X et al ont dévoilé en 2010, la facilité d'obtenir des iPS à partir de cellules souches dentaires (SHEDs, DPSCs et SCAPs) (15).

Non seulement les iPS sont semblables aux cellules ES en terme de morphologie, de prolifération, d'antigènes de surfaces, d'expression génique et de statut épigénétique des gènes spécifiques de la pluripotence. Mais elles peuvent également se différencier en chaque type cellulaire issu des trois feuillets embryonnaires.

Cependant, l'utilisation de gènes hautement prolifératifs, comme c-Myc, augmente le risque de développement de cancer. De même, l'intégration de transgènes dans le génome peut aussi favoriser le « réveil » d'autres oncogènes (16).

Finalement, la découverte des iPS a ouvert des perspectives sans précédent pour la recherche et l'industrie pharmaceutique. Néanmoins, l'innocuité de la manipulation génétique nécessaire à la genèse des iPS n'étant pas encore établit, les autorités de santé en France refusent l'utilisation chez l'homme de cellules manipulées génétiquement.

### **1.2.3 Le concept de niche cellulaire**

La niche se définit comme un microenvironnement spécifique, dans lequel se trouvent les cellules souches. Ces cellules permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire en assurant une régulation de la balance entre quiescence, auto renouvellement, mobilisation et différenciation. (17)

Autrement dit, la niche représente un milieu nutritif et informationnel dans lequel l'intégration de multiples signaux permet un contrôle précis du nombre et de la fonction des cellules souches.

Après l'étude des différentes niches, une liste de leurs particularités peut être constituée. En effet, elles se composent :

- des cellules souches elles-mêmes
- de cellules stromales de support qui interagissent directement avec les cellules souches par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, de gap junctions ou de facteurs solubles
- d'une matrice extracellulaire qui procure une structure, une organisation et des signaux mécaniques
- de vaisseaux sanguins qui amènent des signaux systémiques et permettent le recrutement de cellules inflammatoires ou d'autres cellules circulantes dans la

niche mais aussi l'entrée et la sortie des cellules souches (nichage et mobilisation)

- de fibres nerveuses communiquant de lointains messages physiologiques aux cellules souches dans leur microenvironnement.

Par ailleurs, au sein de la pulpe dentaire, les cellules souches d'origine pulpaire (DPSCs) semblent localisées autour des zones périvasculaires et des gaines périneurales (18). Ceci laisse entrevoir ainsi, l'éventuelle présence de niches cellulaires dans ces zones.

De surcroît, Laino et son équipe ont affirmé que l'expression du marqueur CD34+ associé à l'expression des marqueurs c-Kit et STRO-1 pourraient permettre l'identification des niches de DPSCs dérivées de la crête neurale (19).

### **1.3 Les cellules souches mésenchymateuses orales**

Initialement, les MSCs ont été isolées dans le compartiment stromal de la moëlle osseuse par Friedenstein, en 1966 (20). Puis, les scientifiques ont découvert leur présence dans les tissus conjonctifs post-nataux comme par exemple le cordon ombilical, le tissu adipeux ou les tissus dentaires...

Ces sources permettent de limiter l'usage de MSCs issues de la moelle osseuse. Car outre leur prélèvement invasif, elles ne sont récupérées qu'en nombre réduit puis doivent subir une expansion cellulaire à long terme risquant d'engendrer des aberrations chromosomiques (21).

En définitive, les MSCs possèdent toutes des caractéristiques biologiques similaires, mais du fait de leur origine variée, elles peuvent diverger dans leur potentiel de différenciation et de prolifération. De surcroît, elles sont caractérisées par un ensemble de marqueurs de surface servant à les identifier, les caractériser et à les isoler.

#### **1.3.1 L'organe dentaire**

La dent est un organe complexe constituée par un ensemble de tissus d'origines et de structures différentes (22).

Embryologiquement, elle est issue d'une dualité tissulaire. Elle dérive d'une part, de l'ectoderme situé au niveau du premier arc facial mais provient également de l'ectomésenchyme, originaire de la crête neurale.

Sa formation est donc contrôlée par des interactions épithélio-mésenchymateuses durant lesquelles l'épithélium oral s'épaissit, bourgeonne et se développe sous forme de cupule puis de cloche afin d'aboutir à la formation de l'organe dentaire.

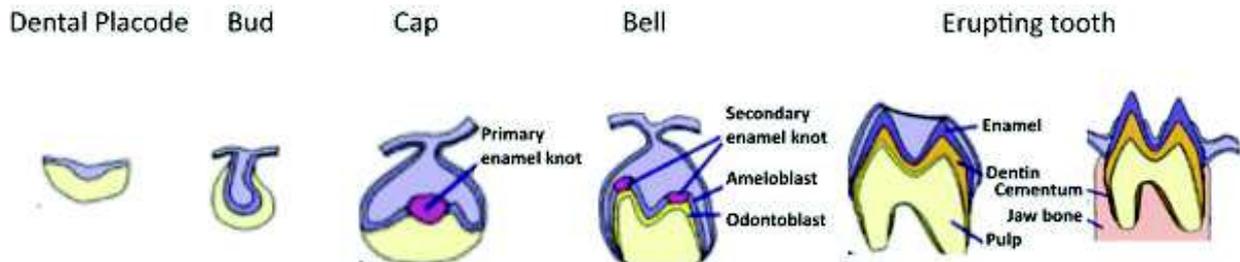


Illustration 2 : Schéma représentant les différents stades de formation d'une dent. Tout d'abord à gauche, la placode dentaire puis le bourgeon, la cupule, la cloche et enfin l'organe dentaire

Par ailleurs, au cours de la morphogenèse dentaire, les cellules souches épithéliales responsables de la formation des améloblastes disparaîtront à la fin de l'amélogénèse. Tandis que les MSCs interviendront à tous les stades d'évolution de la dent et persisteront au sein des tissus dentaires adultes (23) afin de former les futurs odontoblastes, cémentoblastes, ostéoblastes, fibroblastes et cellules desmodontales. De plus, les différentes populations cellulaires, peuvent aussi différer autour de certains aspects tels que leur taux de croissance en culture, l'expression de marqueurs géniques ou dans leur différenciation cellulaire. Ces variations peuvent être attribuées à l'origine, la fonction tissulaire, ou encore aux conditions de culture.

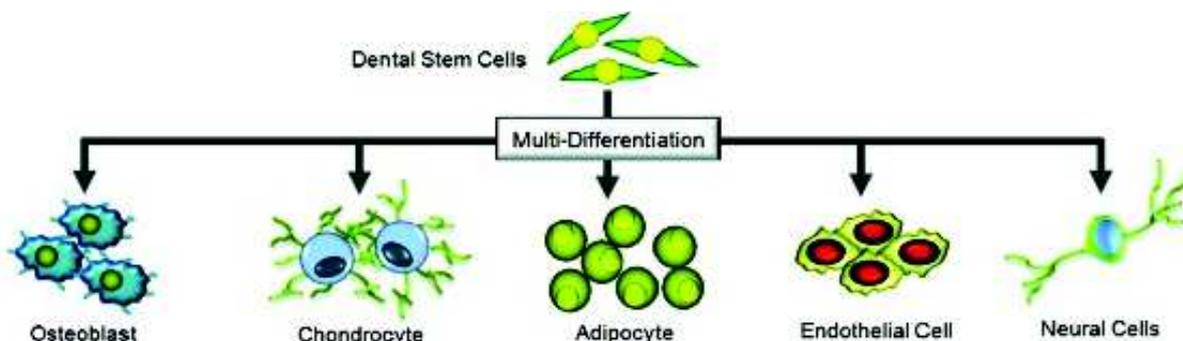


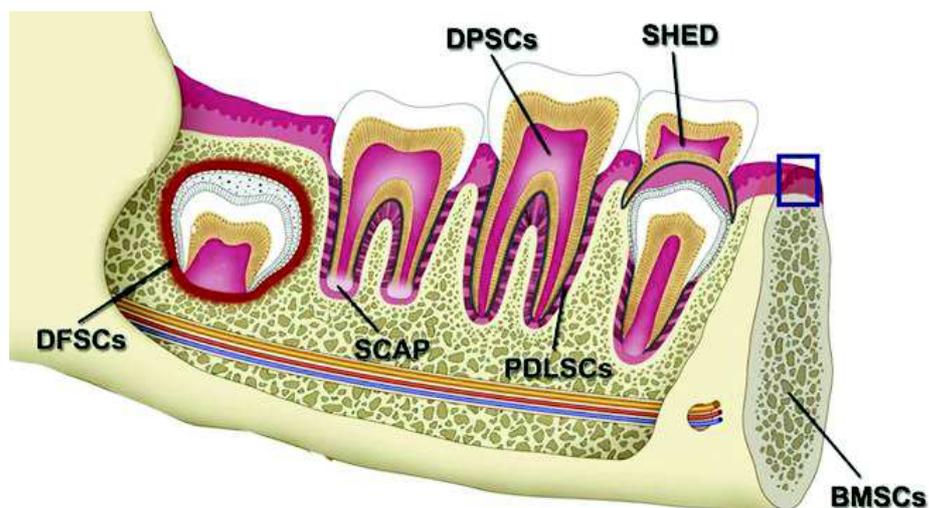
Illustration 3 : Représentation de quelques différenciations possibles des cellules souches dentaires

Ainsi, la dent et les structures qui l'entourent représentent un organe riche en cellules souches mésenchymateuses appelées DSCs (Dental Stem Cells) dont la localisation et la nature varient tout au long de la vie de l'individu.

On distingue cinq types de DSCs :

- Les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs : Dental Pulp Stem Cells) identifiées par Gronthos et al au cours de l'année 2000 (24)
- Les cellules souches des dents déciduales exfoliées (SHED : Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth) découvertes en 2003 par Miura et son équipe (25);
- Les cellules souches dentaires du ligament parodontal (PDLSCs : PerioDontal Ligament Stem Cells) isolées en 2004 par Seo et all(26).
- Les précurseurs cellulaires provenant du follicule dentaire (DFPCs : Dental Follicle Precursor Cells), révélés par Morscek et son équipe en 2005 ; lesquels furent caractérisés plus tard comme cellules souches (27).
- Les cellules souches de la papille apicale (SCAPs : Stem cell from apical Papilla) dévoilées en 2006, par Sonoyama et son équipe (28).

Il est important de souligner que ces différentes sources de DSCs ne se réfèrent pas à une population pure de cellules souches mais qu'il s'agit d'un mélange hétérogène de cellules pouvant contenir à la fois des progéniteurs et des cellules souches.



*Illustration 4 : Localisation des cellules souches d'origines dentaire en fonction du développement de la dent, d'après Egusa et al (8)*

En outre, les cellules souches d'origine dentaire présentent des caractéristiques semblables à toutes les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) (29).

### 1.3.2 Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses

#### 1.3.2.1.1 Caractéristiques *in vitro* :

Tout d'abord, les cellules souches mésenchymateuses se distinguent par leurs capacités d'adhérence *in vitro* au plastique et à former des amas de colonies cellulaires appelés CFU-F pour « Colony-Forming Unit Fibroblast ».

Sans compter que la morphologie polygonale ou fusiforme de ces cellules leur confère un aspect « fibroblast-like ».(30).

D'autre part, leurs phénotypes se caractérisent par une combinaison de plusieurs antigènes de surface et la présence de nombreuses intégrines jouant un rôle important dans leur mobilité cellulaire.

Néanmoins, jusqu'à ce jour, aucun marqueur unique n'a été mis en évidence. Cette absence de spécificité rend leur caractérisation et leur isolement plus difficile.

#### Marqueurs

de surfaces	BMMSCs	DPSCs	SCAPs	SHED	PLSCs	DFPCs	Références
CD13	+	+	+	+	+	+	
CD24	-	-	+	-	-	-	(31)
CD29	-	+	+	+	+	+	(31) (32)
CD34	-	-	-	-	-	-	(31) (29)
CD44	+	+	+	+	+	+	(33)
CD73	+	+	+	+	+	+	(31) (29) (32)
CD90	+	+	+	+	+	+	(31)(29) (32) (33)
CD105	+	+	+	+	+	+	(31) (29) (32)
CD106	+	+	+	+	+	+	(31)
CD146	+	+	+	+	+	+	(31) (33)
CD166	+	+	+	+	+	+	(31) (33)
STRO-1	+	+	+	+	+	+	(31) (33)

Illustration 5 : Marqueurs de surfaces principaux retrouvés chez DSCs et BMMSCs

Enfin, dans des conditions de cultures standards, elles doivent être capables *in vitro* de se différencier en lignée mésodermique c'est à dire au moins en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (34).

Cependant, selon leur origine, les MSCs diffèrent en fonction de leur potentiel de différenciation et de leur profil d'expression génique (35).

Cette différence est à prendre en considération lors du choix de la source de cellules souches mésenchymateuses. Effectivement, elles semblent présentes dans tous les tissus conjonctifs mais en quantité et potentialité variables selon le tissu, l'âge et l'état de santé général du patient.

#### **1.3.2.1.2 Caractéristiques *in vivo* :**

Certaines propriétés des MSCs ne sont identifiables qu'*in vivo*.

Notamment, elles possèdent des propriétés immuno-suppressives et anti-inflammatoires remarquables, permettant les greffes allogéniques de MSCs (36).

Par ailleurs, elles ont des effets positifs sur la trophicité tissulaire et pourraient jouer un rôle significatif dans la régénération. Il a été observé qu'après leur transplantation, les MSCs participeraient à la réparation tissulaire par la sécrétion de molécules impliquées dans l'homéostasie comme par exemple des glycoprotéines solubles de la MEC, des cytokines et des facteurs de croissance (37). Ainsi, elles seraient responsables de la réduction de l'inflammation ainsi que de la stimulation de la régénération tissulaire (38).

Somme toute, la différenciation des MSCs *in vivo* est beaucoup plus complexe du fait de sa régulation par un micro-environnement tissulaire. De ce fait, aucun consensus concernant les marqueurs ne permet d'identifier de manière fiable les MSCs *in vivo* (39). En outre, lors de l'adhérence au plastique des cellules, l'expression des marqueurs de surfaces et des propriétés biologiques en est inévitablement modifiée. De ce fait, cela participe à une méconnaissance encore actuelle des phénotypes originaux. Ainsi, les recherches se basent principalement à partir des marqueurs découverts lors de la différenciation *in vitro*.

### 1.3.3 Les MSCs issues de la moëlle osseuse : BMMSCs (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells)

Le micro-environnement de la moëlle osseuse constitue la niche la plus importante de MSCs du corps humain (21). Cependant, cette source peut se révéler difficile à exploiter.

Tout d'abord, le prélèvement nécessite une technique hautement invasive qu'est l'aspiration de la moëlle osseuse et s'effectue sous anesthésie générale. En outre, il permet de ne récupérer qu'un nombre très réduit de MSCs, demandant une expansion cellulaire à long terme au risque d'engendrer des aberrations chromosomiques. Effectivement, plus les cellules se divisent plus elles perdent leur potentialités et sont moins efficaces, voire déviantes.

D'autre part, avec l'âge, les chercheurs ont observé une diminution du nombre de cellules ainsi que de leurs capacités de prolifération et de différenciation.

Enfin, la moëlle osseuse affiche une grande sensibilité à l'exposition virale.

Initialement, l'utilisation de BMMSCs en médecine régénérative faciale requérait leur isolation à partir de la crête iliaque (40). Embryologiquement, le maxillaire et la mandibule, deux os membranaires, proviennent de cellules issues de la crête neurale tandis que l'os de la crête iliaque est un os endochondral formé à partir du mésoderme. Cette différence d'origine peut se traduire par des disparités fonctionnelles entre les deux types d'os (23) et est susceptible de conditionner le potentiel des MSCs. En effet, les BMMSCs issues de l'os iliaque présentent un potentiel ostéogénique diminuant avec l'âge, contrairement à celles issues de l'os alvéolaire.

Par ailleurs, le périoste possède de remarquables capacités de régénération.

Cicconetti et son équipe ont travaillé sur des échantillons provenant de tubérosité maxillaire et de périoste mandibulaire humain. Ils présentaient tous les deux des cellules à fort potentiel ostéogénique *in vitro* et des profils phénotypiques similaires. *In vivo*, une formation osseuse a été observée (41).

De nombreuses études montrent que les cellules souches périostés pourraient constituer une source intéressante de MSCs orales, en particulier en régénération osseuse (42) (43). Afin d'éviter un prélèvement trop invasif, comme le prélèvement tubérositaire, elles peuvent être isolées à partir d'aspirats de moëlle osseuse obtenus

lors d'une intervention chirurgicale comme la pose d'un implant ou l'extraction de dents de sagesse. (44). Le scientifique Park et son équipe y voient un grand avantage par rapport aux autres techniques plus invasives (45). D'autre part, l'accès à des sources non osseuses peuvent être envisagées (46).

Finalement, les BMMSCs orofaciales constituent une source intéressante de MSCs, en particulier en régénération osseuse. L'éventualité de pouvoir les récupérer à partir d'un forage implantaire représente un grand espoir(47).

### **1.3.4 Les cellules souches de la pulpe dentaire : DPSCs (Dental Pulp Stem Cells)**

#### **1.3.4.1 La pulpe dentaire**

La pulpe dentaire est un tissu conjonctif mou richement vascularisé et innervé. Elle est localisée au centre de la dent, entourée par trois tissus minéralisés : l'émail, la dentine et le cément. Tout au long de la vie, une calcification lente et progressive réduit son volume.

En outre, elle est composée d'une population cellulaire hétérogène visant à maintenir, défendre et réparer la structure tissulaire en cas d'agression. Par exemple, si des odontoblastes sont détruits lors d'une attaque de type mécanique, chimique ou microbienne, la pulpe est capable de régénérer une dentine cicatricielle de défense.

Ce processus de réparation laisse supposer l'existence de cellules souches mésenchymateuses. Elles sont susceptibles de proliférer, de migrer vers le site atteint et de se différencier en « odontoblastes-like » afin de créer une barrière de protection (23)(24)(48). Il est important de souligner que ces populations cellulaires représentent moins de 1% de la totalité des cellules de la pulpe dentaire.

#### **1.3.4.2 Découvertes et caractéristiques des DPSCs**

Les cellules souches pulpaire ont été découvertes en 1990, par Fitzgerald, lors de ses travaux de recherches sur les cellules de type fibroblastiques (49).

Cependant, Gronthos et son équipe furent les premiers à les avoir identifiées et nommées en tant que DPSCs, après une étude comparative avec des BMMSCs.

Elles représentent un stock important et accessible de cellules souches adultes et possèdent un potentiel thérapeutique similaire à celui des BMMSCs.

Les pulpes saines ou les dents incluses sont des sources potentielles de DPSCs. Cependant, il est nécessaire d'ajouter que la pulpe se rétracte avec les années et présente parfois des signes de dégénérescence. Cela rendrait cette source inutilisable chez une personne adulte d'un âge avancé.

Physiologiquement, les DPSCs seraient à l'état quiescent dans la pulpe dentaire, mais lors d'une agression ou d'une lésion, elles peuvent être activées pour permettre une cicatrisation pulpaire.

En effet, elles possèdent une haute capacité proliférative et se différencient immédiatement en odontoblastes, ostéoblastes et chondrocytes pour produire respectivement de la dentine, de l'os et du cartilage. Ces cellules spécialisées seront ensuite acheminées jusqu'au lieu de l'agression pour prendre le relais des cellules détruites.

Par ailleurs, la pulpe est composée de sous-populations de cellules progénitrices. Elles peuvent se révéler différentes tant dans leur capacité d'auto-renouvellement et de vitesse de prolifération que dans leur potentiel de différenciation (50).

En effet, les colonies cellulaires formées par les DPSCs in vitro sont hétérogènes en terme de densité, suggérant que chaque clone cellulaire possède son propre rythme de croissance et que la population initiale est elle-même hétérogène.

Ainsi, les DPSCs apparaissent comme une population hétérogène pouvant contenir à la fois des progéniteurs ainsi que des cellules « fibroblastes-like » (51) (52).

Il semble par ailleurs possible d'isoler au sein de la pulpe humaine une population de cellules souches de la crête neurale pouvant se différencier en ostéoblastes, mélanocytes et cellules de Schwann (53). Les perspectives des thérapies de régénération sont ainsi multipliées.

Autrement dit, les DPSCs sont des cellules souches multipotentes, auto-renouvelables, hautement prolifératives et possédant de grandes capacités de différenciation (24)(48). Par modulation des facteurs de croissance, des facteurs de transcription, des protéines de la matrice extracellulaire et des récepteurs moléculaires, les DPSCs peuvent se

différencier *in vivo* et *in vitro* en odontoblastes, ostéoblastes, cellules endothéliales, myoblastes, adipocytes, chondrocytes, neurones et hépatocytes (31).

Enfin, il est intéressant de souligner que, *in vitro*, le taux de prolifération des DPSCs est supérieur à celui des BMMSCs (48). Ceci peut s'expliquer par la différence du stade de développement des tissus prélevés. En effet, les DPSCs, collectées dans la pulpe de dents de sagesse, proviennent d'un tissu en cours de développement contrairement aux BMMSCs issues de la moëlle osseuse adulte (54).

En outre, les DPSCs ont également une activité immunosuppressive supérieures à celles des BMMSCs (55). Ces propriétés immunomodulatrices accroît leur intérêt thérapeutique pour de nouvelles approches des maladies immunes (56). Les DPSCs semblent induire l'inhibition de la prolifération des lymphocytes et moduler la production de cytokines *in vitro*.

#### **1.3.4.3 Le phénotype des DPSCs**

Le manque de marqueurs strictement définis et leur inconstance rend l'identification de ces cellules difficile. En effet, leur phénotype est influençable non seulement par les conditions de culture, la confluence des cellules et des facteurs de croissance mais également par des conditions pathologiques comme l'inflammation.

Cependant, Alvarez et son équipe semble avoir découvert le marqueur CD271 comme marqueur de surface unique suffisamment efficace pour identifier les DPSCs ayant un grand potentiel odontogène (57). Cela pourrait être utilisé pour des applications cliniques ultérieures en dentisterie et en médecine régénératrice.

#### **1.3.5 Les dents déciduales exfoliées : SHED (Stem Cells from Human exfoliated deciduous teeth)**

Elles représentent une source de cellules souches multipotentes post natales facilement accessibles, qui peuvent être isolées et cultivées *ex vivo*.

Leur récupération s'effectue à partir du tissu pulpaire caméral des dents temporaires.

Elles se distinguent des cellules souches de la pulpe dentaire adulte par (58) :

- un plus grand potentiel de prolifération

- une vitesse de doublement de population cellulaire plus élevée que les DPSCs et que les BMMSCs (SHED > DPSC > BMMSCs) (21)
- un recueillement uniquement chez l'enfant
- la formation de clusters cellulaires sphériques
- la capacité d'induire une différenciation ostéogénique voire dentinogénique lors d'une implantation *in vivo*. Elles possèdent un très fort potentiel d'ostéoinduction *in vivo*, dans les expériences chez la souris (59).
- le recrutement de cellules ostéogéniques. En effet, les dents de lait ne sont pas seulement un guide pour les dents définitives, mais elles sont aussi impliquées dans l'induction de la formation osseuse lors de leur éruption
- la difficulté à reconstruire un tissu semblable au complexe dentino-pulpaire *in vivo* si elles ne sont pas associées à d'autres cellules souches

Les SHEDs apparaissent comme une population cellulaire multipotente, potentiellement plus immature que les autres cellules stromales post-natales. Elles sont parfois nommées « immature DPSC » (IDPSC).

### **1.3.6 Le ligament parodontal : PDLSCs (Periodontal Ligament Stem Cells)**

Le ligament parodontal est un tissu conjonctif, riche en fibres de collagène, situé entre le cément radiculaire et l'os alvéolaire.

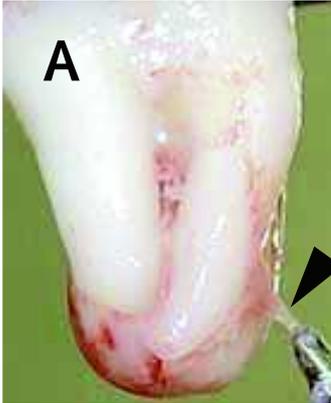
Il se développe autour du germe au moment de l'éruption et permettra d'amortir les forces occlusales lors de la mise en fonction de la dent.

Il contient des cellules souches répondant aux critères des MSCs avec un potentiel de formation des structures parodontales comme le cément, l'os alvéolaire et le desmodonte (26). Ceci laisse suggérer la présence, au sein du ligament, de progéniteurs cellulaires capables de maintenir l'homéostasie tissulaire et d'assurer la régénération du parodonte.

Selon certaines études, deux sous populations peuvent être distinguées (60) :

- Cellules souches du ligament parodontal provenant de la surface radiculaire de la dent : r-PDLSC
- Cellules souches du ligament parodontal issues de la surface osseuse de l'alvéole dentaire : a-PDLSC

Les niches de PDLSCs semblent être périvasculaires et extravasculaires



*Illustration 6 : Photo représentant une dent de sagesse humaine ainsi que le ligament périodontal attaché à la surface radiculaire. Photo prise par l'équipe de recherche du Pr Séo (26).*

Selon les conditions de culture, il est possible d'observer *in vitro*, leur différenciation en odontoblastes, cémentoblastes, adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes (61).

*In vivo*, une structure cément/ligament parodontal peut être régénérée après transplantation de PDLSCs chez des souris immunocompromises. En effet, les fibres collagéniques de type I générées par les PDLSCs transplantées *in vivo*, se connectent avec le cément néo-formé. Elles miment ainsi, la façon dont s'attachent physiologiquement les fibres de Sharpey. Leur implication dans la régénération osseuse alvéolaire a également été évoquée.

Ces cellules peuvent être récupérées à la surface des racines des dents avulsées. Elles possèdent des marqueurs de surface (MSC STRO-1), des caractéristiques et un potentiel de différenciation similaires aux cellules souches de la moëlle osseuse et de la pulpe dentaire (26) (62).

### **1.3.7 La zone de la papille dentaire apicale : SCAPs (Stem Cells From Apical Papilla)**

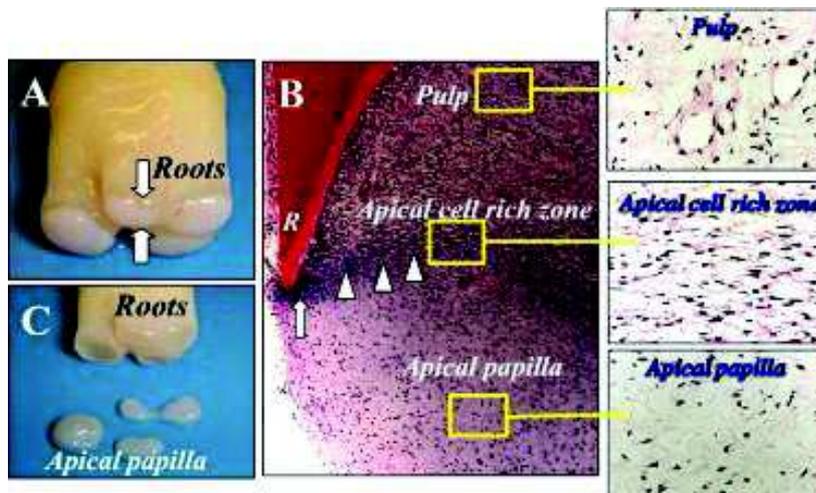
L'élaboration de la racine dentaire, appelée radiculogénèse, débute lorsque les dimensions définitives de la couronne sont acquises et que les couches d'émail et de dentine ont atteint une épaisseur suffisante.

Du fait du développement concomitant entre la racine et la gaine, on observe un enrobage partiel de la papille apicale par cette dernière, mais également une différenciation progressive des cellules souches locales.

La papille apicale correspond au tissu conjonctif localisé au niveau de l'apex ouvert des racines immatures. Histologiquement, elle est différenciable de la pulpe par la présence d'une zone apicale intermédiaire riche en cellules, appelée « apical cell rich zone » (23) Pour toutes ces raisons, elle représente une zone essentielle au développement du canal et constitue un précieux réservoir de cellules souches stromales toujours en activité chez l'enfant puis le jeune adulte.

D'ailleurs, les SCAPs semblent tenir une place prépondérante dans la formation de ces structures dentaires (63), et en particulier dans le développement, la maturation et l'apexogénèse des racines. Ainsi qu'en témoigne une étude réalisée sur des porcins, l'ablation de la papille apicale sur une seule racine d'une dent pluriradiculée, engendre un arrêt de la radiculogénèse sur cette dernière, tandis qu'un développement complet des autres racines est observé.

Autrement dit, les SCAPs sont la source des odontoblastes primaires établissant la dentine radiculaire tandis que les DPSCs sont plutôt à l'origine d'odontoblastes producteurs de dentine tertiaire réactionnelle (21). Et elles peuvent être définies comme des précurseurs de la pulpe radiculaire.



*Illustration 7 : Situation anatomique des SCAPs et de leur prélèvement ; en A, photographie de la dent et de son tissu; en B, coloration à l'hématoxyline-éosine d'une racine en développement ; en C, illustration du prélèvement de la papille apicale (23).*

Toutefois, il s'agit d'une source cellulaire éphémère et limitée aux dents en cours de développement comme par exemple les germes des troisièmes molaires.

Si l'on considère leur plus grande immaturité, on peut supposer qu'elles possèdent des capacités plus importantes de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement

(28)(64). Plusieurs études ont notamment mis en évidence leurs capacités supérieures de prolifération et d'auto renouvellement par rapport aux DPSCs, SHED et PDLSCs.

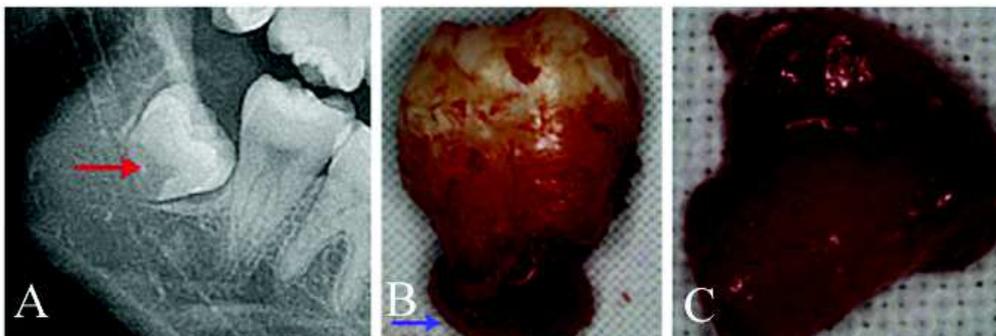
*In vitro*, selon les conditions de cultures, les SCAPs peuvent se différencier en cellules odontoblastiques, ostéoblastiques, neuronales, musculaires et adipeuses (29).

*In vivo*, lors d'une transplantation dans une matrice adéquate (hydroxyapatite/phosphate tricalcique) elles peuvent recréer un complexe dentino-pulpaire fonctionnel.

Contrairement aux MSCs connues pour ne posséder aucun marqueur unique, Sonomaya et al supposent que les SCAPS détiennent un marqueur spécifique : le CD24 (28). Cette caractéristique n'est pas encore clairement établie mais permettrait d'envisager une sélection plus spécifique de ces cellules.

### 1.3.8 Le follicule dentaire : DFPCs (Dental Follicle Precursor Cells)

Il s'agit d'un tissu conjonctif enveloppant le bourgeon dentaire en développement et peut parfois persister tout au long de la vie de l'individu dans le cas de dents incluses.



*Illustration 8 : en A, germe de la troisième molaire mandibulaire et son sac folliculaire ; en B, dent extraite avec son sac folliculaire ; en C, isolation du sac folliculaire. Le tout fût réalisé par l'équipe de recherche de M. Chen (65)*

Le follicule dentaire contient des cellules souches capables de former le parodonte à savoir, le ligament parodontal, le cément et l'os alvéolaire. *In vitro*, elles peuvent se différencier en ostéoblastes, cémentoblastes, chondrocytes et adipocytes, myoblastes et neurones lors d'une mise en culture appropriée (66).

Les DFPCs peuvent être isolées à partir de follicules de dents de sagesse incluses ou à l'état de germe rendant cette source réaliste en terme d'accessibilité.

De fait, les cellules progénitrices folliculaires, tout comme les SCAPs, constituent une population issue des tissus en développement. De part, une très grande plasticité et une bonne capacité de prolifération, elles représentent une alternative à l'utilisation des cellules souches pulpaire et desmodontales (67).

Néanmoins, un bémol est à souligner : ces sources cellulaires sont plus limitées dans le temps que celles de la pulpe dentaire. En effet, l'évolution des dents permanentes engendre la disparition du follicule et de la papille apicale.

### 1.3.9 Comparaison des potentiels entre les différentes sources de cellules souches dentaires

Type cellulaire	Capacités multipotentes <i>in vitro</i>	Capacités de formation tissulaire <i>in vivo</i>
<b>DPSC</b>	Adipocytes, chondrocytes, myoblastes, ostéoblastes, cellules neuronales, odontoblastes, cardiomyocytes, hépatocyte-like cells, mélanocytes, cellules endothéliales	Tissu adipeux, muscle, complexe dentino-pulpaire, os, micro-vaisseaux
<b>SHED</b>	Adipocytes, chondrocytes, myoblastes, ostéoblastes, cellules neuronales, odontoblastes, cellules endothéliales	Os, micro-vaisseaux, complexe dentino-pulpaire
<b>PDLSC</b>	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, cellules neuronales, cémentoblastes	Os alvéolaire, ligament périodontal, ciment
<b>DFPC</b>	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, cellules neuronales, cémentoblastes, hépatocyte-like cells	Os alvéolaire, ligament périodontal, ciment
<b>ABMSCs</b>	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes	Os, cartilage
<b>SCAP</b>	Adipocytes, ostéoblastes, cellules neuronales, odontoblastes, hépatocyte-like cells	Complexe dentino-pulpaire

Illustration 9 *Tableau récapitulatif des capacités de différenciations in vitro et in vivo des cellules souches dentaires d'après les travaux de Liu et son équipe (69)*

Synthétiquement, les cellules souches mésenchymateuses d'origine orale peuvent se différencier *in vitro* en : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, myoblastes et neurones.

Les DPSCs, les SCAPs et les SHEDs peuvent en plus synthétiser une matrice dentinaire tandis que les PDLSCs et les DFPCs sont susceptibles, quant à eux, de se différencier préférentiellement en cémentoblastes.

Il est important de rappeler que ces différentes sources cellulaires correspondent à un mélange hétérogène de cellules pouvant contenir à la fois des progéniteurs et des cellules souches. Parallèlement, le manque de marqueurs universels rend leur isolation difficile et représente un des obstacles majeurs de la recherche sur ces cellules. En effet, l'expression de nombreux marqueurs de surface est modulée par l'état de prolifération des cellules ainsi que les conditions de cultures (68). L'exacte identité de ces cellules n'est toujours pas élucidée.

On observe une prévalence des recherches sur les DPSCs dans la littérature. En effet, elles représentent une source très accessible de cellules souches, notamment au niveau des germes de dents de sagesse qui sont extraites et jetées quotidiennement dans les cabinets dentaires.

De même, dans le tableau ci-dessus, on constate qu'elles présentent le plus de formations tissulaires différentes *in vivo*. Cela est-il dû uniquement à l'important potentiel de ces cellules ou bien également au fait qu'elles ont, à ce jour, été les plus étudiées parmi les sources dentaires ?

Toutefois, il est important de ne pas négliger le potentiel des autres sources de cellules souches dentaires.

Dans la suite de ce papier, nous allons nous intéresser au processus d'isolation et de culture des cellules souches issues de la pulpe dentaire d'une dent permanente, employé par les équipes de recherches.

## **2. Extraction, isolation des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs)**

Il n'existe pas de méthodes standardisées pour l'identification, l'isolation ou la caractérisation des cellules souches mésenchymateuse en générale, ni des DPSCs en particulier.

En effet, chaque équipe possède sa propre approche, compliquant ainsi la comparabilité des résultats expérimentaux. Plus encore, certains protocoles peuvent engendrer des changements génétiques et épi-génétiques dans les populations en cultures, altérant ainsi leurs plasticités et potentialités.

### **2.1 Information du patient, prélèvement dentaire et isolement pulpaire**

Les pulpes sont issues essentiellement de dents saines pour lesquelles une indication d'avulsion a été posée selon des critères médicaux. En effet, une étude réalisée par Gnanasegara et son équipe a permis de montrer la diminution du potentiel de différenciation des DPSCs provenant de dents cariées(70).

Habituellement, les pulpes sont extraites de dents définitives incluses, sous muqueuse ou sur arcade.

En préambule à tout prélèvement, le statut sanitaire du patient est vérifié par une anamnèse médicale poussée.

De plus, si la récolte de pulpes est effectuée dans un but de recherches scientifiques, le patient signera un consentement éclairé l'informant que les dents serviront à la recherche biomédicale mais qu'aucun bénéfice commercial, industriel ou pharmaceutique n'en sera tiré. Il paraphera également le contrat de cryopréservation.

Suite à la réception du contrat et du consentement signés, le patient sera enregistré dans la base de données de la biobanque. Le kit de collecte sera alors expédié au praticien. Généralement il est reçu dans la semaine avant l'intervention et comporte les nom-prénom, date de naissance et numéro de traçabilité du patient.

Par ailleurs, selon la complexité de l'avulsion, le praticien s'assurera de la faisabilité à conserver la dent intacte et entière. En effet, la collecte est sous sa responsabilité.

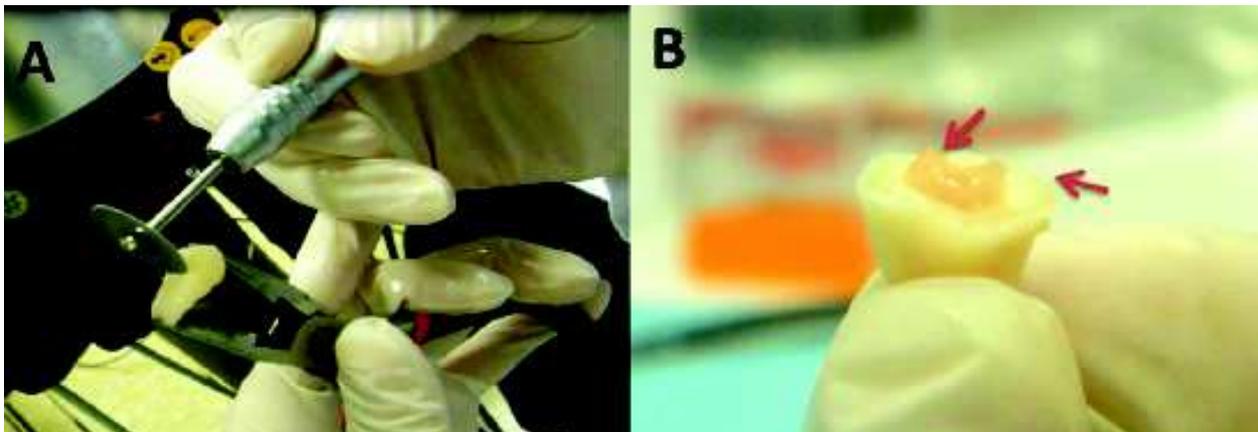
Dès la dent extraite, elle sera nettoyée puis mise dans un tube, contenant une solution stérile d'antibiotiques (pénicillines et streptomycines) afin d'éviter toute contamination pulpaire.

Enfin, le tout sera conditionné dans un container les maintenant à température constante de 4 degrés pendant 24 heures puis acheminé au laboratoire de recherche ou de la biobanque.

Dans un second temps, l'isolation de la pulpe et à fortiori des DPSCs sera réalisée par l'équipe scientifique du laboratoire.

Précisons que la dent peut être prélevée à différents moments de son embryogénèse d'après la classification de Nolla (71). Cela impactera le procédé d'isolement pulpaire.

Par exemple, si l'avulsion se fait à un stade tardif de son évolution (Stade 8 à 10), il sera nécessaire de la couper au disque diamanté ou avec une turbine à la limite émail/cément, pour parvenir à récupérer la pulpe. Cependant, la production de chaleur et de contraintes mécaniques risquera d'endommager une partie de la pulpe.



*Illustration 10 : Procédés d'extraction de la pulpe d'une dent. En A, la dent est sectionnée à l'aide d'un disque diamanté ; en B, on observe la pulpe (72)*

Au contraire, si la dent est récupérée à un stade précoce de son évolution (stade 4 à 7), avant l'achèvement de l'édification radiculaire, l'extirpation pulpaire s'en trouvera simplifiée.

## **2.2 Isolation des cellules souches**

Leur présence minoritaire dans un tissu, associé à une absence de marqueurs spécifiques rend la caractérisation et l'isolement des cellules souches mésenchymateuses plus difficiles. Face à cette constatation, la Société Internationale sur la Thérapie Cellulaire (ISCT) a établi un consensus en fixant les critères d'identification des cellules souches mésenchymateuses *in vitro* (73):

- Être adhérentes au plastique dans des conditions de cultures standardisées
- Exprimer plus de 95% des marqueurs de surface des cellules conjonctives CD90, CD73 et CD105
- Être négative (moins de 2%) aux marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 et aux molécules de surface HLA de classe II. Le phénotype des MSCs est confirmé par l'absence d'autres marqueurs, en particulier ceux de la lignée hématopoïétique
- Avoir la capacité de se différencier *in vitro* en cellules ostéoblastiques, chondrocytaires, et adipocytaires dans des conditions de cultures standardisées

### **2.2.1 Les techniques d'isolation des cellules souches dentaires :**



*Illustration 11 : Fragmentation de la pulpe à l'aide d'un scalpel avant l'isolation des DPSCs (80)*

Différents facteurs comme le milieu de culture (74)(75), la pression en O<sub>2</sub> (76) et le traitement de la pulpe pendant l'isolation (77)(78) peuvent influencer la prolifération cellulaire.

Initialement, avant toute technique d'isolation, la pulpe est décontaminée avec une solution stérile saline tamponnée au phosphate (PBS). Puis, elle est découpée en fragments allant de 0,5 à 2 mm<sup>3</sup> à l'aide d'un scalpel.

Les prélèvements sont ensuite digérés mécaniquement ou enzymatiquement afin de dissocier la matrice extra-cellulaire

### **2.2.1.1 La méthode de digestion enzymatique**

Au préalable, les fragments de tissus sont rincés minimum deux fois avec une solution stérile de PBS.

Ils sont ensuite placés dans une solution enzymatique pendant 30 à 45 minutes à 37 degrés Celsius. L'incubation de la pulpe à 37°C permet non seulement la digestion du tissu mais également la libération des cellules.

Puis, la suspension cellulaire peut être obtenue en passant le mélange précédent au travers d'un tamis de 70 microns, ou en centrifugeant l'homogénat.

Le culot récupéré sera alors remis en suspension dans un milieu de culture afin de poursuivre son expansion. L'ajout au volume final d'un milieu de culture permet de neutraliser la digestion enzymatique.

Les combinaisons enzymatiques varient selon les méthodes mais contiennent généralement une ou plusieurs des enzymes suivantes en proportion variable, facilitant la destruction des structures extracellulaires :

- Collagénase de type I. Elle est capable de rompre les liaisons peptidiques du collagène de type I.
- Dispase. Appartenant à la famille des protéases, elle clive la fibronectine et le collagène.
- Trypsine, également connu sous le nom d'enzyme protéolytique. Membre des endoprotéases, elle hydrolyse les lésions peptidiques.

Il est également possible d'utiliser des agents de désagrégation comme l'EDTA.

Ajoutons que d'ailleurs, les DPSCs furent isolées la première fois par Gronthos et son équipe au cours de l'année 2000.

La méthode originale qu'ils utilisèrent consistait en une digestion enzymatique de la pulpe déjà fragmentée, avec 3 mg/ml de collagénase type I et 4 mg/ml de dispase pendant 90 minutes à 37 degrés. Cette méthode fût reprise par de nombreux scientifiques lors de l'isolation des DPSCs.

Néanmoins, d'autres protocoles firent leur apparition, variant les proportions et les agents de digestions utilisés.

Entre autre, Vina-almunia et son équipe (79) ont élaboré une méthode permettant de diminuer de la durée nécessaire à l'isolement des DPSCs.

Pour cela, ils ont combiné la fragmentation mécanique à divers agents de désagrégation (EDTA) et de digestion (collagénase, dispase, termolysine).

Ils utilisèrent successivement :

- 2 mg/ML EDTA pendant dix minutes
- 4mg/ml de collagénase de type I
- 4 mg/ml de dispase de type II pendant quarante minutes
- 13 mg/ml de termolysine pendant quarante minutes
- la sonication de la culture pendant une minute

Les premières cellules souches apparurent dès 8h d'incubation. De surcroît, la combinaison de différents agents ne sembla pas avoir compromis le pourcentage de DPSCs obtenu.

### **2.2.1.2 La culture d'explant : traitement mécanique de la pulpe**

Dans cette méthode, le tissu pulpaire est fragmenté en explants puis directement placés dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture enrichi en antibiotiques, en antifongiques, et en sérum.

L'ensemble est ensuite placé dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, et associé à un renouvellement régulier du milieu de culture.



*Illustration 12 : Culture d'explants dans le processus d'isolation des DPSCs dans un milieu de culture contenant de la streptomycine, de la pénicilline et de l'amphotéricine B. Photos réalisées par une équipe de recherche sous la direction de M. Guzman-Urbe (80)*

En définitive, les deux méthodes aboutissent à l'obtention de DPSCs.

Cependant, de nombreuses équipes se sont intéressées aux différents effets encourus par les populations cellulaires pulpaire selon la méthode d'isolation choisie.

Les nuances les plus significatives entre les deux procédés se rapportent au nombre de cellules ainsi qu'à leur homogénéité (81). Tandis que le taux cellulaire est toujours plus important lors de la digestion enzymatique, la méthode de l'explant permet l'expansion de cellules fibroblastiques-like lors de la culture de pulpes dentaires.

## **2.2.2 Tri et filtration cellulaire : les techniques de purifications**

### **2.2.2.1 Par adhésion au plastique**

Après leur dissociation, les cellules récemment individualisées sontensemencées dans les boîtes de culture.

Cela permet d'éliminer des contaminants cellulaires restés en suspension comme certains précurseurs ou cellules souches hématopoïétiques présents dans la pulpe.

Les DPSCs / cellules progéniteurs se multiplient afin d'engendrer des unités formant des colonies de fibroblastes (UFC-Fs) adhérentes au plastique.

Néanmoins, l'adhésion change inévitablement l'expression des marqueurs de surface et les propriétés biologiques des cellules.

### **2.2.2.2 Par migration et multiplication**

Ce procédé non agressif est utilisé essentiellement dans le cadre de la culture d'explants et permet d'éviter aux cellules de subir un bain enzymatique.

### **2.2.2.3 Par taille**

La suspension cellulaire, obtenue suite à une digestion enzymatique de la pulpe, est filtrée au travers d'un tamis afin de retirer les derniers débris non digérés. En effet, les cellules souches adultes présentent un petit diamètre comparé aux autres types cellulaires (82). Par cette approche, les DPSCs sont purifiées.

#### 2.2.2.4 Immunosélection : Par tri cellulaire par action magnétique / fluorescente

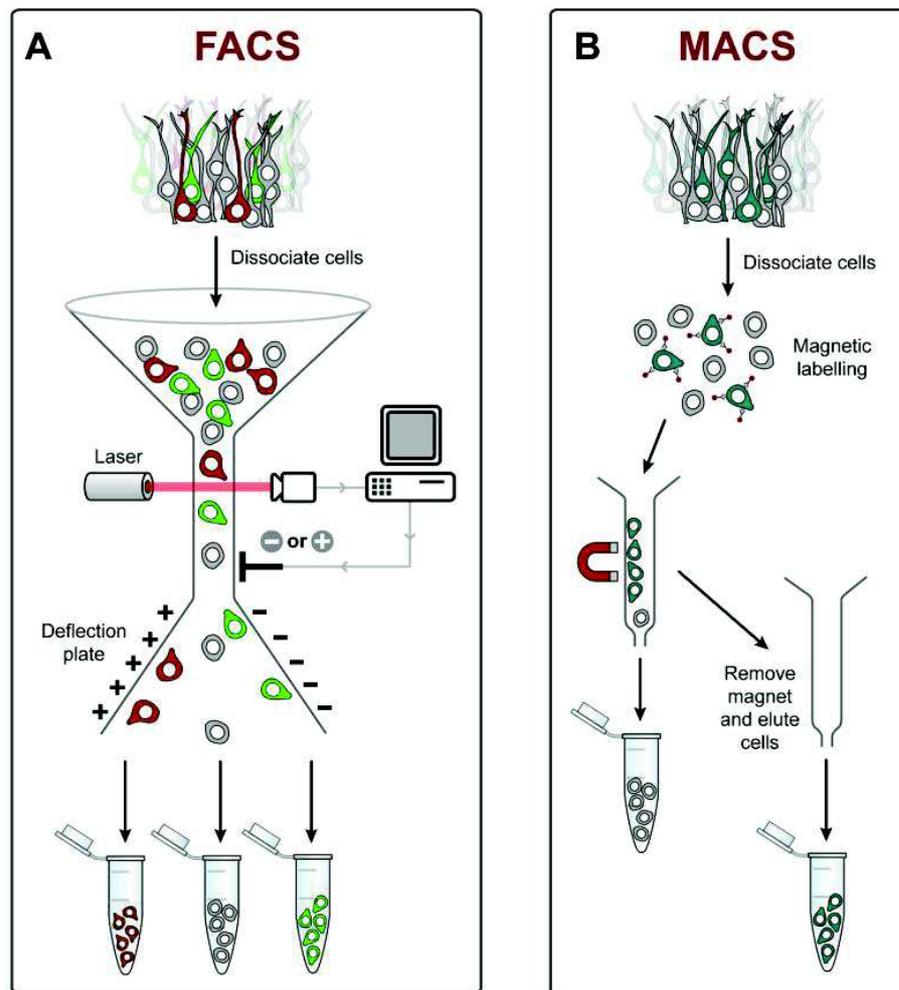


Illustration 13 : Schémas représentant en A la cytométrie de flux et en B le tri cellulaire magnétique

##### 2.2.2.4.1 Tri cellulaire magnétique : Magnetic activated cell sorting (MACS)

L'utilisation de nanoparticules magnétiques permet de séparer efficacement une population cellulaire définie, mais également d'identifier des cellules en fonction de leur phénotype, c'est à dire grâce aux antigènes présents à leur surface.

Les cellules peuvent être isolées par sélection positive ou négative.

Dans la sélection positive, les cellules d'intérêt sont incubées avec des particules magnétiques directement conjuguées à des anticorps spécifiques, reconnaissant un antigène de surface propre au type cellulaire à isoler.

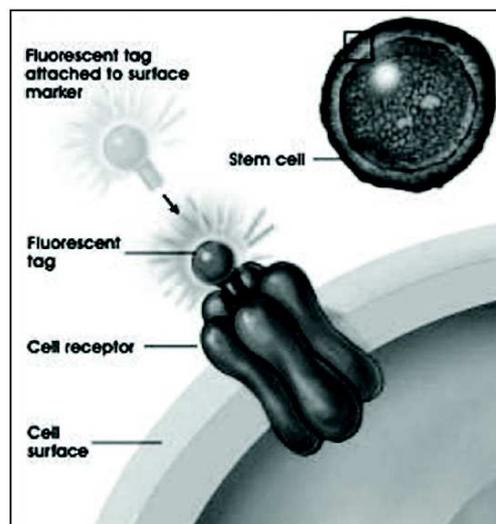
Dans la sélection négative, la population d'intérêt reste intacte mais les autres cellules sont marquées. Cette méthode est effectuée lorsqu'il y a un risque de modification de la fonction cellulaire par l'anticorps où quand il n'existe pas de marqueurs spécifiques. Dans cette technique, l'anticorps n'est pas directement fixé à la particule magnétique, mais nécessite la présence d'un second anticorps, dirigé contre le premier, lui-même fixé à la particule magnétique.

Une fois la population cellulaire à isoler marquée, elle est retenue par le courant magnétique d'un aimant, permettant d'évacuer les cellules non marquées.

#### 2.2.2.4.2 Cytométrie en flux : Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Cette technique est basée sur le même principe que précédemment.

En effet, il s'agit de trier les cellules en solution en les liant à une ou plusieurs molécules fluorescentes, appelées fluorochromes. Ils seront eux-mêmes fixés aux cellules grâce à un ou plusieurs anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires spécifiques.



*Illustration 14 : Schéma représentant la fixation de la molécule fluorescente sur la cellule souche*

La population cellulaire est ensuite passée devant un laser qui peut analyser, dénombrer et même trier physiquement les cellules marquées, en fonction de leur morphologie, de leurs organites intracellulaires ou de leur fluorescence. Ce tri est permis par la lumière réémise par le fluorochrome après absorption de la lumière laser.

Ainsi, la cytométrie en flux permet non seulement d'évaluer le niveau relatif d'expression d'une protéine dans différentes cellules, mais également d'identifier des populations ou sous-populations cellulaires et de les quantifier en taux relatifs

Néanmoins, FACS est une méthode coûteuse, présentant un risque de semi-stérilité de l'échantillon et de lésion des cellules par les charges électriques appliquées.

Tandis que la méthode du tri cellulaire magnétique apparaît comme simple et peu coûteuse (83).

### **2.3 La mise en culture des cellules souches**

Préalablement, la culture cellulaire consiste en l'expansion de cellules dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture. Le tout est ensuite placé à l'étuve (5% CO<sub>2</sub> à 37°C).

Dès qu'elles sont sur le point de remplir toute la surface, elles sont collectées, par l'intermédiaire d'enzymes telles que la trypsine ou la collagénase, et cultivées à nouveau. Ceci est couramment appelé : un passage en culture. Ce renouvellement est crucial afin de retirer les autres cellules de la culture et de mesurer indirectement la sénescence. Notons, qu'un passage peut durer des semaines en fonction des conditions de cultures et/ou de l'organisme du donneur (en bonne santé ou non, jeune ou âgé,).

Habituellement, après le quatrième passage, les MSCs sont prêtes pour un usage clinique. Bien que les cellules souches saines atteintes de sénescence apparaissent seulement après une dizaine de passages, une culture prolongée peut interférer avec leur habilité à se différencier (84). Mais elle peut également induire un raccourcissement progressif de la longueur du télomère au risque de créer une instabilité génomique (85).

Par ailleurs, les conditions de cultures influencent les caractéristiques des cellules. Ainsi, le bio-milieu choisi peut modifier non seulement la manipulation et les techniques de cultures mais également la morphologie et les potentiels de différenciation des cellules. Cela est d'autant plus vrai, lors de la culture d'une population cellulaire

hétérogène contenant des éléments à différentes étapes de différenciation comme la pulpe dentaire.

En effet, l'optimisation du milieu de culture est un des buts de la culture de cellules souches destinées à être utilisées en ingénierie tissulaire et en thérapie cellulaire.

Notamment, une équipe de chercheurs a comparé, après une cryopréservation de quelques jours, des DPSCs issues de cultures en milieu témoin à celles provenant d'un milieu ne contenant pas de sérum. Ces dernières ne montraient pas d'anomalie du caryotype. De surcroît, la minéralisation et l'expression génique de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine, de la sialophosphoprotéine dentinaire étaient accrues (86).

Par ailleurs, d'autres études ont démontré l'intérêt de compléter le milieu en sérum humain autologue. Une amélioration de la prolifération des DPSCs sans dommage cellulaire collatéral fût observé (87).

## **2.4 La cryopréservation des cellules souches dentaires**

La cryopréservation permet de conserver des cellules ou un tissu entier grâce à un refroidissement à de très basses températures, généralement autour de  $-196^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide (88).

A ces températures, toute activité biologique, incluant les réactions biochimiques qui conduiraient à la mort cellulaire, est stoppée.

En effet, la conservation cryogénique arrête l'horloge biologique des cultures cellulaires. Mais elle prévient également toutes les réactions chimiques thermodépendantes.

Néanmoins, le processus de congélation reste stressant pour les cellules, et il est important de réduire ce stress afin de maximiser leur récupération et survie ultérieure.

Ainsi, la cryogénéisation doit être lente. L'eau libre intracellulaire sera alors expulsée de la cellule par force osmotique, entraînant une déshydratation et un rétrécissement complets de cette dernière.



Unité de Thérapie Cellulaire (UTC)  
du CHRU de Montpellier



Cuve d'azote liquide pour la  
cryoconservation à l'UTC de  
Montpellier

L'utilisation conjointe d'un agent de cryoprotection est nécessaire pour minimiser ou empêcher les détériorations associées à une congélation lente.

En effet, si elle est trop ralenti, elle risque de provoquer des effets de déshydratations graves entraînant une perte de membrane irréparable et une perturbation du cytosquelette et des organelles.

Une grande variété de produits chimiques assure une cryoprotection adéquate. Cependant, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le glycérol sont les plus largement utilisés (89). Ils sont mélangés à la suspension cellulaire puis le tout est placé dans un récipient de stockage adapté à des températures très basses.

Les cultures cellulaires congelées nécessitent peu de temps et d'efforts. Cependant, une maintenance régulière du congélateur ultra-froid est requise.

En définitive, les cultures congelées assurent une ligne de base pour mesurer ou comparer les modifications futures induites par l'expérience. De surcroît, elles servent de source de réserve pour remplacer les pertes occasionnelles dues aux contaminations ou aux accidents.

*Illustration 15 : Photos montrant les cuves d'azote de l'unité de Thérapie Cellulaire du CHRU de Montpellier*

## **2.5 La comparaison des cellules souches mésenchymateuses dentaires : ambigüités et facteurs de variation**

Différentes données peuvent influencer la comparaison des cellules souches mésenchymateuses dentaires entre elles et conduire à une certaine variabilité dans les résultats exprimés :

- La méthode de dissociation : trypsinisation, raclage mécanique ou culture en suspension
- La combinaison des différents marqueurs
- Le procédé d'identification : par adhérence au plastique, par perles magnétiques ou par FACS
- Les autres facteurs
  - la lignée cellulaire ou *ex vivo*
  - l'âge du donneur
  - le sexe du donneur
  - l'état de santé du donneur
  - la composition du milieu de culture
  - les cellules nourricières utilisées
  - les conditions de cultures (températures, mouvements, etc)
  - l'agent de différenciation utilisé
  - la fréquence de changement du milieu de culture
  - le premier changement de milieu.

L'isolation et la cryopréservation de cellules souches constituent actuellement des démarches onéreuses. D'autant plus que la majorité des thérapies recourant à l'utilisation de cellules autologues sont encore à l'état d'expérimentation et donc incertaines.

Ne serait-il pas préférable d'avoir recours à une réserve cellulaire quasi illimitée tout au long de la vie telles les cellules souches adipeuses pour un usage autologue ? Contrairement à celles issues de la moëlle osseuse, elles peuvent être obtenues par un procédé moins invasif qu'est la lipoaspiration et sont disponibles en plus grand nombre. Et dédier les cellules souches dentaires à des thérapies allogéniques profitables à un nombre plus important d'individus ?

### **3. Les cellules souches adipeuses, une alternative envisageable aux cellules souches dentaires ?**

En raison de la difficulté de récolte des cellules souches dentaires et de leur nombre souvent insuffisant, les cellules souches non issues de tissus dentaires sont rapidement devenues un axe de recherche prioritaire pour la régénération dentaire.

A ce jour le tissu adipeux apparaît comme une source de plus en plus prometteuse en thérapie cellulaire, compte tenu de la faible morbidité liée à son prélèvement et du nombre conséquent de MSCs qui en dérivent (90).

#### **3.1 La valeur de ces cellules souches**

Les ASCs (Adipose Stem Cells) présentent des intérêts qui ont su éveiller la curiosité des scientifiques.

Tout d'abord comme leurs homologues (cellules souches adultes), elles ne soulèvent aucun problème éthique.

De plus le tissu adipeux blanc est très abondant dans l'organisme, soit 10 à 20% du poids corporel chez l'homme adulte.

Les dépôts adipeux sous-cutanés sont facilement accessibles avec une procédure peu invasive, la lipoaspiration. Néanmoins, ces cellules subissent différentes agressions tout au long du processus et peuvent être plus ou moins malmenées au cours des différentes étapes.

Cette source abondante et quasi inépuisable, n'oblige pas la culture longue des cellules et permet une réinjection extemporanée, directement après purification (91). Ainsi, le risque d'altération génomique est diminué. Toutefois, une surveillance génomique est recommandée avant toute utilisation lors d'applications cliniques (92).

Enfin, la disponibilité de cette source cellulaire évite une cryoconservation relativement coûteuse. En revanche, les cellules souches dentaires n'en sont pas exemptées.

En effet, si l'on désire utiliser les SCAPs où les DFSCs de façon autologue, il est impératif de les prélever lorsque la dent est encore à l'état de germe c'est à dire durant la jeunesse de l'individu. Il en est de même pour les SHEDS issues des dents

temporaires. D'autre part, notons que toute cellule souche dentaire doit provenir d'une dent saine, chose éminemment plus répandue chez les individus jeunes. Cela implique la nécessité de les conserver pendant des années avant leur probable utilisation.

### **3.2 L'utilisation des ASCs en dentisterie**

Les ASCs sont des cellules souches mésenchymateuses multipotentes au même titre que les DPSCs et les BMMSCs.

Bien que les caractéristiques intrinsèques des ASCs semblent différentes de celles des BMMSCs, elles exhibent une robuste ostéogenèse leur permettant d'être une alternative aux cellules souches mésenchymateuses lors de régénération osseuse en dentisterie. Par exemple, Pieri et son équipe utilisèrent des ASCs autologues lors d'une régénération osseuse orofaciale et de la mise en place d'implants sur le lapin.(93) De fait, les ASCs paraissent utiles à l'augmentation osseuse alvéolaire verticale lors de traitements implantaires.

De plus, il fut également démontré qu'à partir d'ASCs :

- la régénération du tissu parodontal sur la rat est possible (94)
- leur transplantation dans une cavité pulpaire après une pulpectomie sur le chien induit une régénération pulpaire (95)

En revanche, une autre équipe scientifique a comparé le potentiel odontogénique des BMMSCs et ASCs *in vitro* et *in vivo*. Elle en a conclu que les BMMSCs présentent un meilleur potentiel de différenciation odontogénique et sont donc une source cellulaire plus appropriée pour la régénération dentaire (90).

La communauté scientifique s'accorde sur le fait que les ASCs sont bel et bien des cellules souches mésenchymateuses à fort potentiel. De plus, leur fréquence dans le tissu adipeux est de 100 à 500 fois supérieure à celle des BMMSCs dans la moelle osseuse (96).

L'isolement des ASCs est facilité car elles sont à la fois plus nombreuses et plus accessibles que les BMMSCs.

Toutefois, un bémol a été posé par de récentes études. Elles ont montré que le nombre de cellules souches mésenchymateuses décroît avec l'âge du donneur.

Une diminution du potentiel global d'expansion associée à la réduction de la longueur du télomère entraînerait une inhibition de la mobilisation des cellules souches hors de leur niche (97).

En définitive, de nombreuses questions au sujet des ASCs restent à élucider avant de les promouvoir au même titre que les BMMSCs et les DPSCs dans la dentisterie régénérative.

Par exemple, ont-elles toutes la même origine ? Les mêmes capacités ?

Une équipe scientifique a montré en 2007 que la plasticité des ASCs différait en fonction de leur localisation dans le tissu adipeux (98).

#### **4. La conservation des cellules souches : biobanques, éthique et législation**

Il est important de distinguer d'emblée le cas d'une utilisation de cellules souches autologue (le receveur est le donneur) de celui d'une utilisation allogénique (le receveur est différent du donneur, et l'on peut envisager plusieurs, sinon un nombre important de receveurs).

##### **4.1 Existe t'il une modification du potentiel des cellules souches autologues au cours du vieillissement ? Si oui, cela impose t'il la nécessité du développement des biobanques à usage privé ?**

Les changements survenus aux cellules souches mésenchymateuses, lors du vieillissement physiologique de l'hôte, se caractérisent par une modification possible du potentiel de (99) :

- prolifération altérant la quantité de cellules
- différenciation/régénération influençant la qualité des populations cellulaires
- mobilisation bouleversant leurs propriétés migratoires

Par exemple, la comparaison de DPSCs issues d'un donneur âgé à celles issues d'un donneur jeune a démontré un léger déclin lié à l'âge dans leurs propriétés incluant la migration. En outre, elle a révélé une augmentation âge-dépendant dans leur

sénescence, associée à la production de beta-galactosidase et des marqueurs de la sénescence en culture à long terme (100).

De même que lors d'expériences *in vitro*, les cellules ont été mises dans des conditions d'hypoxie tissulaire (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>), simulant les conditions réelles dans la pulpe d'une personne vieillissante. Les DPSCs ont crû même sous les 3% d'apport en oxygène dans le milieu, et ont réussi à surmonter cette carence, indiquant la possibilité d'obtenir un nombre optimal de DPSCs chez des patients plus âgés. Cependant, leur capacité de différenciation fût enrayée.

Par ailleurs, la pulpe dentaire réduit avec le vieillissement, de part l'étroitesse des canaux radiculaires mais également par la diminution des volumes tissulaires pulpaire due à la formation ainsi qu'à la minéralisation de dentine secondaire physiologique et tertiaire pathologique. On observe donc un amoindrissement de l'apport de DPSCs autologues lors du vieillissement.

Ainsi, même si les DPSCs issues de dents âgées conservent leur propriété de multiplication, elles perdent leur capacité de différenciation totalement ou partiellement (101).

D'autre part, la pulpe d'une dent permanente provenant d'un patient âgé montre certaines limitations lors de l'isolation de ses DPSCs. En effet, la présence de sous-populations de cellules souches peut être très restreinte. Il a été émis l'hypothèse que les anciennes niches possèdent un effet délétère sur les nouvelles cellules qui acquerraient des altérations de leurs antigènes (102) .

Ainsi, pour un usage optimal des cellules souches dentaires, il est important de les prélever au moment adéquat comme lors de l'avulsion de dents de sagesse à l'état de germe.

Les préserver pour un éventuel usage autologue est possible par leur cryoconservation dans des biobanques privée. Cependant, la thérapie cellulaire autologue apparaît comme difficile à industrialiser, très coûteuse et n'est pas encore établi.

Notamment, cela introduit le paramètre d'une médecine à deux vitesses entre ceux qui ont les moyens de s'acquitter des frais de cryopréservation assez onéreux et les autres. Par ailleurs, les banques de cellules souches autologues sont encore proscrites en France, même si elles se sont développées dans les pays voisins comme la Suisse et la Grande-Bretagne.

Les cellules souches dentaires ne seraient-elles pas plutôt destinées à un usage allogénique ?

## **4.2 La place des biobanques dans le développement des médecines régénératives**

Les cellules souches suscitent un engouement parmi la communauté scientifique mais intéressent également l'opinion publique, les médias et les autorités législatives. En effet, outre leurs propriétés régénératives, elles soulèvent des problèmes éthiques et réglementaires.

Actuellement, une grande majorité de la population française a déjà entendu parler de ces nouveaux procédés thérapeutiques destinés à guérir des maladies jusque-là incurables ou invalidantes.

### **4.2.1 La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire**

La thérapie cellulaire désigne l'apport de cellules visant à rétablir les fonctions d'un tissu ou d'un organe altéré par un accident, une pathologie ou le vieillissement (103).

Néanmoins, des études ont révélé que le rôle de certains progéniteurs pourrait être potentialisé en les associant à un microenvironnement adéquat (104). C'est l'essence même de l'ingénierie tissulaire. En effet, dans cette approche les cellules souches sont incorporées dans des biomatériaux de supports, associées ou non à des facteurs moléculaires. Le but est de permettre la formation artificielle d'un tissu ou d'un organe en guidant l'expansion et la différenciation des cellules.

Le marché mondial de la médecine régénérative est aujourd'hui en pleine émergence et présente une forte croissance d'environ 30% par an.

Les greffes cellulaires peuvent être de trois types:

- Autogreffe : le donneur et le receveur sont une même personne
- Allogreffe: le donneur et le receveur sont deux personnes différentes
- Xénogreffe : les cellules proviennent d'un individu d'une espèce différente

Actuellement les travaux de médecine régénérative restent majoritairement centrés sur les solutions autologues, seules 30% des études en cours portent sur la voie allogénique.

Ceci s'explique par la crainte de problèmes d'immunotolérance plus prononcés avec la voie allogénique et l'absence jusqu'à présent d'une source de cellules souches mésenchymateuses suffisamment disponible, stable et présentant des capacités de multiplication intéressantes. L'utilisation de la pulpe dentaire dans des applications de médecine régénérative pourrait inverser la tendance.

#### **4.2.2 Les acteurs de la médecine régénérative**

De nos jours, les modèles exploités ou proposés pour répondre aux besoins de la thérapie cellulaire sont les suivants :

- les cellules souches hématopoïétiques, le plus souvent utilisées pour traiter des maladies sanguines (comme les leucémies)
- les cellules souches embryonnaires et les cellules induites (iPS) posent des problèmes d'éthiques et de sécurisation (stabilité génomique des iPS)
- les cellules souches mésenchymateuses, utilisées en médecine régénérative mais dont la multipotence peut être limitée selon la source utilisée

Parmi les cellules souches mésenchymateuses disponibles pour répondre aux besoins thérapeutiques et pharmaceutiques, toutes sont multipotentes, mais certaines présentent des limites quant à leur utilisation (105) :

- les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse imposent un prélèvement invasif et une hospitalisation
- la lipoaspiration lors du prélèvement des ASCs peut être traumatisant pour les cellules et risque de les léser.
- les cellules souches mésenchymateuses du sang du cordon ont un champ d'application ciblé et sont peu nombreuses
- les cellules souches mésenchymateuses dentaires sont disponibles ponctuellement lors d'avulsions de germes de dents de sagesse et nécessitent une cryoconservation

Toutefois, les cellules souches dentaires offrent l'avantage d'être (85) (51):

- Multipotentes, ces cellules souches d'origine post-embryonnaire possèdent les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses à savoir une capacité d'auto renouvellement et celles de se différencier en plusieurs types cellulaires comme les ostéoblastes et les chondrocytes, et tissulaires comme adipeux, endothélial et neural
- Disponibles avec 80% des adolescents et jeunes adultes subissant une avulsion dentaire pour des raisons orthodontiques dans les pays occidentaux. Les cellules conservées chez un enfant ou un jeune adulte seront d'une meilleure qualité que celles collectées chez un adulte (capacité de réplifications, nombre de cellules..)
- Naturellement protégées au sein d'échantillons stériles car issues de la pulpe dentaire située dans la cavité centrale que sont la chambre pulpaire associée aux canaux radiculaires.
- Accessibles
- Capable d'une forte capacité de multiplication cellulaire

#### **4.2.3 Allogénique ou autologue ?**

Les cellules souches autologues proviennent du patient lui même. Elles sont bien tolérées et n'entraînent pas de réponse immunitaire. De plus, elles soulèvent moins de questions éthiques et peuvent être multipliées *in vitro*.

Par contre leur approvisionnement est limité et fait appel à des techniques plus ou moins invasives, allant du prélèvement de moëlle osseuse, à l'extraction dentaire en passant par la lipoaspiration, selon la source de cellules souches que l'on souhaite utiliser.

La médecine régénératrice sous forme autologue présente les gros désavantages d'être particulièrement difficile à industrialiser, en raison de la variabilité cellulaire inter individuelle, et d'être très onéreuse. D'autant plus qu'elle nécessite la formation de deux sites opératoires sur le patient.

Les cellules souches allogéniques sont quant à elles originaires d'un individu différent. Cependant le typage HLA (phénotype antigénique leuco plaquettaire humain) permet d'assurer la compatibilité entre donneur et receveur (106).

Elles ont l'avantage d'être immédiatement disponibles et de ne pas nécessiter de procédures invasives supplémentaires. Ces cellules ont été prélevées chez des jeunes donneurs en bonne santé et sont conservées dans des biobanques. Ainsi, elles sont utilisables immédiatement et en plus grand nombre que les cellules autologues.

Néanmoins, elles initient fréquemment des réactions immunitaires et risquent potentiellement de transmettre des pathologies entre donneur et receveur.

#### **4.2.4 La stabilité génomique, un risque majeur de la médecine régénérative**

L'instabilité génomique est considérée comme un des freins le plus important au développement des thérapies à base de cellules souches.

D'ailleurs, la détermination de la longueur du télomère et l'âge des cellules souches sont nécessaires avant leur utilisation en médecine régénérative (107).

La survenance de mutations génomiques spontanées et d'éventuelles anomalies du caryotype apparaissent lors d'une culture cellulaire longue. Il a été suggéré, que la modification de structures télomériques peut être induite par le stress oxydatif, la lumière UV ou l'irradiation (108).

Les modifications épigénétiques s'accompagnent en particulier de la méthylation de l'ADN au niveau des résidus cytosines des îlots CpG.

Il faut souligner que les méthodes classiques telles le caryotype et les puces SNP (Single Nucléotide Polymorphism) ne permettent pas de suivre la sénescence cellulaire. La seule approche méthodologique permettant de mettre en évidence ces modifications épigénétiques est l'analyse de la méthylation par séquençage haut débit de l'ADN.

En outre, Boyle et son équipe ont attesté qu'une instabilité chromosomique de cellules souches dentaires est la cause de l'augmentation de leur prolifération tout en empêchant leur différenciation et ainsi diminue les capacités de transplantation de ces cellules. C'est pourquoi elles ne sont plus aptes aux applications thérapeutiques.

Actuellement, un des challenges de la médecine régénérative est d'enrayer l'accumulation d'aberrations chromosomiques.

#### **4.2.5 Les modèles animaux de la recherche en médecine régénérative : un souci pour l'extrapolation à l'Homme ?**

L'effet des cellules souches mésenchymateuses doit être étudié dans un environnement physiologique, de façon à appréhender leurs véritables comportements. Cela permettrait de déterminer non seulement leur efficacité et leur devenir à plus ou moins long terme mais également leur distribution tissulaire en fonction de la voie d'administration et leur toxicité sur l'organisme.

Les recherches en découlant utilisent généralement des modèles animalisés très variés. Les plus appréciés sont les rongeurs, en particulier les souris. En effet, elle sont facilement entretenues en laboratoire et représentent un moindre coût comparé à d'autres espèces (109) tel que les singes.

Il est important de souligner que la taille des animaux entraîne une difficulté d'extrapolation à l'homme. En effet, plus les modèles sont petits, plus la dose de cellules souches mésenchymateuses injectées sera importante en comparaison des doses couramment utilisées en thérapies cellulaires chez l'homme.

A titre d'exemple, afin d'éviter une embolie pulmonaire chez la souris lors d'études *in vivo* (110), il faut se limiter à injecter entre 0,5 et 2 millions de cellules souches mésenchymateuses en intraveineuse (soit une dose de 20 à 80 millions de cellules par kilos). En comparaison, lors d'un essai clinique sur l'injection de MSCs en intraveineuse post AVC, les patients reçurent entre 100 à 300 millions de cellules d'un coup. Cela représentait une dose d'1 à 4 million de cellules par kilos. Il existe donc bien un biais de dose thérapeutique, d'autant plus lorsque l'on sait que la concentration de cellules injectées influe sur leurs effets.

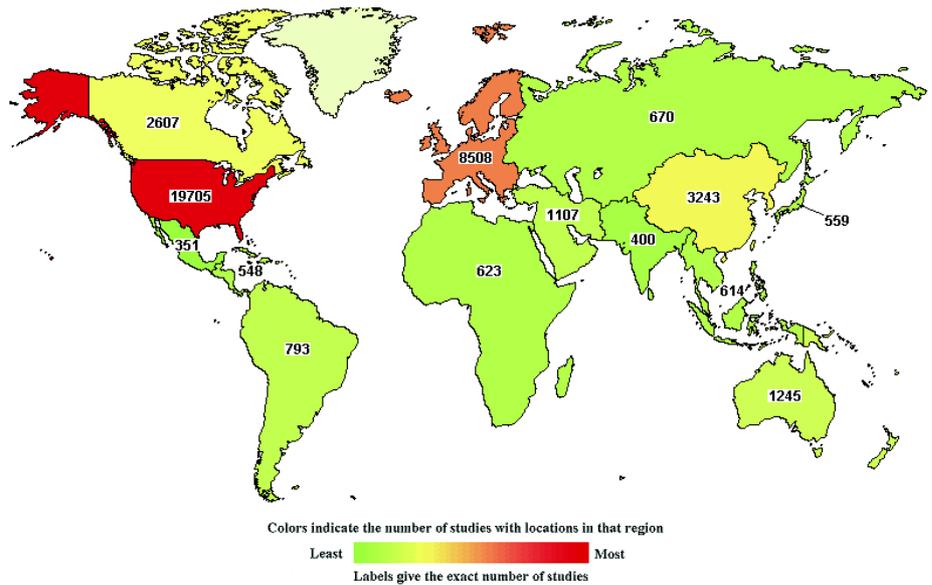
Par ailleurs, il est établi que les niches cellulaires sont à la base des mécanismes régénératifs des cellules souches (17). Toutefois, il existe des différences entre les milieux tissulaires humains et animaliers, pouvant induire des déviations dans le comportement des MSCs injectées. Le comportement des cellules souches humaines dans le milieu animal produit-elle des données suffisamment fiables pour permettre une extrapolation en milieu humain ?

Pour toutes ces raisons, les modèles animaliers aussi divers soient-ils, présentent des avantages et des inconvénients devant être pris en considération.

La diversité des méthodes d'investigation sur les cellules souches mésenchymateuses illustre l'importance de ce champ d'étude.

#### 4.2.6 La place de la France dans la recherche sur l'évolution des médecines régénératives

Le site américain « *ClinicalTrial.gov* » de l'*U.S National Institutes of Health* recense en 2016, 33714 études dans le monde portant sur les médecines régénératives, toute origine cellulaire confondue.



Source: <https://ClinicalTrials.gov>

Illustration 16 : Cartographie de la recherche mondiale sur la médecine régénérative en 2016

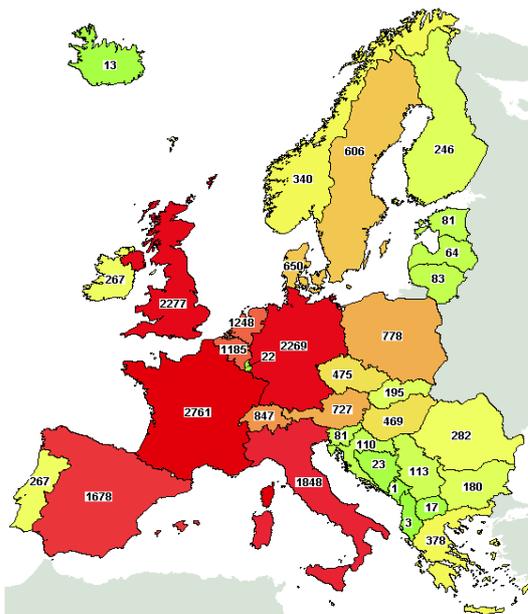


Illustration 17 : Cartographie Européenne de la recherche sur la médecine régénérative en 2016

Cela témoigne de l'engouement actuel montré par la communauté scientifique au sujet de ces thérapies.

On constate que les États-Unis apparaissent comme les leaders mondiaux dans le nombre de recherches cliniques effectuées. Elles sont deux fois supérieures à celles des pays Européens réunis.

Néanmoins, la France est à la tête des pays Européens avec 2761 études portant sur la médecine régénérative toutes confondues,

suivi de peu par la Grande-Bretagne et l'Allemagne.

L'importance des découvertes et le nombre grandissant de preuves du bénéfice de la médecine régénérative en font bel et bien un domaine à part entière, avec un avenir assuré. Ainsi, la recherche sur les cellules souches mésenchymateuses s'intensifie et se diversifie.

Toutefois, plusieurs problèmes apparaissent des études et essais cliniques déjà réalisés (39) :

- le manque d'une base de données cliniques prouvant la sécurité de la thérapie à long terme
- l'association indéterminée entre les fonctions biologiques des MSCs et leurs caractéristiques phénotypiques
- la nécessité d'éclaircir les mécanismes liés à la transplantation *in vivo*
- le manque de comparaison avec les techniques ne faisant pas appel aux MSCs

### **4.3 Réglementation en vigueur**

#### **4.3.1 La loi de bioéthique**

De tout temps, les cellules souches ont suscité de l'intérêt de la part de la communauté scientifique mais également des populations et des gouvernements. Cela a débuté par les cellules souches embryonnaires. Effectivement, pendant des années, elles ont fait l'objet d'un intense débat soulevant des questions complexes sur les plans moraux, juridiques, éthiques et politiques. Alors que l'embryon disposait encore d'un statut juridique mal défini, il était nécessaire de prévoir un encadrement strict de la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines.

En 1994, la France se dote pour la première fois d'une loi dite de « bioéthique », afin d'établir des normes dans la pratique des sciences du vivant.

Elle permet également de garantir le respect du corps humain dans le cadre des pratiques médicales et d'encadrer le don et l'utilisation des éléments issus d'un individu (organes, tissus, cellules souches hématopoïétiques).

Néanmoins, 10 ans plus tard, la plupart des articles furent révisés du fait de l'évolution scientifique engendré par les progrès technologiques. Ainsi, l'agence de la biomédecine (ABM) fût créée en même temps que la loi de bioéthique de 2004. Elle réside sous la tutelle du Ministère de la Santé (111).

Jusqu'en 2004, l'utilisation des embryons surnuméraires était interdite. Pourtant, l'établissement de lignées de cellules souches à partir d'embryons ou de fœtus issus d'avortements naturels ou provoqués était autorisé.

Ce n'est qu'en juillet 2004 que le Parlement autorisera les chercheurs à utiliser des embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Mais cela était possible uniquement dans un cadre très réglementé, pour une période probatoire de cinq ans et sous des conditions strictes (accord des deux parents, seulement pour des recherches « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs »).

D'autres pays d'Europe disposaient déjà de ce droit (Belgique, Danemark, Finlande, Hollande, Suède, Grèce et Grande-Bretagne) ce qui leur a permis un certain essor dans ce domaine en permanente évolution.

Aux États-Unis, la complexité de la situation persiste. En effet, la législation diffère si le financement des recherches est réalisé par des fonds publics ou privés. Mais elle diverge également, si elles sont menées sous l'égide d'institutions fédérales, locales et enfin selon le gouvernement élu (112).

Alors que les recherches sur les cellules souches embryonnaires font toujours débat, celle sur les cellules souches adultes a débouché sur un plus grand nombre d'essais cliniques et de traitements. Ceci s'explique en partie par la facilité de les obtenir et de les manipuler en laboratoire mais également par la dissuasion des investisseurs due à leur stigmatisation associée à la recherche embryonnaire.

En 2011, une deuxième révision des lois de bioéthique françaises est effectuée. Elle modifie notamment les modalités du don d'organes, et de l'assistance médicale à la procréation.

Récemment, le projet de la loi santé voté fin 2015 sous l'égide du Ministre de la santé, Marisol Touraine, autorise la recherche sur les gamètes et les embryons transférables.

Toutefois, l'utilisation des cellules souches adultes chez l'homme est l'objet d'un encadrement rigoureux et doit faire ses preuves avant d'obtenir l'approbation des

autorités compétentes (l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ou ANSM en France ; la Food and Drug Administration ou FDA aux États-Unis).

#### **4.3.2 Sur la recherche et la thérapie cellulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses dentaires**

L'application clinique des MSCs peut, quant à elle, être soumise à des contrôles stricts. En effet, les autorités de santé française sont particulièrement vigilantes à la mise en œuvre d'une thérapie cellulaire. Deux cas de figures sont à distinguer (113).

Tout d'abord, si le produit cellulaire est destiné à être fabriqué industriellement, il sera régulé par une approche plus de type médicament que de type greffe. Il appartiendra donc au champ de la pharmacovigilance.

Préalablement à sa commercialisation, il sera soumis à l'obtention d'une mise sous le marché et devra répondre à l'ensemble des dispositions législatives et réglementaires s'appliquant aux médicaments.

D'autre part, si le produit n'est pas destiné à une fabrication industrielle, il devra respecter les principes de la biovigilance et sera qualifié de « préparations de thérapie cellulaire ». Avant de délivrer toute autorisation, l'ANSM recueillera l'avis de l'Agence de biomédecine (ABM) (114). Ils évalueront les procédés de préparation, de conservation ainsi que leurs indications thérapeutiques (article L.1243-5).

En effet, la biovigilance consiste en une veille sanitaire sur l'ensemble des étapes de la chaîne, du prélèvement à la greffe, jusqu'au suivi médical des patients, donneurs vivants et/ou receveurs (115).

Toute demande d'essai clinique doit passer par l'ANSM et l'instigateur de cet essai a le devoir de notifier tout effet ou événement indésirable grave lié à l'essai clinique.

Ainsi, l'ANSM reprend les activités d'évaluation et d'inspection des produits de santé autrefois réalisés par l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé).

Dans les deux cas, la mise en œuvre doit s'assurer de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité des produits administrés aux patients.

Enfin, alors que les premiers textes de la législation française datent de 1996, la réglementation européenne est plus récente (directives de 2004 et règlement N°1394/2007/CE sur les « Médicaments de Thérapie Innovante » de 2007) et impose de revoir certains termes.

Effectivement, dans un désir d'harmonisation de la Commission européenne et de l'EMA (European Medicines Agency), les « préparations de thérapies cellulaires » changent de statut pour devenir des « médicaments de thérapie innovante » (116). En outre, les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) pour la manipulation des cellules et/ou des tissus évoluent vers les bonnes pratiques de fabrication (BPF) applicables aux médicaments.

### **4.3.3 Sur les biobanques**

Une part importante de la classification des maladies, et en particulier l'identification et la classification de cancers, a pu être réalisée grâce à l'exploitation des collections de tissus conservées dans les instituts d'anatomie pathologique. Si l'activité de collection n'est pas nouvelle, son ampleur, ses modalités et ses implications le sont.

Assurément, les progrès en bio-informatique ont permis de coupler un grand nombre d'échantillons et de données et ainsi d'accroître la puissance d'analyse des données (117). De surcroît, les techniques de cryopréservation s'étant sensiblement améliorées ces dernières années, elles ont rendu possible un stockage de qualité pour de longues périodes.

Par ailleurs, les biobanques se placent dans un réseau complexe de chercheurs qui sont dispersés de par le monde (118). L'impact espéré de ces structures est incontestable en termes de recherche médicale, de découverte de nouveaux médicaments et de soins de santé. Ainsi, l'établissement de ces infrastructures est nécessaire à une réponse rapide et efficace aux nouvelles questions scientifiques.

Plusieurs États soutiennent la formation de grandes collections nationales, comme l'Islande ou le Royaume uni.

Notons que le législateur français n'utilise pas les termes de biobanque ou de bibliothèque mais celui de collection, « collection d'échantillons biologiques d'origine humaine ». Le Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE) retient, quant à lui, les termes de collection, biobanque et bibliothèque.

La définition d'une biobanque est formulée différemment entre les auteurs d'articles scientifiques, les institutions, les sociétés et les organisations.

Globalement, une biobanque se compose de trois groupes d'informations relativement distincts :

- Le matériel biologique humain
- Les informations attachées ou connectées à l'échantillon
- Les questions juridiques comme le consentement, la sécurité des données et la protection des individus

Cela rend la science des biobanques compliquée et requérant une approche multidisciplinaire et universelle à tous les niveaux de son cycle de vie (119). Ce dernier peut être divisé en trois stades :

- La conceptualisation et la conception de la biobanque (avant)
- Le développement de la biobanque (pendant)
- L'utilisation de la biobanque (après).

Enfin, les biobanques peuvent être classées en fonction de la nature du matériel stocké (tissus, cellules, sang, ADN), du type de gestionnaire (privé - firme pharmaceutique, hôpital académique - ou public - ou géré en coopération avec le gouvernement), de la présence de participants sains ou de la taille de l'échantillon (régional, national) (120).

Il existe une multitude de biobanques, chacune d'entre elles étant singulière, ce qui rend l'aspect éthique de ce domaine particulièrement complexe car mouvant.

A quelles conditions les activités de collection et de traitement d'échantillons issus du corps humain peuvent-elles se dérouler dans un climat de confiance ?

L'industrialisation des biobanques tend-elle vers une inégalité d'accès aux soins ?

#### **4.3.4 Sur les brevets**

Le développement de la recherche sur les cellules souches offre d'importantes promesses thérapeutiques à long terme. Les investisseurs potentiels dans le domaine des biotechnologies souhaitent avoir la certitude d'une protection juridique des inventions par le brevet. Néanmoins, les brevets ne peuvent pas porter sur la matière

vivante elle-même, telle qu'elle existe dans la nature. En revanche, le fait d'extraire ces cellules, de les purifier puis de les multiplier en dehors du corps humain nécessite des procédés techniques extrêmement pointus qui peuvent quant à eux être brevetés (121).

La plupart des dépôts s'effectue directement auprès de l'office européen des brevets (OEB) (115).

Toutefois, le dépôt de certains brevets peut avoir des répercussions sur la recherche. En effet, le secteur privé peut être tenté de privilégier les secteurs les plus rentables à court terme, alors que tant d'inconnues persistent encore dans la connaissance des cellules souches.

La mise en place de biobanques nationales et internationales avec un partage des ressources permet d'éviter cela, tout comme la nécessité de conserver des politiques publiques de recherche.

#### **4.4 La mise en réseau des biobanques : challenges pour parvenir à une harmonisation**

##### **4.4.1 La différence entre standardisation et harmonisation**

Plutôt que de demander une uniformisation complète des biobanques, l'harmonisation est une approche plus flexible visant à assurer un échange efficace d'informations valides et d'échantillons. Inversement, la standardisation, exige la mise en place et l'utilisation des mêmes protocoles standardisés par les biobanques souhaitant collaborer.

L'harmonisation représente la tentative de conciliation des méthodes et des approches pour un travail synergique entre les différentes équipes. Elle permet également une génération, un partage, une mise en commun et une analyse des données et des échantillons biologiques. Ainsi, elle rendrait possible la combinaison de ressources et la comparaison des résultats provenant de différentes biobanques à l'échelle européenne voire mondiale (122).

Par ailleurs en 2010, l'institut Européen des études prospectives technologiques (IPTTS) en collaboration avec l'Observatoire Européen des Sciences et des Technologies

(ESTO) réalisa une enquête sur les biobanques européennes. Les résultats attestèrent de la fragmentation des pratiques et de la dispersion des activités de ces dernières.

Ils ont alors suggéré la création d'une organisation internationale, ou du moins l'organisation d'un réseau, permettant de favoriser l'harmonisation et la standardisation des pratiques (123).

Toutefois, un tel travail est actuellement encore impossible en raison des variabilités culturelles, législatives et institutionnelles entre les différents pays.

#### **4.4.2 La gouvernance des biobanques**

Venu de l'ancien français, cette notion est issue directement de l'anglo-américain *corporate governance*, traduit comme la *gouvernance d'entreprise*.

C'est un processus dynamique et adaptatif, permettant un partage efficace des échantillons et des données. Elle a comme objectif de favoriser l'avancement des connaissances, dans le respect des limites de la loi, des normes éthiques et des droits des personnes.

Les termes de gouvernance et réglementation sont souvent employés pour expliquer les mêmes activités. Néanmoins, l'utilisation du mot réglementation a une portée plus étroite. En effet, elle ne s'applique qu'aux structures juridiques officielles et aux organismes de réglementation légalement établis et pouvant jouer un rôle dans la réglementation de la recherche biomédicale (124).

La gouvernance est essentielle pour assurer l'appui du public et des organismes de financement, ainsi que certifier la protection et la sécurité des participants. Mais elle permet également le respect des perspectives culturelles ainsi que la disponibilité des données et des échantillons pour la recherche. Une saine gouvernance est donc indispensable pour assurer le succès d'une biobanque (125).

L'OCDE a proposé en 2009 cette définition : « *Gouvernance : Procédures et structures utilisées par une entité pour définir ses objectifs et ses buts, nommer une direction ayant pour mission d'atteindre ces buts et contrôler cette direction dans la poursuite de ces buts. Les mécanismes de gouvernance servent aussi à mettre en place des contrôles internes et des systèmes de gestion des risques. La direction est responsable devant les organes de gouvernance, qui à leur tour en répondent habituellement – ou devraient en répondre - à ceux qui les ont nommés* » (126).

L'accroissement important du nombre d'échanges de données et d'échantillons crée de nouveaux défis éthiques et réglementaires. A ce jour, il semble établi que la gouvernance des biobanques doit être revue. En effet, la multiplicité des sources normatives et des pratiques locales entraîne la création d'un système fragmenté et non harmonisé.

Tandis que la réglementation des biobanques demeure nationale, la recherche se globalise nécessitant la création de mécanismes globaux. En outre, de plus en plus de biobanques offrent un accès international à leurs ressources tout en conservant les normes existantes, tant au niveau juridique que éthique, le plus souvent inefficaces à les encadrer (127).

Bien qu'il n'existe aucun modèle unique de gestion pour l'ensemble des biobanques, et que les processus de gouvernance doivent être constamment contextualisés, la Commission Européenne a émis certaines recommandations en 2012 (128):

- développer un système cohérent de normes et de lois protégeant les droits fondamentaux des participants (vie privée, protection des données, usage des tissus humains)
- améliorer la coordination et la collaboration entre les comités de surveillance nationaux et assurer la reconnaissance mutuelle des décisions étrangères pour éviter la duplication des efforts
- créer des mécanismes de gouvernance durables
  - o Engageant le public pour assurer leur participation, leur appui et leur confiance
  - o Assurant la réciprocité entre la société et les biobanques
- intégrer les nouvelles entités émergentes dans les systèmes actuels afin de développer une méta-gouvernance des biobanques
- intégrer les biobanques au système de santé public, car elles constituent une ressource importante pour la médecine personnalisée, les soins cliniques et la recherche
- investir dans le développement de la gouvernance électronique pour faciliter le partage

Enfin, BBMRI (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) est la première infrastructure Européenne fondée en 2013 a agir comme une interface entre la recherche médicale de pointe et la population de l'Union Européenne. Elle vise à former un réseau dynamique de plate-formes dans lequel chacune coordonne de nombreuses activités. Il s'agit non seulement d'harmoniser les pratiques relatives à la collecte, le stockage et l'analyse des échantillons et des données associées mais également d'assurer le transfert efficace de connaissance et des technologies (informatiques) et enfin de définir un cadre légal, éthique et financier de référence (129).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle de gouvernance qui convienne à tous, elle doit plutôt être orienté vers les besoins particuliers de la biobanque. Il est important de rappeler que le but d'une gouvernance est de faciliter le progrès et la recherche.

#### **4.4.3 Législation comparée des biobanques**

La France est un des rares pays à avoir opté pour une conservation uniquement allogénique. Elle autorise l'archivage de lignées cellulaires de qualité clinique, ayant un phénotype antigénique leuco plaquettaire humain compatible avec les patients à traiter. Le typage HLA permet effectivement d'assurer la compatibilité entre donneur et receveur.

D'autre part, conformément au principe de non patrimonialité (l'article 16-1 du Code civil), le don de cellules souches d'origine humaine ne peut engendrer une rémunération du donneur et nécessite son consentement.

Entre autres, les pays tels que l'Allemagne, le Danemark, les Pays-Bas, la Pologne, le Royaume-Uni, le Canada et les États-Unis autorisent une coexistence de banques publiques et privées.

Quant à la Belgique, l'Espagne et l'Italie, ils ont dans un premier temps légiféré sur l'interdiction des banques privées. Cependant, une évolution progressive de la loi a autorisé leur installation sous contrainte de respecter certaines obligations.

Par exemple en Belgique, un vide juridique a permis à une banque privée de s'implanter. Effectivement, l'arrêté royal du 23 décembre 2002 interdisant les banques privées et le stockage en vue d'une utilisation personnelle a été annulé par la juridiction

administrative. Afin de clarifier la situation, une nouvelle loi fût adoptée en juillet 2008 autorisant les établissements privés, à conditions qu'ils soient rattachés à une banque publique. De plus, l'état Belge subordonne tout stockage au bénéfice d'un receveur identifié du fait que le greffon reste à la disposition des banques publiques (130).

Notons que le Parlement Européen recommande aux États-membres de prendre les mesures nécessaires pour encourager les dons volontaires non rémunérés et d'interdire les incitations financières (131).

Une biobanque privée, l'Institut Clinident Biopharma (ICB), a tenté de s'implanter en France en 2012. Cette filiale de l'institut Clinident localisé en Suisse, proposait à des particuliers de conserver les cellules souches dentaires pour traiter, dans le futur, certaines maladies. Le dossier va connaître de nombreux rebondissements.

Dans un premier temps, l'Afssaps autorisa les activités de cette société puis estimera postérieurement *« que les activités projetées étaient de nature à porter atteinte au principe de non patrimonialité des éléments et produits du corps humain en tant qu'elles prévoyaient la conclusion d'un contrat à titre onéreux entre le donneur et la société Institut Clinident Biopharma ayant pour objet la conservation à des fins autologues de ces produits »*. L'atteinte au principe de non-patrimonialité et la finalité thérapeutique non avérée du projet sont principalement remises en cause.

Dans un second temps, la société ICB a saisi le tribunal administratif de Clermont Ferrand afin de statuer sur la légalité des deux décisions administratives prises par l'Afssaps.

Enfin, le tribunal tranchera en défaveur de l'implantation de l'institut Clinident en France (132).

Dans ce cas, la création de banque de cellules souches dentaires n'enfreint pas directement le principe de non-patrimonialité car il n'y a ni commercialisation des cellules recueillies, ni rémunération du donneur volontaire. Néanmoins, même si le donneur n'était pas rémunéré, le service fourni représentait un coût de 2440 euros pour la « conservation simultanée de 1 à 3 pulpes dentaires pendant 20 ans ».

D'autre part, il ne s'agit plus de don ou d'abandon d'échantillons biologiques mais de recueil et de stockage de matériel biologique à visée thérapeutique, le potentiel de ces cellules pouvant un jour devenir réalité. Attention, le développement d'une nouvelle thérapie cellulaire n'est pas anodin et représente un processus complexe, long et

coûteux. Elle doit impérativement réunir des normes de qualité, de sécurité et d'efficacité inscrites dans une réglementation afin d'atteindre la norme « qualité clinique » permettant ainsi l'administration au patient.

Il convient de mentionner que certains patients, désespérés et vulnérables, sont tentés par le tourisme lié aux cellules souches dans l'espoir d'un traitement. Ils doivent être conseillés et avertis des conséquences de l'utilisation commerciale de ces cellules (133). En effet, des cliniques à l'étranger proposent des traitements à base de cellules souches issues de la pulpe dentaire. Non seulement elles ne fournissent pas les preuves scientifiques de la valeur de la thérapie cellulaire mais elles ne garantissent pas non plus les procédures légales de validation indispensables à la sécurité des patients, même dans le cas de cellules souches autologues (134)

Des réflexions émergent suite à ce débat ; l'activité des biobanques doit-elle évoluer dans un cadre public ou privé ? Doit-on l'aménager en laissant ouvertes les deux options ?

Sur le plan éthique, peut-on fonder un commerce sur une perspective thérapeutique encore incertaine ?

#### **4.5 Éthique**

Initié par le corpus hippocratique et le *primum non nocere* « avant tout ne pas nuire », la relation médicale est basée sur le fait de soigner en étant bienfaisant, donc bénéfique.

L'« éthique médicale » décrite lors du Code de Nuremberg en 1947 met fin à l'instrumentation de l'humain en rappelant la primauté de la personne et le respect de sa dignité. Les fondements de l'éthique médicale ont été définis selon :

- l'autonomie sur la base d'informations exhaustives et correctes
- la justice et la solidarité concernant l'accès équitable aux services de soins et de santé
- la bienfaisance et la non-malfaisance
- l'équité

En 1983, le Comité Consultatif National d'Éthique vit le jour.

Les avancées médicales récentes posent clairement la question de la médecine de demain : une médecine personnalisée au détriment d'une médecine pour tous ? Cette interrogation est au centre du projet social d'une médecine respectueuse de la santé publique. En effet, comment évaluer l'efficacité des nouvelles thérapies sans favoriser un petit nombre de citoyens ?

La bioéthique est considérée comme l'étude des problèmes moraux que posent les sciences de la vie. Les débats relatifs à la bioéthique et les règles qui s'en dégagent visent à expliciter les objectifs des scientifiques.

En France, le don de moelle osseuse, de cellules souches, d'organes ou de sang est un acte purement volontaire, désintéressé, anonyme et gratuit. L'existence même de banques privées de conservation autologue va à l'encontre de la philosophie de don. En introduisant une valeur commerciale, elle fait ainsi d'une démarche altruiste, une démarche purement individualiste.

Les principes d'égal accès aux soins et de non patrimonialité des parties du corps humain restent deux principes essentiels des lois de bioéthique française, garantissant la mutualisation des greffons à travers des dons anonymes et gratuits.

#### **4.5.1 Le consentement**

Le consentement éclairé doit dès l'initiation d'un projet de recherche, anticiper l'utilisation et la diffusion des données. Dans le cas de traitements d'informations rétrospectives, des démarches doivent être mises en place pour recontacter les participants et leur demander leur consentement (135).

La directive européenne de 2004 encadre le consentement, l'Article 13 dit :

- « L'obtention de tissus ou de cellules humains n'est autorisée que si toutes les exigences obligatoires en matière de consentement ou d'autorisation en vigueur dans l'État membre concerné sont satisfaites. »
- « Les États membres prennent, conformément à leur législation nationale, toutes les mesures nécessaires pour garantir que les donneurs, leurs proches ou les personnes qui fournissent l'autorisation pour le compte des donneurs reçoivent

toutes les informations appropriées visées à l'annexe. » (Directive 2004/23/CE du parlement européen de mars 2004)

#### **4.5.1.1 Le consentement individuel libre et éclairé**

En France, le consentement doit être libre et éclairé. Il est donné pour un programme précis et peut être refusé.

L'article L1211-2 du code de la santé publique français détaille le principe du consentement éclairé : « Le prélèvement d'éléments du corps humain et la collecte de ses produits ne peuvent être pratiqués sans le consentement préalable du donneur. Ce consentement est révocable à tout moment ».

La finalité du consentement est de veiller à la protection de l'intégrité du donneur, avant tout prélèvement d'échantillons du corps humain à des fins scientifiques ou thérapeutiques (136).

Quelle est la limite actuelle de l'information qui peut être fournie aux donneurs de cellules souches dentaires ? Peuvent-ils consentir à une information encore imprécise ?

A ce jour, la conservation de cellules souches dentaires à vocations thérapeutiques futures n'est pas satisfaisante.

En effet le potentiel et le comportement de ces cellules ainsi que les modalités de traitements cliniques ultérieurs ont besoin d'être mieux cernés.

Ainsi, il est nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de mettre au point des pratiques cliniques fondées sur la preuve. L'objectif est d'une part de les faire connaître aux chirurgiens dentistes mais aussi de fournir aux patients une information éclairée en leur faisant comprendre le sens et la portée de ces pratiques novatrices (137).

Comment transposer dans le cadre de biobanques l'exigence du consentement libre et éclairé sans être préjudiciable à la recherche ?

#### **4.5.1.2 Le consentement éclairé général**

Il se dessine actuellement une tendance visant à passer d'un modèle de consentement individuel libre et éclairé vers un modèle de consentement général afin de trouver un équilibre entre la protection du donneur et les exigences de la recherche (138).

Lors d'un consentement général, les personnes acceptent de fournir leurs échantillons biologiques ainsi que les renseignements personnels s'y raccordant afin de les stocker dans une biobanque aux travaux de recherches ultérieurs non déterminés.

La reconnaissance juridique du consentement général varie d'une administration à l'autre en fonction des lois et des politiques en vigueur.

Il est normal que le contrat social entre participants et chercheurs évolue en même temps que la recherche.

#### **4.5.1.3 Le consentement dynamique par l'informatique**

De nombreuses données sont aujourd'hui échangées via l'informatique, mettant en lumière le risque, toujours plus présent, d'une perte d'anonymat des données personnelles et confidentielles des patients.

Actuellement l'information est numérisée et partagée à l'échelle mondiale, tandis que les mécanismes attachés au recueil du consentement éclairé restent statiques, utilisant les supports papier et bénéficiant d'un cadre légal au sein des frontières nationales (139).

Le consentement dynamique permet la rencontre des exigences éthiques légales requises par le consentement, en fournissant des moyens pour communiquer, informer et engager les individus dans la recherche mais également dans la durée grâce à l'utilisation de l'informatique.

Au centre du principe du consentement dynamique, une interface de communication numérique relierait chercheurs et participants et les placeraient au sein de la prise de décision. Cette approche permettrait d'établir un dialogue entre les participants et les chercheurs. Ainsi les participants pourraient décider de l'accès à leurs informations anonymisées ou à leurs coordonnées (140).

#### **4.5.2 Confidentialité, intimité et protection des données**

La confidentialité concerne la protection du donneur et représente une source de défiance de la société envers les biobanques.

Une grande accumulation de données personnelles, parfois sensibles, peut circuler entre les équipes de recherche. Néanmoins, elles peuvent aussi intéresser d'autres structures, tels que les assurances, les employeurs ou la police, au détriment du patient.

En France, l'accès aux données est réglementé. Schématiquement, les chercheurs doivent suivre trois règles :

- Les demandes d'accès aux données sont adressées à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)
- L'accès aux données implique que les donneurs soient informés de leur utilisation pour un autre objet et de leur droit à s'y opposer (art 54 et 57 de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978). En outre, lorsque ces données permettent l'identification des personnes, elles doivent être codées avant leurs transmissions (art 55 loi n° 78-17)

Cependant, de grandes quantités de données, privées et collectives sont mises à la disposition de réseaux ou d'infrastructures internationales et doivent être protégées. La confidentialité prend une dimension collective.

Vraisemblablement, le rôle des Comités d'Éthique se consolide et des structures plus perfectionnées commencent à voir le jour afin de protéger les données et de favoriser la gouvernance des biobanques.

#### **4.5.3 Biobanques et médecine personnalisée**

Deux concepts s'opposent, celui du marché et du profit face à celui de la solidarité et de la santé.

Conserver ses propres cellules, à la perspective thérapeutique encore incertaine, apparaît comme une démarche égoïste, éloignée de la solidarité. Elle risque de conduire à une discrimination importante entre les citoyens capables de s'acquitter des frais des prestations et ceux qui ne le peuvent pas. En effet, le coût de la cryopréservation dans le temps, utilisée principalement par les biobanques privées,

peut se révéler élevé. Actuellement, la conservation de cellules souches dentaires dans des biobanques privées étrangères localisées par exemple en Suisse tourne autour de 2500 euros pour une vingtaine d'années.

Par ailleurs, le système de santé français se veut égalitaire. Si le développement du stockage de cellules autologues se développe, le système se retrouvera dans une impasse : rembourser à tous les citoyens une partie ou la totalité du coût de conservation ou bien se diriger vers une médecine à deux vitesses ?

# Conclusion

Les thérapies basées sur l'utilisation des MSCs en médecine régénérative, suscitent l'enthousiasme dans la communauté scientifique.

Malgré des résultats plus que positifs sur l'animal, il reste très difficile d'extrapoler ces études à nos patients. La difficulté en est accrue lorsqu'ils sont porteurs de polyopathologies, de polymédications ou ont des comportements addictifs modifiant l'environnement tissulaire (tabac, alcool). De plus, la transposition des protocoles, de l'animal à l'homme, se heurte à de nombreux obstacles comme par exemple le devenir et le comportement des cellules à long terme, le système de délivrance adéquat ou le choix de la source cellulaire optimale.

Les MSCs d'origine dentaire sont favorablement disponibles pendant la jeunesse d'un individu, lors d'avulsion de dents retenues ou de germes.

Dans l'objectif d'un usage autologue, elles peuvent être cryoconservées dans des banques de stockage prévues à cet effet. Actuellement, ces structures sont interdites en France.

La législation française doit-elle tenir sa position à l'encontre de leur développement sur le territoire?

La création de biobanques à visée autologue, de statut privé à but lucratif, introduit un nouveau paramètre d'injustice. Ces infrastructures favoriseraient les plus fortunés, capables de s'acquitter des frais de prestations du stockage, dans l'attente de perspectives thérapeutiques. Tandis que le développement de biobanques à statut public, alors ouvertes à tous, risqueraient de devenir une lourde charge pour la société et accentueraient l'inégalité entre les collectivités, tant nationales que locales.

Cependant, il nous appartient de rappeler que les biobanques se placent dans un réseau complexe de chercheurs dispersés de par le monde et possèdent un impact incontestable dans l'avancée de la recherche médicale et de la médecine personnalisée. De nos jours, les variations culturelles, législatives et institutionnelles existantes entre les pays entraînent la persistance d'un système fragmenté.

Ainsi, un ajustement de la loi française devient de plus en plus nécessaire, tenant compte des dimensions internationales et économiques.

Les scientifiques se penchent plutôt vers un usage allogénique des cellules souches dentaires, permettant le développement de thérapies disponibles à un nombre plus étendu de patients grâce au typage HLA. Les sources extra orales de MSCs, comme le tissu adipeux, semblent constituer une bonne alternative à de futures applications autologues.

Notons que comme toute nouvelle technologie, les questions surgissent plus vite que les réponses. D'autant plus que les enjeux outrepassent les cadres scientifiques, juridiques, éthiques et concernent également les domaines industriels et économiques.

Ces multiples interrogations sur le grand espoir créé conduisent à espérer une démarche scientifique mondiale pour valider ou infirmer la pertinence de l'usage des cellules souches dentaires. Espérons que la France, techniquement en pointe dans ce domaine, en soit un moteur déterminant.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;114:185-99.
2. Hemmat S, Lieberman DM, Most SP. An introduction to stem cell biology. *Facial Plast Surg FPS.* 2010;26(5):343-9.
3. Das S, Bonaguidi M, Muro K, Kessler JA. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus.* 2008;24(3-4):134-40.
4. Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(2):291-303.
5. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica.* 2001;86(10):1099-100.
6. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells Dayt Ohio.* 2008;26(1):146-50.
7. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25(1):100-6.
8. Chang Y-J, Hwang S-M, Tseng C-P, Cheng F-C, Huang S-H, Hsu L-F, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs.* 2010;192(2):93-105.
9. Kim J, Kang HM, Kim H, Kim MR, Kwon HC, Gye MC, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2007;9(4):581-94.

10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
11. Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*. 2008;10(4):320-30.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
13. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
14. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
15. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT-J. iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):469-80.
16. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-30.
17. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(1):11-21
18. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.
19. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An

approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):693-701.

20. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development.* 1966;16(3):381-90.

21. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.

22. Abdullah MF, Ponnuraj KT, Mokhtar KI. DPSCs and SHED in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Open Stem Cell J [Internet].* 2013 [cité 22 juin 2016];4(1). Disponible sur: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOSCJ-4-1>

23. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56(3):151-65.

24. S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000; 97(25):13625-30

25. M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003; 100(10):5807-12

26. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond Engl.* 2004;364(9429):149-55.

27. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2005;24(2) 324-32.

28. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006; 110-25.

29. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/Progenitor Cell-Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an In Vivo Model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-15.
30. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*. 2007;140:67-81.
31. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012;56(3):151-65.
32. Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*. 2013;34(8):1888-97.
33. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1439-58.
34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-30.
35. Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czechoslov*. 2014;158(3):373-80.
36. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):203-14.
37. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(5):F1626-1635.

38. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-52.
39. Si Y-L, Zhao Y-L, Hao H-J, Fu X-B, Han W-D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):93-103.
40. cirm\_2.0. Oral and Craniofacial Reconstruction Using Mesenchymal Stem Cells [Internet]. California's Stem Cell Agency. 2016 [cité 17 juin 2016]. Disponible sur: <https://www.cirm.ca.gov/our-progress/awards/oral-and-craniofacial-reconstruction-using-mesenchymal-stem-cells>
41. Cicconetti A, Sacchetti B, Bartoli A, Michienzi S, Corsi A, Funari A, et al. Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(5):618.e1-12.
42. Mahajan A. Periosteum: A Highly Underrated Tool in Dentistry. *Int J Dent* [Internet]. 2012 [cité 23 juin 2016];2012. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3179889/>
43. Mizuno H, Hata K-I, Kojima K, Bonassar LJ, Vacanti CA, Ueda M. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1227-335.
44. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse Mandible Contains Distinctive Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2011;90(3):317-24.
45. Park J-C, Kim JC, Kim Y-T, Choi S-H, Cho K-S, Im G-I, et al. Acquisition of human alveolar bone-derived stromal cells using minimally irrigated implant osteotomy: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol.* 2012;39(5):495-505.
46. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen Y-DC, Hitt DC, Cooper LF, et al. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.* 2004;10(3-4):371-80.

47. Liao H-T, Chen C-T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):288-95.
48. Yang M, Zhang H, Gangolli R. Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(3):150-61.
49. Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):707-15.
50. Sumita Y, Tsuchiya S, Asahina I, Kagami H, Honda MJ. The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(2):113-21.
51. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):1205-16.
52. Yildirim S. *Dental Pulp Stem Cells*. Springer Science & Business Media; 2012:1-89.
53. Al-Zer H, Apel C, Heiland M, Friedrich RE, Jung O, Kroeger N, et al. Enrichment and Schwann Cell Differentiation of Neural Crest-derived Dental Pulp Stem Cells. *Vivo Athens Greece*. 2015;29(3):319-26.
54. Takayoshi Yamaza, Soichiro Sonoda, Erika Tomoda, Yosuke Tanaka. Properties and Possibilities of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells. 2015 [cité 3 juillet 2016]; Disponible sur: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2213.1684>
55. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005;80(6):836-42.

56. Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Ma L, Hoshino Y, Nonaka K, et al. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. *J Dent Res*. 2013;92(7):609-15.
57. Alvarez R, Lee H-L, Hong C, Wang C-Y. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *Int J Oral Sci*. 2015;7(4):205-12.
58. Liu Y, Chen C, Liu S, Liu D, Xu X, Chen X, et al. Acetylsalicylic Acid Treatment Improves Differentiation and Immunomodulation of SHED. *J Dent Res*. 2015;94(1):209-18.
59. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):105-16.
60. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et al. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(7-8):1015-26.
61. Kim SS, Kwon D-W, Im I, Kim Y-D, Hwang D-S, Holliday LS, et al. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments. *Korean J Orthod*. 2012;42(6):307-17.
62. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):487-96.
63. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*. 2008;34(6):645-51.
64. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral*

Biol. 2011;56(7):709-21.

65. Chen X, Zhang T, Shi J, Xu P, Gu Z, Sandham A, et al. Notch1 Signaling Regulates the Proliferation and Self-Renewal of Human Dental Follicle Cells by Modulating the G1/S Phase Transition and Telomerase Activity. PLoS ONE [Internet]. 29 juill 2013 [cité 1 juillet 2016];8(7). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726724/>

66. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111(6):700-8.

67. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. World J Stem Cells. 2015;7(5):839-51.

68. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol. 2004;32(5):414-25.

69. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. STEM CELLS. 2015;33(3):627-38.

70. Gnanasegaran N, Govindasamy V, Abu Kasim NH. Differentiation of stem cells derived from carious teeth into dopaminergic-like cells. Int Endod J. 2015;33:44-45.

71. Carmen M.Nolla. The Development of the Permanent Teeth. Journal of dentistry for children. 1960;25:4-66.

72. Alsulaimani RS, Aylan SA, Aldahmash AM, Alnabaheen MS, Ashri NY. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. Saudi Med J. 2016;37(5):551-60.

73. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International

Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

74. Chen B, Sun H-H, Wang H-G, Kong H, Chen F-M, Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials*. 2012;33(20):5023-35.

75. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PloS One*. 2012;7(11):428-34

76. Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009;35(6):818-23.

77. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp JoVE*. 2012;(69):4372-79.

78. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*. juill 2013;353(1):65-78.

79. Viña-Almunia J, Borrás C, Gambini J, El Alamy M, Peñarrocha M, Viña J. Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(3):374-91.

80. Guzmán-Urbe D, Estrada KNA, Guillén A de JP, Pérez SM, Ibáñez RR. Development of A Three-Dimensional Tissue Construct from Dental Human Ectomesenchymal Stem Cells: In Vitro and In Vivo Study. *Open Dent J*. 2012;6:226-34.

81. Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(2):225-36.

82. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev.* 2011;7(1):161-71.
83. Virginia Tirino, Francesca Paino, Riccardo d'Aquino, Vincenzo Desiderio, Alfredo De Rosa, Gianpaolo Papaccio. Methods for the Identification, Characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. *STEM CELL REVIEWS* 2011;7(3):608-15.
84. Markoski MM. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. *Scientifica [Internet]*. 2016 [cité 19 juill 2016];2016. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917716/>
85. Suchanek J, Soukup T, Visek B, Ivancakova R, Kucerova L, Mokry J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czechoslov.* 2009;153(1):31-45.
86. Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod.* 2015;41(9):1492-99.
87. Pisciolaro RL, Duailibi MT, Novo NF, Juliano Y, Pallos D, Yelick PC, et al. Tooth Tissue Engineering: The Importance of Blood Products as a Supplement in Tissue Culture Medium for Human Pulp Dental Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(21-22):2639-48.
88. Chen Y-K, Huang AH-C, Chan AW-S, Shieh T-Y, Lin L-M. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2011;40(10):793-800.
89. Lee S-Y, Huang G-W, Shiung J-N, Huang Y-H, Jeng J-H, Kuo T-F, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(1):23-33.

90. Ye L, Chen L, Feng F, Cui J, Li K, Li Z, et al. Bone marrow-derived stromal cells are more beneficial cell sources for tooth regeneration compared with adipose-derived stromal cells. *Cell Biol Int*. 2015;39(10):1151-61.
91. Hung C-N, Mar K, Chang H-C, Chiang Y-L, Hu H-Y, Lai C-C, et al. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(29):6995-7005.
92. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis*. 2013;4(12):950-62.
93. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials*. 2010;31(13):3527-35.
94. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(6):945-53.
95. Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials*. 2012;33(7):2109-18.
96. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
97. Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*. 2012;8(2):215-25.
98. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):727-36.

99. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5(1):91-116.
100. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, et al. Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age. *PLOS ONE.* 2014;9(5):553-61.
101. Wu W, Zhou J, Xu C-T, Zhang J, Jin Y-J, Sun G-L. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5127-34.
102. Carlson ME, Conboy IM. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell.* 2007;6(3):371-82.
103. Inserm. Dossier d'information sur la Thérapie cellulaire [Internet]. Instituts thématiques : Inserm. [cité 19 juillet 2016]. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/therapie-cellulaire>
104. Olszewska-Słonina DM, Drewa TA. Cell culture, tissue engineering and regenerative medicine. Part I. *Wiad Lek Wars Pol* 1960. 2006;59(7-8):585-92.
105. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-16.
106. Karantalis V, Schulman IH, Balkan W, Hare JM. Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. *Circ Res.* 2015;116(1):12-25.
107. Mokry J, Soukup T, Micuda S, Karbanova J, Visek B, Brcakova E, et al. Telomere Attrition Occurs during Ex Vivo Expansion of Human Dental Pulp Stem Cells. *BioMed Res Int* *BioMed Res Int.* 2010:513-20.
108. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and

senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(10):4337-41.

109. M.Renaud, S. Farkasdi, C. Pons, I. Panayotov, P-Y. Collart-Dutilleul, H. Taillades, et al. A New Rat Model for Translational Research in Bone Regeneration. Tissue Eng Part C Methods. 2016;22(2):125-31.

110. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte J-A, Bourin P, van Lent PLEM, Ferreira R, et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. Arthritis Rheum. 2013;65(7):1786-94.

111. La révision des lois de bioéthique . FAQ - Actualités - Vie-publique.fr [Internet]. 2010 [cité 23 juil 2016]. Disponible sur: <http://www.vie-publique.fr/actualite/faq-citoyens/bioethique/>

112. Reppel L, Caunday O, Bultel S, Stoltz J-F, Huselstein C, Bensoussan D. Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française. Hématologie. 2012;18(3):175-81.

113. ANSM. Glossaire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. 2016 [cité 19 juil 2016]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Glossaire/\(filter\)/P#term\\_16637](http://ansm.sante.fr/Glossaire/(filter)/P#term_16637)

114. Le produit est-il un MTI, un MTI-PP ou une préparation? Comment le déterminer? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. ANSM. [cité 23 juil 2016]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Le-produit-est-il-un-MTI-un-MTI-PP-ou-une-preparation-Comment-le-determiner/\(offset\)/3](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Le-produit-est-il-un-MTI-un-MTI-PP-ou-une-preparation-Comment-le-determiner/(offset)/3)

115. A.Claeys, J-S.Vialatte. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques : Rapport sur la recherche sur les cellules souches [Internet]. Assemblée Nationale Sénat; 2010 [cité 23 juill 2016] p. 191. Report No.: 2718. Disponible sur: [http://www.assemblee-nationale.fr/13/rap-off/i2718.asp#P422\\_39762](http://www.assemblee-nationale.fr/13/rap-off/i2718.asp#P422_39762)

116. N. SPIELVOGEL, S. MOUSSAOUI. La nouvelle réglementation des Médicaments de Thérapie Innovante préparés ponctuellement (MTI PP). ANSM; 2013: 1-17.
117. BIOBANQUES, une infrastructure nationale dédiée à la recherche biomédicale [Internet]. biobanques.eu. [cité 24 juil 2016]. Disponible sur: <http://www.biobanques.eu/fr/nous-connaître/infrastructure>
118. Nussbeck SY, Rabone M, Benson EE, Droege G, Mackenzie-Dodds J, Lawlor RT. « Life in Data »—Outcome of a Multi-Disciplinary, Interactive Biobanking Conference Session on Sample Data. *Biopreservation Biobanking*. 2016;14(1):56-64.
119. Gibbons SMC. Regulating Biobanks: A Twelve-Point Typological Tool. *Med Law Rev*. 2009;17(3):313-46.
120. Collart-Dutilleul P-Y, Chaubron F, De Vos J, Cuisinier F. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World J Stem Cells*. 2015;7(7):1010-21.
121. A. de Robbio. BIOBANKS : patents or open science ? WP : Woodhead Publishing in biomedicine. 2013:1-54.
122. Gottweis H, Lauss G. Biobank governance: heterogeneous modes of ordering and democratization. *J Community Genet*. 2012;3(2):61-72.
123. Zika E, Paci D, Schulte In Den Bäumen T, Braun A, Rijkers-Defrasne S, Deschênes M, et al. Biobanks in Europe: Prospects for Harmonisation and Networking [Internet]. Publications Office of the European Union; 2010 [cité 27 juil 2016]. Disponible sur: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/15949>
124. J. Kaye, MC Gibbons. *Governing Biobank : Understanding the Interplay between Law and Practice*. Oxford (UK), Portland, OR (USA) : Hart Publishing. 2012:1-370.
125. Chen H, Pang T. A call for global governance of biobanks. *Bull World Health*

Organ. 2015;93(2):113-7.

126. OCDE. Lignes directrices de l'OCDE sur les biobanques et bases de données de recherche en génétique humaine. 2009:1-57.

127. O'Doherty KC, Burgess MM, Edwards K, Gallagher RP, Hawkins AK, Kaye J, et al. From consent to institutions: designing adaptive governance for genomic biobanks. *Soc Sci Med* 1982. 2011;73(3):367-74.

128. Herbert Gottweis. Biobanks for Europe. In European Commission; 2012:1-72.

129. van Ommen G-JB, Törnwall O, Bréchet C, Dagher G, Galli J, Hveem K, et al. BBMRI-ERIC as a resource for pharmaceutical and life science industries: the development of biobank-based Expert Centres. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(7):893-900.

130. Ethics, legal and privacy | BWB [Internet]. BWB. [cité 4 sept 2016]. Disponible sur:[http://www.biotheque-wallonie-bruxelles.be/ethics-legal-and-privacy.php?lang=fr\\_FR](http://www.biotheque-wallonie-bruxelles.be/ethics-legal-and-privacy.php?lang=fr_FR)

131. Sak J, Pawlikowski J, Goniewicz M, Witt M. Population biobanking in selected European countries and proposed model for a Polish national DNA bank. *J Appl Genet*. 2012;53(2):159-65.

132. Cour administrative d'appel de Lyon, 4 juillet 2013, n°12LY01188 et 12LY01194 (cellules souches - banque privée autologue - autorisation - rejet) [Internet]. APHP DAJ. [cité 28 juill 2016]. Disponible sur: <http://affairesjuridiques.aphp.fr/textes/cour-administrative-dappel-de-lyon-4-juillet-2013-n12ly01188-et-12ly01194-cellules-souches-banque-privee-autologue-autorisation-rejet/>

133. Einsiedel EF, Adamson H. Stem cell tourism and future stem cell tourists: policy and ethical implications. *Dev World Bioeth*. 2012;12(1):35-44.

134. Munsie M, Hyun I. A question of ethics: Selling autologous stem cell therapies flaunts professional standards. *Stem Cell Res*. 2014;13(3, Part B):647-53.

135. Simon CM, L'Heureux J, Murray JC, Winokur P, Weiner G, Newbury E, et al. Active choice but not too active: Public perspectives on biobank consent models. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2011;13(9):821-31.
136. Hallinan D, Friedewald M. Open consent, biobanking and data protection law: can open consent be 'informed' under the forthcoming data protection regulation? *Life Sci Soc Policy [Internet]*. 2015 [cité 4 sept 2016];11. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480798/>
137. Kabir R, Gupta M, Aggarwal A, Sharma D, Sarin A, Kola MZ. Imperative Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapies: A Systematic Review. *Niger J Surg Off Publ Niger Surg Res Soc*. 2014;20(1):1-8.
138. P. Kosseim. Discours: La mise en œuvre du consentement dans le cadre des biobanques - Le 21 janvier 2011 [Internet]. 2011 mai 16 [cité 1 août 2016]. Disponible sur: [https://www.priv.gc.ca/media/sp-d/2011/sp-d\\_20110121\\_pk\\_f.asp](https://www.priv.gc.ca/media/sp-d/2011/sp-d_20110121_pk_f.asp)
139. D'Abramo F. Biobank research, informed consent and society. Towards a new alliance? *J Epidemiol Community Health*. 2015;69(11):1125-58.
140. Boutin NT, Mathieu K, Hoffnagle AG, Allen NL, Castro VM, Morash M, et al. Implementation of Electronic Consent at a Biobank: An Opportunity for Precision Medicine Research. *J Pers Med [Internet]*. 2016 [cité 4 sept 2016];6(2). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932464/>