



**HAL**  
open science

# Impact de la suppression de la sclérostine dans la régénération osseuse crânio-faciale

Sophie Maillard

► **To cite this version:**

Sophie Maillard. Impact de la suppression de la sclérostine dans la régénération osseuse crânio-faciale. Biologie moléculaire. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5075 . tel-04307164

**HAL Id: tel-04307164**

**<https://theses.hal.science/tel-04307164>**

Submitted on 25 Nov 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

École doctorale **562-BioSPC**

Laboratoire URP  
2496 Pathologies, Imagerie et Biothérapie Orofaciales

# Impact de la suppression de la sclérostine dans la régénération osseuse crânio-faciale

*Par Sophie Maillard*

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire Moléculaire-  
Physiologie-Physiopathologie (BCMPP)

Dirigée par Professeur Catherine CHAUSSAIN

Présentée et soutenue publiquement le 19 mars 2021

Devant un jury composé de :

Mr. Emmanuel PAUTHE	PU	Université de Cergy- Pontoise	Rapporteur
Mme. Joëlle AMEDEE	Dr. recherche INSERM	Université de Bordeaux	Rapporteur
Mr. Thibault CORADIN	Dr. recherche CNRS	Université de la Sorbonne	Président du jury
Mr. Philippe BOUCHARD	PU-PH	Université de Paris	Examineur
Mme. Sylvie JEANNE	PU-PH	Université de Rennes 1	Examineur
Mme. Catherine CHAUSSAIN	PU-PH	Université de Paris	Directrice

## LISTE DES ÉLÉMENTS SOUS DROITS

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse  
faute d'en détenir les droits

### Illustrations, figures, images...

Légende de l'image	N° de l'image	Page(s) dans la thèse
Représentation clinique des patients atteints de sclérostéose et de la maladie de van Buchem.	Figure 1	21
Gène SOST.	Figure 2	23
Structure et caractéristiques de la sclérostine.	Figure 3	24
La sclérostine est exprimée par les ostéocytes dans les biopsies osseuses humaines.	Figure 4	25
Représentation de la localisation du gène SOST.	Figure 5	26
Compréhension actuelle de la régulation transcriptionnelle du gène SOST	Figure 6	27
Un aperçu simplifié de la voie de signalisation canonique WNT, et son inhibition par la sclérostine.	Figure 7	29
Différenciation des cellules souches mésenchymateuse vers la forme ostéocytaire.	Figure 8	30
Contrôle ostéocytaire de l'environnement osseux local.	Figure 9	30
Ostéocyte, sclérostine et maladie osseuse.	Figure 10	31
Inactivation ciblée du gène Sost pour générer des souris dépourvues de Sclérostine.	Figure 11	32
Augmentation de la DMO chez les souris WT et Sost KO.	Figure 12	33
Analyse de la minéralisation induite par les cellules de pulpe dentaire murine (mDPSC) Sost KO et de type sauvage (WT)	Figure 13	35

cultivées dans des conditions de minéralisation.		
Coupes longitudinales d'un cal osseux dans un trait de fracture.	Figure 14	36
Analyse micro-CT de la régénération osseuse au sein de défauts de taille critique chez les souris Sost KO et WT.	Figure 15	37
Chronologie montrant le développement d'anticorps thérapeutiques et leurs applications.	Figure 16	39
Liste exhaustive des médicaments à base d'anticorps approuvés depuis 2017 par la FDA américaine.	Tableau 2	40
La structure de l'anticorps monoclonal et ses composants.	Figure 17	42
Méthode de production des anticorps monoclonaux.	Figure 18	43
Ingénierie des anticorps.	Figure 19	45
Inhibition et activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par l'anticorps anti-sclérosine.	Figure 20	48
Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab.	Figure 21	49
Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab.	Figure 22	50
Protocole expérimental.	Figure 23	51
Effets de l'anticorps Scl-Ab sur les descendants des ostéoblastes LacZ $\beta$ sur la surface périostée du fémur.	Figure 24	52
Effet du traitement Scl-AbII du le remodelage osseux.	Figure 25	54
Réparation d'un fémur sous traitement Scl-Ab.	Figure 26	55
Histogramme montrant le niveau d'ostéointégration des implants sous traitement Scl-Ab.	Figure 27	56
Évaluation par micro-CT de la BVF dans l'os alvéolaire pendant le traitement avec Scl-Ab après l'induction	Figure 28	57



d'une parodontite expérimentale.		
Les données micro-CT de l'os pariétal chez les souris Brtl /+ OI en croissance traitées avec Scl-Ab.	Figure 29	58
Régénération osseuse dans les défauts péri-implantaires.	Figure 30	60
Dérivation des os du complexe crânio-facial.	Figure 31	64
Représentation schématique des différentes étapes de la mise en place du squelette crânio-facial lors de la morphogénèse.	Figure 32	65
Évolution des différentes générations de biomatériaux de comblement osseux, de leur nature, leur rôle et leur propriété.	Figure 33	68
Microscopie électronique à balayage (MEB) de matrice de collagène dense acellulaire incubé à 37 ° C en milieu ostéogénique.	Figure 36	72
Coloration des cellules Live / Dead® ensemencées dans un hydrogel collagénique dense dans des conditions ostéogéniques à différents temps.	Figure 37	73
Graphique représentant les propriétés des matériaux naturels et synthétiques, illustrant l'augmentation de la ténacité des matériaux naturels composites.	Figure 38	74
Perméabilité de différentes substances à travers des membranes de collagène (Biogide®) préparées à partir de derme porcin.	Figure 39	75
Dégradation du derme porcin avec et sans réticulation.	Figure 40	76
Tableau récapitulatif des temps de dégradation in vivo des différentes membranes collagéniques commercialisées.	Figure 41	77
Schéma représentant la localisation des cellules souches dentaires humains.	Figure 43	79

Tableau récapitulatif des principales propriétés des cellules souches d'origine dentaire.	Tableau 3	80
Morphologie cellulaire et unités formatrices de colonies de SHED et de DPSC.	Figure 44	81
Réparation osseuse crânio-faciale à J35 après comblement à l'aide d'un hydrogel collagénique dense.	Figure 45	82
Représentation d'un biomatériau hydride à base de collagène associé à des matériaux divers.	Figure 82	135

#### **Articles, chapitres, entretiens cliniques...**

Titre du document	N° (si numéroté)	Page(s) dans la thèse
Combining tissue engineering with sclerostin neutralization: a new strategy for craniofacial bone repair		142-162

*A ma famille et mon compagnon*

# Remerciements

*« Il faut toujours remercier l'arbre à karité sous lequel on a ramassé de bons fruits pendant la bonne saison »*

*Ahmadou Kourouma*

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse qui est aussi directrice du laboratoire, Madame le Professeur Catherine CHAUSSAIN. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire et avoir accepté d'être la directrice de mon projet de recherche. Je vous remercie également pour votre encadrement, votre énergie et pour tout ce que vous m'avez appris en science et à travers votre détermination à vouloir faire de la « belle » science. En témoignage de mon admiration et de ma reconnaissance

A mes rapporteurs, Monsieur le Professeur Emmanuel PAUTHE et Madame la Directrice de recherche Joëlle AMEDEE, je vous exprime ma profonde reconnaissance d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie sincèrement pour l'intérêt que vous porterez à ce manuscrit.

Au président du jury, Monsieur le Directeur de recherche Thibault CORADIN, je vous remercie d'avoir, si gentiment et spontanément, accepté de participer à la direction ce jury. Je vous remercie également pour tout l'intérêt que vous avez porté à mon projet jusqu'ici.

A mon évaluateur qui est aussi mon enseignant et responsable du département de parodontologie à l'hôpital Rothschild, Monsieur le Professeur BOUCHARD, je vous remercie vivement d'avoir accepté de prendre part à ce jury et vous exprime ma profonde reconnaissance pour

l'attention que vous avez portée à mes travaux de recherche depuis le début de ma thèse.

A mon évaluatrice, Madame la Professeure Sylvie JEANNE, qui était aussi mon enseignante et responsable du département de parodontologie au centre de soin dentaire de Rennes, je vous remercie infiniment d'avoir accepté de prendre part à ce jury.

***Un grand Merci à la Fondation des Gueules cassées qui a financé l'ensemble de mon Doctorat et m'a permis de consacrer un temps maximum à mon projet de recherche. Sans vous, ces travaux n'auraient pas été possibles.***

A tous les étudiants du laboratoire, ceux qui ont terminés et ceux qui sont encore là, je vous remercie pour votre soutien et votre amitié.

Je tiens à remercier en particulier,

Sandy, qui a été très présente lors de ma première année de thèse pour m'aider à réaliser mes génotypages et certaines analyses immunohistochimiques ;

Anne et Julie, qui m'ont encadré dans mes débuts en culture cellulaire ;

Jérémy, qui a toujours été présent pour apporter son expertise en imagerie et à l'animalerie ;

Brigitte et Coralie, qui ont été d'une grande aide dans la finalisation de mon projet lors du travail d'analyse en immunohistochimie ;

Caroline pour ses conseils et son expérience en tant que post-doc ;

Et bien sûr, Ludovic, qui a travaillé à mes côtés lors de la dernière ligne droite et qui a été d'une aide sacrée dans l'aboutissement du projet.

Merci pour votre aide et merci pour l'équipe !!!

Je souhaite finalement remercier toute ma famille et Nicolas, qui ont été d'un énorme soutien tout au long de cette aventure rythmée par mon travail de recherche et mon exercice clinique à l'hôpital.

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE DES CONNAISSANCES.....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1 : ROLE DE LA SCLEROSTINE DANS LE METABOLISME OSSEUX</b> <b>.....</b>	<b>20</b>
1. Deux maladies rares au service de la recherche.....	20
1.1. La sclérostéose.....	20
1.2. La maladie de Van Buchem (VBD) .....	21
1.3. Cause génétique.....	22
2. État actuel des connaissances sur la sclérostine.....	23
2.1. Sa Structure .....	23
2.2. Sa présence tissulaire.....	24
2.3. Le gène <i>SOST</i> et la régulation de sa transcription.....	26
2.4. Interaction de la sclérostine avec la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	28
2.5. Rôle majeur des ostéocytes sur l'homéostasie du métabolisme osseux ...	29
3. Intérêt de la délétion du gène <i>SOST</i> dans la modulation du métabolisme osseux.....	32
3.1. Le modèle animal knock-out <i>Sost</i> ( <i>Sost KO</i> ).....	32
3.1.1. Son développement .....	32
3.1.2. Ses caractéristiques .....	33
3.2. Influence de la délétion du gène <i>Sost</i> sur le métabolisme osseux.....	34
3.2.1. Chez les cellules ostéoprogénitrices en culture cellulaire.....	34
3.2.2. Dans la réparation osseuse.....	35
3.2.3. Dans la régénération osseuse .....	36
3.3. Conclusion.....	37
4. L'intérêt d'un anticorps monoclonal anti-sclérostine dans le métabolisme osseux.....	38
4.1. Les anticorps monoclonaux .....	38
4.1.1. Anticorps monoclonaux en plein essor dans le traitement de nombreuses maladies .....	38
4.1.2. Historique des anticorps monoclonaux.....	41
4.1.3. Structure de l'anticorps monoclonal .....	41

4.1.4.	Méthode de production d'anticorps monoclonaux .....	42
4.1.5.	Humanisation des anticorps monoclonaux.....	44
4.1.6.	Dose d'administration.....	45
4.2.	Les anticorps monoclonaux anti-sclérostine.....	46
4.2.1.	Le Romosozumab et le Setrusumab .....	46
4.2.2.	Son mécanisme d'action à l'échelle moléculaire .....	47
4.2.3.	Effets de l'anticorps anti-sclérostine en culture cellulaire .....	48
4.2.3.1.	Effet sur les cellules ostéoprogénitrices .....	48
4.2.3.2.	Effet sur les ostéoclastes.....	50
4.2.4.	Effet de l'anticorps anti-sclérostine chez le modèle murin .....	50
4.2.4.1.	Sur les ostéoblastes .....	50
4.2.4.2.	Lors du remodelage osseux .....	53
4.2.4.3.	Dans la réparation osseuse.....	54
4.2.4.4.	Dans l'ostéointégration des implants dentaires .....	55
4.2.4.5.	Dans un contexte de maladie parodontale.....	56
4.2.4.6.	Lors de la croissance crânienne .....	57
4.2.4.7.	Lors de la croissance mandibulaire.....	58
4.2.4.8.	Dans la régénération d'un défauts péri-implantaire.....	59
4.2.4.9.	Dans un modèle d'Ostéogénèse imparfaite dominant sévère .....	60
4.2.5.	Intérêt de l'anticorps Setrusumab chez le primate.....	60
4.2.6.	Essais cliniques sur l'Ostéogénèse imparfaite avec l'anticorps Setrusumab 61	
4.3.	Conclusion.....	61

## **CHAPITRE 2 : REGENERATION OSSEUSE CRANIO-FACIALE ..... 62**

1.	Défauts osseux de taille critique.....	62
1.1.	Définition .....	62
1.2.	Intérêt du défaut osseux pariétal dans l'étude de la régénération osseuse 63	
1.2.1.	Origine embryologique et mécanisme d'ossification singuliers.....	63
1.2.2.	Site anatomique favorable à l'expérimentation .....	65
2.	Approches thérapeutiques visant à traiter les défauts de taille critique....	66
2.1.	Substitut osseux d'origine naturelle .....	66
2.2.	Substituts osseux alloplastiques .....	67
3.	Ingénierie tissulaire de l'os.....	68
3.1.	Ses principes .....	68
3.2.	Notre échafaudage : un hydrogel compressé de collagène de type I.....	71
3.2.1.	La fabrication de l'hydrogel de collagène compressé .....	71
3.2.2.	Les Caractéristiques favorables des matrices collagéniques.....	74
3.3.	L'enrichissement de l'hydrogel avec des cellules issues du parenchyme pulpaire de dents murines (mDPSC) .....	77
3.3.1.	Cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ingénierie tissulaire.....	77
3.3.2.	Les cellules souche d'origine pulpaire (DPSC) .....	79
3.3.3.	Leur intérêt dans la régénération osseuse.....	81
3.4.	Conclusion.....	83



**OBJECTIFS DE LA THESE..... 84**

**DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX ET RESULTATS EXPERIMENTAUX . 86**

**RESUME : IMPACT DE LA SUPPRESSION DE LA SCLEROSTINE DANS LA REGENERATION OSSEUSE CRANIO-FACIALE..... 87**

**CHAPITRE 1 : DETERMINATION DE L'INTERET DE LA DELETION DU GENE *SOST* DANS REPARATION OSSEUSE CRANIO-FACIALE..... 90**

1.	Introduction et objectifs.....	91
2.	Matériels et Méthodes.....	92
2.1.	Design de l'étude.....	92
2.2.	Isolement et culture de cellules souches issues de la pulpe dentaire de souris WT ou <i>Sost</i> KO .....	94
2.3.	Préparation de l'hydrogel collagénique dense enrichi de cellules mDPSC .....	95
2.4.	Implantation chirurgicale .....	96
2.5.	Examen des échantillons par tomodensitométrie par micro-rayon X .....	97
2.6.	Histologie et histomorphométrie.....	98
2.7.	Acquisition et quantification d'images.....	99
2.8.	Microscopie de seconde harmonique .....	99
2.9.	Analyses statistiques.....	99
3.	Résultats.....	100
3.1.	La suppression de la sclérostine via la délétion du gène <i>Sost</i> permet une formation osseuse plus importante .....	100
3.1.1.	Analyse par micro-CT .....	100
3.1.2.	Analyse par coloration Von Kossa .....	104
3.2.	La qualité de l'os nouvellement formé est améliorée dans un environnement dépourvu de Sclérostine .....	106
3.3.	L'activité ostéoblastique est améliorée dans un environnement <i>Sost</i> KO .....	109

**CHAPITRE 2 : PROPOSITION D'UNE STRATEGIE THERAPEUTIQUE VISANT A AMELIORER LA REPARATION OSSEUSE A L'AIDE D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-SCLEROSTINE..... 113**

1.	Introduction et objectif .....	114
2.	Matériels et méthodes .....	115
2.1.	Design de l'étude.....	115
2.2.	De l'extraction des mDPSC à l'analyse des données .....	117
3.	Résultats.....	117
3.1.	La formation osseuse est améliorée par le traitement Scl-Ab.....	117
3.1.1.	Analyse par micro-CT .....	117
3.1.2.	Analyse par coloration Von Kossa .....	120
3.2.	La neutralisation de la sclérostine diminue la porosité de l'os nouvellement formé .....	121
3.3.	La neutralisation de la sclérostine améliore l'activité des ostéoblastes ..	123

**DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 127**

**CONCLUSION ..... 136**

**ARTICLE ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ..... 138**

**1. PUBLICATION EN SOUMISSION ..... 139**

**2. COMMUNICATIONS A DES CONGRES SCIENTIFIQUES ..... 139**

**3. BOURSE OBTENUE ..... 140**

**ARTICLE EN SOUMISSION ..... 141**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 163**

# Table des illustrations

Figure 1 : Représentation clinique des patients atteints de sclérostéose et de la maladie de van Buchem.....	21
Figure 2 : Gène SOST. Locus du gène SOST (A). .....	23
Figure 3: Structure et caractéristiques de la sclérostine.....	24
Figure 4 : La sclérostine est exprimée par les ostéocytes dans les biopsies osseuses humaines.....	25
Figure 5 : Représentation de la localisation du gène SOST. ....	26
Figure 6 : Compréhension actuelle de la régulation transcriptionnelle du gène SOST. ....	27
Figure 7 : Un aperçu simplifié de la voie de signalisation canonique WNT, et son inhibition par la sclérostine. ....	29
Figure 8 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuse vers la forme ostéocytaire.....	30
Figure 9 : Contrôle ostéocytaire de l'environnement osseux local.....	30
Figure 10 : Ostéocyte, sclérostine et maladie osseuse.....	31
Figure 11 : Inactivation ciblée du gène Sost pour générer des souris dépourvues de Sclérostine. ....	32
Figure 12 : Augmentation de la DMO chez les souris WT et Sost KO.....	33
Figure 13 : Analyse de la minéralisation induite par les cellules de pulpe dentaire murine (mDPSC) Sost KO et de type sauvage (WT) cultivées dans des conditions de minéralisation. ....	35
Figure 14 : Coupes longitudinales d'un cal osseux dans un trait de fracture. ....	36
Figure 15 : Analyse micro-CT de la régénération osseuse au sein de défauts de taille critique chez les souris Sost KO et WT.....	37
Figure 16 : Chronologie montrant le développement d'anticorps thérapeutiques et leurs applications. ....	39
Figure 17 : La structure de l'anticorps monoclonal et ses composants. ..	42
Figure 18 : Méthode de production des anticorps monoclonaux. ....	43
Figure 19 : Ingénierie des anticorps.....	45
Figure 20 : Inhibition et activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par l'anticorps anti-sclérosine.....	48
Figure 21 : Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab.....	49
Figure 22 : Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab.....	50
Figure 23 : Protocole expérimental. ....	51
Figure 24 : Effets de l'anticorps Scl-Ab sur les descendants des ostéoblastes LacZ $\beta$ sur la surface périostée du fémur. ....	52
Figure 25 : Effet du traitement Scl-AbII du le remodelage osseux.....	54
Figure 26 : Réparation d'un fémur sous traitement Scl-Ab. ....	55
Figure 27 : Histogramme montrant le niveau d'ostéointégration des implants sous traitement Scl-Ab. ....	56

Figure 28 : Évaluation par micro-CT de la BVF dans l'os alvéolaire pendant le traitement avec Scl-Ab après l'induction d'une parodontite expérimentale. ....	57
Figure 29 : Les données micro-CT de l'os pariétal chez les souris Brtl /+ OI en croissance traitées avec Scl-Ab. ....	58
Figure 30 : Régénération osseuse dans les défauts péri-implantaires. ...	60
Figure 31 Dérivation des os du complexe crânio-facial.....	64
Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes de la mise en place du squelette crânio-facial lors de la morphogénèse.....	65
Figure 33 : Évolution des différentes générations de biomatériaux de comblement osseux, de leur nature, leur rôle et leur propriété. ....	68
Figure 34 : Principaux piliers permettant l'ingénierie tissulaire de l'os....	69
Figure 35 : Schéma montrant les éléments superposés en couche pour former des hydrogels de collagène dense par compression plastique de gels de collagène hautement hydratés. ....	71
Figure 36 : Microscopie électronique à balayage (MEB) de matrice de collagène dense acellulaire incubé à 37 ° C en milieu ostéogénique.....	72
Figure 37 : Coloration des cellules Live / Dead® ensemencées dans un hydrogel collagénique dense dans des conditions ostéogéniques à différents temps. ....	73
Figure 38 : Graphique représentant les propriétés des matériaux naturels et synthétiques, illustrant l'augmentation de la ténacité des matériaux naturels composites. ....	74
Figure 39 : Perméabilité de différentes substances à travers des membranes de collagène (Biogide®) préparées à partir de derme porcin. ....	75
Figure 40 : Dégradation du derme porcin avec et sans réticulation.....	76
Figure 41 : Tableau récapitulatif des temps de dégradation in vivo des différentes membranes collagéniques commercialisées.....	77
Figure 42 : Schéma expliquant l'engagement et la maturation possible des cellules souches mésenchymateuses. ....	78
Figure 43 : Schéma représentant la localisation des cellules souches dentaires humains. ....	79
Figure 44 : Morphologie cellulaire et unités formatrices de colonies de SHED et de DPSC. ....	81
Figure 45 : Réparation osseuse crânio-faciale à J35 après comblement à l'aide d'un hydrogel collagénique dense.....	82
Figure 46: Schéma représentant la répartition des conditions expérimentales dans les deux lignées de souris, mutante Sost KO et WT. ....	93
Figure 47 : Schéma représentant le déroulement de l'expérimentation..	94
Figure 48 : Schéma représentant les étapes qui suivent l'extraction des cellules mDPSC chez les souriceaux âgés de 3 jours.....	95
Figure 49 : Schéma représentant les principales étapes de fabrication d'hydrogels collagéniques compressés enrichis de cellules mDPSC. ....	96
Figure 50 : Photographies représentant les étapes chirurgicales lors de l'implantation des hydrogels dans des défauts pariétaux.....	97

Figure 51 : Schéma représentant les activités enzymatiques explorés dans l'analyse de la fonctionnalité du tissu osseux régénéré. ....	98
Figure 52 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez l'animal WT à 1 et 2 mois. ....	100
Figure 53 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. ....	101
Figure 54 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez le mutant Sost KO à 1 et 2 mois. ....	102
Figure 55 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. ....	103
Figure 56 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. ....	103
Figure 57: Schéma représentant la réparation osseuse au sein des défauts pariétaux laissés vide chez le mutant Sost KO et la souris WT. ....	104
Figure 58 : Représentation des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT et Sost KO pour chaque condition. ....	105
Figure 59 : Images représentatives de la microscopie seconde harmonique (SHG) révélant l'organisation des fibres de collagène. ....	106
Figure 60 : Images radiographiques obtenues par micro-CT permettent d'apprécier la porosité osseuse nouvellement formée dans les défauts. ....	107
Figure 61 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT à 1 et 2 mois. ....	107
Figure 62 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT. ....	108
Figure 63 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT. ....	109
Figure 64 : Représentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) par les ostéoblastes au sein de l'os néoformé. ....	110
Figure 65 : Représentation de l'activité de la phosphatase acide ostéoclastique résistante au tartrate (TRAP) des ostéoclastes au sein de l'os néoformé. ....	112
Figure 66 : Schéma représentant la répartition des conditions expérimentales dans les deux groupes de souris WT, celui qui reçoit l'injection de Scl-Ab et celui qui reçoit un placebo. ....	116
Figure 67 : Schéma représentant le déroulement de l'expérimentation. ....	116
Figure 68 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein des défauts pariétaux laissés vide chez le mutant Sost KO et la souris WT. ....	117
Figure 69: Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez l'animal WT ayant reçu l'anticorps anti-sclérostine, à 1 et 2 mois. ....	118
Figure 70 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. ....	119

Figure 71 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. ....	120
Figure 72 : Représentation graphique des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT ayant reçu Sb-Ab ou un placebo pour chaque condition. ....	121
Figure 73 : Représentation graphique des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT ayant reçu Sb-Ab ou un placebo pour chaque condition. ....	121
Figure 74 : Images représentatives de la microscopie seconde harmonique (SHG) révélant l'organisation des fibres de collagène. ....	122
Figure 75 : Images radiographiques obtenues par micro-CT permettent d'apprécier la porosité osseuse nouvellement formée dans les défauts. ....	122
Figure 76 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT à 1 et 2 mois. ....	123
Figure 77 : Représentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) par les ostéoblastes au sein de l'os néoformé. ....	124
Figure 78 : Représentation de l'activité de la phosphatase acide ostéoclastique résistante au tartrate (TRAP) des ostéoclastes au sein de l'os néoformé.....	125
Figure 79 : Représentation schématique des principaux résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales. ....	129
Figure 80 : Représentation schématique de la stratégie thérapeutique à investiguer. ....	133
Figure 81 : Représentation 2D d'un défaut osseux de taille critique au sein d'une mandibule de rat. ....	134
Figure 82 : Représentation d'un biomatériau hydride à base de collagène associé à des matériaux divers.....	135

# Liste des principales abbréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
Ab (mAb)	Anticorps (monoclonal)
ALP	Phosphatase alcaline
BMP	Bone morphogenetic protein
BVF	Fraction de volume osseux
CP	Compression plastique
CSM (hCSM)	Cellule souche mésenchymateuse (humaine)
Dkk-1	Dickkopf-1
DMO	Densité minérale osseuse
EBM	Milieu basal d'Eagle
Fab	Fragment de la région variable
Fc	Fragment de la région constante
FGF	Fibroblast growth factor
FN	Fibronectine
GBR	Guided bone regeneration pour régénération osseuse guidée
HAT	Hypoxanthine aminoptérine thymidine
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
KD	Constante de dissociation
KO	Knock-out
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
MCP	Protéine chimioattractive de monocyte
MET	Microscopie électronique à transmission
OB	Ostéoblaste
OC	Ostéocyte
OCI	Ostéoclaste

OMF	Oro-maxillofacial
OP	Ostéoporose
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Parodontite expérimentale
PGE2	Prostaglandine 2
PNC	Protéine non collagénique
PHT	Parathormone
RANKL	Ligand du récepteur du facteur nucléaire $\kappa$ B
RDC	Régions déterminant la complémentarité
TD	Température de dénaturation
TL	Toxicité limitante
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
UFC	Unités formant une colonie
VBD	Maladie de van Buchem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WNT	Int/Wingless
WT	Wild-type
micro-CT	Micro-tomodensitométrie



# Introduction

---

*« Le chemin est long du projet à la chose »*

*Molière*

Les défauts osseux sont une préoccupation majeure en chirurgie crânio-faciale. Ils englobent des malformations du visage et du crâne qui résultent de troubles congénitaux rares, d'une chirurgie de résection tumorale ou d'un traumatisme. Les patients présentant de telles conditions crânio-faciales sont souvent confrontés à des handicaps fonctionnels, esthétiques et psychologiques. À ce jour, la greffe osseuse autologue est le « Gold standard » dans le traitement de défauts osseux de taille critique. Malheureusement, cette approche présente certains inconvénients tels qu'une limitation de la disponibilité du volume de tissu à greffer, la morbidité du site donneur ou la résorption du greffon osseux. Des allogreffes et des xélogreffes ont été proposées comme alternative afin de contourner les inconvénients de l'autogreffe mais ces deux stratégies ont montré des complications sur le plan immunitaire et infectieux. C'est pour cela que des stratégies d'ingénierie tissulaire ont été développées pour fournir des substituts qui associent une matrice ostéoconductrice, des facteurs de croissance et des cellules souches/progénitrices afin d'imiter le tissu osseux naturel.

Parmi les substituts osseux proposés, l'hydrogel de collagène dense semble avoir démontré tout son intérêt lors de la régénération osseuse. Dans la revue de la littérature, nous aborderons ses qualités et caractéristiques qui justifient les raisons pour lesquelles ce biomatériau est le substitut de choix dans les travaux de régénération osseuse conduits au sein de notre laboratoire.

Au cours de la dernière décennie, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont suscité un intérêt considérable auprès des cliniciens et des chercheurs pour leur potentiel de régénération tissulaire. Les CSM dérivées de la pulpe dentaire (DPSC) sont considérées comme l'une des sources de cellules souches les plus attrayantes dans la régénération de l'os crânio-facial en raison de leurs propriétés en tant que CSM mais surtout du fait de

leur accessibilité de prélèvement. Dans la seconde partie de notre revue de littérature, nous étayerons l'intérêt des DPSC au court de la réparation osseuse et expliquerons comment son association à un hydrogel de collagène dense est en mesure de potentialiser les processus de réparation osseux crânio-faciaux.

Les maladies caractérisées par une masse osseuse très élevée, comme la sclérostéose ou la maladie de Van Buchem, sont dues à la délétion ou mutation du gène *SOST*, qui code la sclérostine, une glycoprotéine impliquée dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Ces observations ont conduit à des investigations précliniques approfondies ainsi que le développement d'un anticorps neutralisant la sclérostine (Scl-Ab). Son évaluation dans plusieurs essais cliniques randomisés, qui ont été menés chez des femmes atteintes d'ostéoporose ou chez des patients atteints d'ostéogénèse imparfaite (OI), a montré que l'administration systémique de Scl-Ab augmentait significativement la densité de masse osseuse grâce à une double action favorisant la différenciation des ostéoblastes tout en inhibant la formation des ostéoclastes. Dans la première partie de la revue de littérature, nous ferons l'état de l'avancement de la recherche fondamentale et clinique dans l'utilisation de cet anticorps lors du traitement de maladies systémiques affectant le métabolisme osseux et la réparation osseuse.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de mettre en évidence l'intérêt de l'absence totale de la sclérostine par délétion du gène qui la code ou de sa neutralisation par le biais d'un anticorps monoclonal dans la réparation osseuse crânio-faciale. Les travaux permettant de répondre à ces objectifs et les résultats qui en découlent seront présentés dans la seconde partie du manuscrit avant d'être discutés et confrontés aux travaux antérieurs de la littérature. Les perspectives de ce travail seront proposées dans la partie finale de ce manuscrit.

# Première partie : revue des connaissances

---

*« Pour donner la vraie science du mouvement des oiseaux dans l'air, il est nécessaire d'établir d'abord la science des vents, laquelle explique les mouvements de l'eau et elle-même. Et cette science fera échelle pour venir à la connaissance des volatiles dans l'air et le vent. »*

*Léonard de Vinci*

# **Chapitre 1 : Rôle de la sclérostine dans le métabolisme osseux**

La sclérostine, le produit du gène *SOST*, est un régulateur négatif de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et de la formation osseuse. Elle a été identifiée au travers d'études cliniques observationnelles chez les patients souffrants de conditions osseuses sclérosantes telles que la sclérostéose et la maladie de Van Buchem. Des études cliniques montrent que la suppression ou la neutralisation de la sclérostine est une stratégie puissante pour favoriser la formation d'os.

Dans ce chapitre, nous allons, d'abord, introduire la sclérostine au travers de maladies rares qui ont permis sa découverte. Ensuite, nous allons présenter en détail cette protéine, le gène qui la code, son mode d'action et l'implication clinique que peut avoir sa suppression dans le métabolisme osseux. Et finalement, nous allons définir le potentiel que peut présenter sa neutralisation par le biais d'un anticorps monoclonal anti-sclérostine dans la régulation du métabolisme osseux.

## **1. Deux maladies rares au service de la recherche**

### **1.1. La sclérostéose**

La sclérostéose (MIM 269500) est une dysplasie squelettique autosomique récessive caractérisée par une prolifération squelettique progressive (Figure 1). Elle a été décrite pour la première fois en 1958 par Truswell comme « ostéopétrose avec syndactylie » [1]. La sclérostéose est une maladie rare et survient d'abord dans la population afrikaner en Afrique du Sud, descendants de colons néerlandais venus dans la région sud-africaine au 17<sup>e</sup> siècle.

Les patients atteints de sclérostéose présentent une prolifération des os du crâne, de la mandibule, des clavicules, des côtes, du bassin et des os longs. La majorité des individus atteints présentent une syndactylie allant de la petite sangle des tissus mous aux fusions osseuses. Une grande proportion de patients décède au début de l'âge adulte principalement en raison de complications liées à une augmentation de la pression intracrânienne ou à la suite d'une craniotomie [2].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 1 : Représentation clinique des patients atteints de sclérostéose et de la maladie de van Buchem. Patiente atteinte de sclérostéose montrant une syndactylie et une distorsion faciale (A). Vue latérale du crâne d'un patient atteint de sclérostéose montrant un épaissement pariétal étendu (B) et une radiographie antéro-postérieure des mains avec une hyperostose corticale marquée (C). Photos du crâne d'un patient atteint de sclérostéose (D) et d'un crâne normal (E). D'après Sebastian et al., 2018 [2].*

## **1.2. La maladie de Van Buchem (VBD)**

La maladie de Van Buchem (VBD) ou hyperostose corticalis generalisata (MIM 239100) est une dysplasie osseuse autosomique récessive rare qui a été décrite pour la première fois par Van Buchem et al. en 1955. La plupart des patients atteints de VBD viennent d'un petit village de pêcheurs des Pays-Bas. Les manifestations squelettiques de la VBD sont similaires à celles de la sclérostéose, notamment un épaissement accru de l'os de la mâchoire, du crâne, des côtes et des os longs. La prolifération osseuse dans la VBD entraîne une densité minérale osseuse (DMO) très élevée qui conduit à un squelette qui est environ 3 à 4 fois plus lourd qu'un squelette normal.

Contrairement à la sclérostéose, les patients atteints de VBD ne présentent ni syndactylie ni dysplasie des ongles et ont une stature normale [3].

### **1.3. Cause génétique**

En raison des similitudes cliniques et radiographiques entre la sclérostéose et la VBD, en 1984, Beighton et al. a suggéré que ces conditions sont causées par des mutations dans le même gène [3]. Une étude de liaison à l'échelle du génome menée par Van Hul et al. en 1998 sur 11 patients présentant la VBD aux Pays-Bas a suggéré que la VBD était liée au chromosome 17q12-q21 englobant plusieurs gènes [4]. Peu de temps après, une analyse de liaison effectuée par Balemans et al. dans deux familles consanguines sur des patients présentant la sclérostéose a également entraîné l'attribution du gène de la sclérostéose au chromosome 17q12-q21 [5] (Figure 2). Cela a soutenu l'hypothèse que ces deux troubles sont dus à des mutations dans le même gène. Grâce à la cartographie de l'homozygotie et au clonage positionnel dans les familles affectées par la sclérostéose, deux études indépendantes ont identifié un nouveau gène, appelé *SOST*, qui est muté chez les patients atteints de sclérostéose. Cependant, ces études n'ont détecté aucune mutation dans la région codante de *SOST* chez les patients VBD. Par la suite, plusieurs patients présentant la VBD ont été examinés pour des variations dans le locus du gène *SOST*, il a ainsi été déterminé qu'une délétion de 52 kb s'est produite dans la région intergénique *SOST-MEOX1* le 17q12-q21.

Les patients atteints de sclérostéose présentent des niveaux indétectables de sclérostine. Fait intéressant, les porteurs hétérozygotes de la maladie étaient exempts de tout symptôme et présentaient des niveaux détectables de sclérostine. Cependant, leurs niveaux de sclérostine étaient inférieurs d'environ 60% aux valeurs mesurées chez des témoins sains et leur DMO était supérieure à la normale.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 2 : Gène SOST. Locus du gène SOST (A). Mutations SOST associées à la sclérostéose (B) et à la maladie de Van Buchem (C). D'après Balemans et al., 1999 [5].*

## **2.État actuel des connaissances sur la sclérostine**

La sclérostine est une glycoprotéine codée par le gène *SOST*, exprimée principalement par les ostéocytes et impliquée dans le remodelage osseux en jouant un rôle de régulateur négatif.

### **2.1. Sa Structure**

La sclérostine compte 190 acides aminés de la famille DAN qui est hautement conservée parmi les espèces de vertébrés. Les principales caractéristiques de la structure de la sclérostine comprennent les bras N et C terminaux, qui sont désordonnés à l'état de solution libre, et trois boucles qui sont formées autour du motif de nœud de cystéine (Figure 3). Les soi-disant boucles 1 et 3 ont le nœud cystéine à leur base et leurs pointes sont maintenues sous contrainte par une liaison disulfure supplémentaire pour donner un noyau structuré à la protéine. La boucle 2, qui existe du côté opposé du nœud de cystéine, est très mobile en solution. Elle a été reconnue comme une région fonctionnellement critique de la protéine qui se lie à LRP5/6, des corécepteurs présents dans la macrostructure



transmembranaire de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine [6]. Sa structure est similaire aux antagonistes de la protéine morphogénétique osseuse (BMP).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 3: Structure et caractéristiques de la sclérostine. Elle est représentée avec ses trois boucles émanant du nœud central de cystéine. D'après Holdsworth et al., 2012 [6].*

## **2.2. Sa présence tissulaire**

La sclérostine est souvent considérée comme une protéine spécifique des ostéocytes, cependant l'expression du gène *SOST* a été rapportée dans de nombreux autres types de cellules, y compris les chondrocytes hypertrophiques et les cémentocytes. On la retrouve dans plusieurs tissus, notamment les os [7], l'organe dentaire en formation (odontoblastes), le cartilage, les reins, le foie, le cœur, les poumons, le pancréas et les muscles squelettiques (Tableau 2) [8]. Il est cependant intéressant de noter que l'expression de *SOST* / sclérostine est modifiée dans certaines conditions pathogènes, y compris l'arthrose et la maladie des articulations rhumatismales.

Tissu	
Aorte	Glandes surrénales
Artères	Muscles
Cartilages	Os
Coeur	Ovaires
Diaphragme	Pancréas
Epididyme	Poumons
Foie	Reins
Ganglions lymphatiques	Yeux

Faible présence
  Forte présence

*Tableau 1 : Distribution tissulaire de l'expression du gène SOST. Ce tableau révèle une expression possible dans l'aorte, les artères, l'os, la moelle osseuse, le cartilage et les reins, adapté d'après Sebastian et al., 2017 et Weivoda et al., 2017 [8] [9].*

Malgré le fait que la sclérostine ait été détecté dans plusieurs tissus non osseux, la dernière décennie de recherche s'est principalement concentrée sur l'expression du gène *SOST* dans le tissu minéralisé. Dans l'os, la sclérostine est principalement sécrétée par les ostéocytes (Figure 4) [10].

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*Figure 4 : La sclérostine est exprimée par les ostéocytes dans les biopsies osseuses humaines. La coloration avec l'anticorps anti-sclérostine (Scl-Ab) a montré l'expression de la sclérostine dans les ostéocytes de l'os trabéculaire (A) et cortical (B). Les canalicules et/ou les lacunes des ostéocytes étaient positives pour la sclérostine (C). La coloration à la sclérostine d'une biopsie osseuse d'un orteil d'un garçon d'un an a montré une expression clairement limitée de la sclérostine aux ostéocytes (D). Le grossissement est de (A et B) 40, (C) 400 (D) 100. D'après van Bezooijen et al., 2004 [10].*

## 2.3. Le gène *SOST* et la régulation de sa transcription

Le gène *SOST* est localisé sur le chromosome 17 (Figure 5). Les mutations de perte de fonction dans ce gène sont associées à un trouble autosomique récessif, la sclérostéose, qui provoque une prolifération osseuse progressive. Une délétion en aval de ce gène, qui provoque une expression réduite de la sclérostine, est associée à une forme plus bénigne de la maladie appelée maladie de van Buchem [11].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

Figure 5 : Représentation de la localisation du gène *SOST*. D'après GeneCards, 2020 [11].

Beaucoup de facteurs régulent l'expression du gène *SOST* via son promoteur proximal ou l'amplificateur distal ECR5 (Figure 6) [8] :

Parmi ses régulateurs négatifs, nous trouvons d'abord l'hormone parathyroïdienne (PTH), un régulateur négatif majeur du gène *SOST* dans l'os dont l'action est médiée via l'ECR5 du gène. En effet, l'administration intermittente de PTH augmente la masse osseuse en stimulant la formation osseuse qui est médiée, au moins en partie, par la régulation négative du gène *SOST*. La charge mécanique est également un régulateur clé dans la transcription du gène *SOST*. En effet, les ostéocytes sont des cellules mécano-sensibles qui peuvent être activés sous l'effet de la stimulation mécanique de l'os pour entraîner une réduction spectaculaire de l'expression du gène *SOST*. A l'opposé, une décharge mécanique entraîne une augmentation de l'activation des ostéocytes et provoque l'augmentation de l'expression du gène *SOST* et ainsi une réduction de la masse osseuse. Finalement, notons aussi que la prostaglandine E2 (PGE2) régule à la baisse l'expression du gène *SOST* dans les cellules.

Parmi les régulateurs positifs de la sclérostine, nous trouvons d'abord les stéroïdes, y compris la vitamine D (VitD), les rétinoïdes, les glucocorticoïdes et les stéroïdes sexuels. En plus des hormones et des facteurs de croissance, les cytokines jouent également un rôle majeur dans la régulation du gène *SOST*. En effet, l'IL-1 $\beta$  et une combinaison de traitement par IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  amélioreraient l'expression du gène *SOST* dans les ostéocytes. L'hypoxie est aussi un autre régulateur majeur de l'expression du gène *SOST*. Elle augmenterait l'expression des antagonistes des BMP, soit la sclérostine. Les BMP sont des facteurs de croissance qui appartiennent aux protéines de la superfamille TGF- $\beta$ . Cinq d'entre eux sont connus pour induire la formation osseuse : BMP 2, 4, 5, 6 et 7.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 6 : Compréhension actuelle de la régulation transcriptionnelle du gène SOST. D'après Sebastian et al. 2017 [8].*

## **2.4. Interaction de la sclérostine avec la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine contrôle le développement squelettique ainsi que l'homéostasie osseuse. Activée, cette voie favorise la différenciation des MSC en ostéoblastes et inhibe leur différenciation en d'autres lignées telles que les chondrocytes et les adipocytes. Elle contrôle également la maturation des ostéoclastes en régulant les niveaux de RANKL dans les ostéoblastes. Ainsi, l'activation de cette voie est essentielle pour un développement et un entretien osseux appropriés.

Mécanismes d'activation de cette voie (Figure 7, à gauche) : les ligands extracellulaires WNT se lient à un récepteur de surface cellulaire de la famille Frizzled (FZD) et aux corécepteurs de surface cellulaire LRP5/6 [7] pour former un complexe ternaire. Ceci conduit à la translocation et la phosphorylation de ce complexe. Puis, la  $\beta$ -caténine non phosphorylée s'accumule dans le cytoplasme et se déplace vers le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription TCF/LEF pour initier la transcription des gènes cibles WNT.

Mécanismes d'inhibition de cette voie (Figure 7, à droite) : La sclérostine circulante se lie aux corécepteurs de surface cellulaire LRP4 et LRP5/6, empêchant l'interaction entre les ligands WNT avec ces corécepteurs. Cela empêche la formation du complexe ternaire LRP5/6 - WNT - FZD et inhibe donc la signalisation WNT canonique. La  $\beta$ -caténine cytosolique est ainsi phosphorylée et dégradée dans le protéasome. Les facteurs de transcription TCF/LEF dans le noyau sont associés à Groucho et la transcription du gène cible WNT est réprimée [12].

La sclérostine en circulation se lie aux corécepteurs LRP5/6. Cela conduit à la phosphorylation et à la dégradation ultérieure de la  $\beta$ -caténine entraînant l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 7 : Un aperçu simplifié de la voie de signalisation canonique WNT, et son inhibition par la sclérostine. D'après Holdsworth et al., 2019 [12].*

## **2.5. Rôle majeur des ostéocytes sur l'homéostasie du métabolisme osseux**

Les ostéocytes sont des dérivés de progéniteurs ostéoblastiques (Figure 8) qui sont emmurés au cours du processus de dépôt matriciel dans des petits espaces appelés lacunes. Ils constituent plus de 90% des cellules osseuses, contre 4 à 6% pour les ostéoblastes et 1 à 2% pour les ostéoclastes, ce qui en fait de loin la cellule la plus abondante de la matrice osseuse [13, 14].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 8 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuse vers la forme ostéocytaire. D'après Compton et al., 2014 [15].*

Les ostéocytes orchestrent la résorption osseuse et le dépôt osseux en contrôlant l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes (Figure 9). Ils libèrent le ligand activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa-b (RANKL) pour induire la différenciation des ostéoclastes mais aussi l'ostéoprotégérine (OPG) pour réguler négativement l'ostéoclastogénèse. Ils libèrent également le facteur de croissance des fibroblastes-23 (FGF-23), des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et la sclérostine pour réguler négativement l'activité des ostéoblastes [16].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 9 : Contrôle ostéocytaire de l'environnement osseux local. D'après Compton et al., 2014 [15].*

Ainsi, les ostéocytes semblent jouer un rôle majeur dans le métabolisme osseux à travers l'expression du gène *SOST*. Leurs produits de sécrétion, en particulier la sclérostine, est impliqués dans une variété de maladies osseuses connues (Figure 10). En effet, l'ostéoporose, la cicatrisation des fractures, l'intégration osseuse implantaire, la maladie osseuse métastatique et la maladie osseuse génétique impliquent et affectent chacune la biologie des ostéocytes. C'est pourquoi l'investigation sur la suppression du gène *SOST* a été un sujet de grand intérêt dans le traitement des troubles osseux.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 10 : Ostéocyte, sclérostine et maladie osseuse. De nombreuses conditions orthopédiques agissent sur l'ostéocyte pour augmenter l'expression de la sclérostine (rouge) ou diminuer son expression (vert) et, par la suite, réguler à la baisse ou à la hausse la formation osseuse. PTH = hormone parathyroïdienne. D'après Compton et al., 2014 [15].*



### **3. Intérêt de la délétion du gène *SOST* dans la modulation du métabolisme osseux**

Depuis la première description de la sclérostéose, de nombreuses études cliniques ont pu fournir quelques notions permettant d'identifier le rôle de la sclérostine dans le développement du squelette et le métabolisme osseux. Cependant, ces études observationnelles présentent des limites et à cet égard, de nombreuses études ont ainsi utilisé des modèles animaux permettant d'identifier précisément le rôle de la sclérostine.

#### **3.1. Le modèle animal knock-out *Sost* (*Sost* KO)**

##### **3.1.1. Son développement**

L'équipe de recherche de Li et al. a utilisé une approche de ciblage génique pour générer des souris knock-out (KO) *Sost* (*Sost* KO) et a obtenu un phénotype de masse osseuse élevée, similaire à celui trouvé dans la sclérostéose [17].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 11 : Inactivation ciblée du gène *Sost* pour générer des souris dépourvues de Sclérostine. A gauche : La structure génomique du gène *Sost* est indiquée en haut avec des exons (boîtes noires), un codon d'initiation ATG, un codon d'arrêt TAG, des sites d'enzyme de restriction *EcoRV* et une sonde externe utilisée pour l'analyse par*

transfert de Southern blot. Les rectangles ombrés en gris sont les 5 régions à bras court et 3 à bras long incluses dans le vecteur de ciblage. La structure attendue de l'allèle *Sost* ciblé est indiquée en bas. A droite : L'image d'un Northern blot d'ARN total extrait du fémur de souris *Sost* KO (pistes 1, 2 et 3) et de souris de type sauvage (WT) (pistes 4, 5 et 6) sondées avec la souris *Sost* KO. D'après Li et al., 2008 [17].

### 3.1.2. Ses caractéristiques

Physiquement, les souris *Sost* KO adultes (âgées de 4,5 à 6,5 mois) ne peuvent pas être distinguées de leurs compagnons de litière de type sauvage (WT). En effet, contrairement aux caractéristiques cliniques des patients atteints de sclérostéose, où une incidence élevée de syndactylie et de distorsion/paralysie faciale a été documentée, ces souris ne présentent aucun signe de distorsion/paralysie. Les souris *Sost* KO présentent une augmentation de la DMO dans tout le squelette, une augmentation du volume osseux dans les vertèbres, les os longs et la calvaria. Par contre, les animaux hétérozygotes ne peuvent pas être distingués des témoins WT [18].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

Figure 12 : Augmentation de la DMO chez les souris WT et *Sost* KO. A gauche : Agrandissement radiographiques montrant les crânes du WT et KO *Sost*. Au centre : BMD des vertèbres lombaires chez des souris WT et *Sost* KO, mâles et femelles, âgées de 5 à 6,5 mois. A droite : BMD de la jambe entière. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SE, n 11-17 par groupe. \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au WT de sexe correspondant. D'après Li et al., 2008 [18].

L'analyse par micro-tomodensitométrie (micro-CT) de la région métaphysaire du fémur distal montre une nette augmentation de l'os trabéculaire pour les souris *Sost* KO par rapport aux souris témoins. Le micro-CT montre également que *Sost* KO a une augmentation de l'épaisseur corticale et une diminution de la surface de la cavité médullaire par rapport

aux témoins WT. Le périmètre périosté et la zone corticale sont également augmentés chez les souris *Sost* KO par rapport aux témoins WT. Les souris *Sost* KO ont aussi une surface ostéoblastique plus élevée que les témoins WT de sexe correspondant. Cependant, il n'y a pas de différence significative du nombre d'ostéoclastes entre les souris *Sost* KO et les témoins WT. Les souris *Sost* KO présentent également une augmentation significative du taux de formation osseuse et ont une surface de minéralisation significativement plus importante que les témoins WT. Le taux d'ostéocalcine sérique, un marqueur de formation osseuse, est significativement augmenté chez les souris *Sost* KO alors qu'il n'y a pas de différence significative de la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP), un marqueur ostéoclastique, entre les contrôles *Sost* KO et WT.

### **3.2. Influence de la délétion du gène *Sost* sur le métabolisme osseux**

#### **3.2.1. Chez les cellules ostéoprogénitrices en culture cellulaire**

La culture en milieu minéralisant de cellules dérivant de la pulpe dentaire, les mDPSC, a démontré une augmentation significative de la minéralisation et de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) chez les cellules provenant de souris *Sost* KO par rapport à celles des souris WT [19].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 13 : Analyse de la minéralisation induite par les cellules de pulpe dentaire murine (mDPSC) Sost KO et de type sauvage (WT) cultivées dans des conditions de minéralisation. En haut : Coloration au rouge d'alizarine et réaction de l'ALP montrant une minéralisation et une production d'ALP améliorées chez les cellules Sost KO mDPSC par rapport au WT mDPSC. En bas : Quantification au rouge alizarine. D'après Collignon et al., 2017 [19].*

### **3.2.2. Dans la réparation osseuse**

L'influence de la délétion du gène *Sost* sur la réparation osseuse a été mise en évidence dans une étude conduite par l'équipe de Li et al. [20] après fracture d'un fémur sur des souris WT et *Sost* KO. Les résultats histologiques à 14 jours révèlent que les cals formés au sein du trait de fracture des souris *Sost* KO présentent plus de tissu osseux à 97% ( $p < 0,05$ ) et moins de tissu cartilagineux à 40% ( $p < 0,05$ ) que chez la souris WT. Les souris *Sost* KO montre également une tendance à avoir une zone de tissu fibreux plus faible.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 14 : Coupes longitudinales d'un cal osseux dans un trait de fracture. Colorées au Goldner-trichrome (A) et au bleu de toluidine (B). À 14 jours, la taille globale des cals de fracture dans les deux groupes est la même, mais les cals des Sost KO contiennent plus d'os (flèche en A ; D) et moins de tissu cartilagineux (flèche en B ; E) que les souris WT. À 28 jours, ces différences de composition osseuse et cartilagineuse ont disparu. Il n'y a aucune différence génotypique dans la surface totale des cals (C) ou dans la zone des tissus fibreux (F). Les valeurs sont exprimées par leurs moyennes  $\pm$  SEM, N = 6-7 WT, N = 9-10 KO ; \*  $p < 0,05$  par rapport à WT. D'après Li et al., 2011 [20].*

D'autres études mettent en évidence des résultats similaires [21, 22].

### **3.2.3. Dans la régénération osseuse**

L'influence de la délétion du gène *Sost* sur la réparation osseuse a été mise en évidence dans une étude conduite par l'équipe de Kang et al. [23] après avoir réalisé des défauts de calvaria chez des souris mâles adultes de type sauvage (WT) et *Sost* KO. La zone osseuse nouvellement formée a été évaluée en comparant le volume osseux néoformé à 4 et 8 semaines.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 15 : Analyse micro-CT de la régénération osseuse au sein de défauts de taille critique chez les souris Sost KO et WT. En haut : Représentation 2D de défauts crânio-faciaux obtenues avec le micro-CT à 4 et 8 semaines post-opératoire. En bas : Représentations graphiques du pourcentage d'os régénéré au fil du temps (C) et du volume osseux néoformé dans chaque groupe. Chez les souris Sost KO, il y a près de 40% de réparation osseuse sur le défaut à 8 semaines, tandis que les souris WT ne voient pas une quantité significative de nouvel os à se former. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Les différences statistiquement significatives \*  $p < 0,05$  par rapport au groupe WT. D'après Kang et al., 2018 [23].*

### **3.3. Conclusion**

La délétion du gène *SOST* se traduit par des phénotypes de masse osseuse élevée. Les nouveaux agents anaboliques capables d'activer la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine en inhibant la sclérostine ouvrent donc des perspectives encourageantes dans le traitement de défauts osseux.

## **4.L'intérêt d'un anticorps monoclonal anti-sclérostine dans le métabolisme osseux**

Les investigations sur l'intérêt de la suppression du gène *Sost* ont été un sujet de grand intérêt dans le traitement des troubles osseux. Aujourd'hui, la neutralisation de la sclérostine par un anticorps monoclonal semble pouvoir proposer aux malades une solution prometteuse.

### **4.1. Les anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux (mAbs) constituent le groupe dominant de protéines recombinantes utilisées en thérapie humaine.

#### **4.1.1. Anticorps monoclonaux en plein essor dans le traitement de nombreuses maladies**

Cela fait plus de trois décennies que le premier anticorps monoclonal a été approuvé par la United States Food et Drug Administration (US FDA) en 1986, et pendant cette période, l'ingénierie des anticorps a considérablement évolué. Les médicaments anticorps actuels ont de moins en moins d'effets indésirables en raison de leur haute spécificité. En conséquence, les anticorps sont devenus la classe prédominante de nouveaux médicaments développés ces dernières années. La preuve en est qu'au cours des cinq dernières années, les anticorps sont devenus les médicaments les plus vendus sur le marché pharmaceutique. Le marché mondial des anticorps monoclonaux thérapeutiques a été évalué à environ 115,2 milliards USD en 2018 et devrait générer un chiffre d'affaires de 300 milliards de dollars d'ici 2025, sans tenir compte du développement d'anticorps pour le traitement COVID-19. Ainsi, le marché des médicaments à base d'anticorps thérapeutiques connaît une croissance explosive dans le cadre du traitement de diverses maladies humaines, comprenant de

nombreux cancers [24-26], maladies auto-immunes, métaboliques et maladies infectieuses (Figure 16).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 16 : Chronologie montrant le développement d'anticorps thérapeutiques et leurs applications. La hauteur de la ligne et les annotations numériques représentent la valeur marchande estimée des médicaments mAbs pour chaque année indiquée (exprimée en milliards de dollars américains). Les anticorps colorés en rouge représentent les 10 médicaments anticorps les plus vendus en 2018. Ab, anticorps; ALCL, lymphome anaplasique systémique à grandes cellules; aTTP, purpura thrombopénique thrombotique acquis; BC, cancer du sein; CD, cluster de différenciation; CGRP, peptide lié au gène de la calcitonine; CGRPR, récepteur peptidique lié au gène de la calcitonine; CRC, cancer colorectal; CTLA-4, protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques; EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique; FGF, facteur de croissance des fibroblastes; GC, cancer gastrique; GD2, disialoganglioside GD2; HER2, récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain; IgE, immunoglobuline E; IL, interleukine; IL-17R, récepteur de l'interleukine-17; mAb, anticorps monoclonal; MCC, carcinome à cellules de Merkel; NSCLC, cancer du poumon non à petites cellules; PD-1, protéine de mort cellulaire programmée 1; PD-L1, ligand mortel programmé 1; TNF $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ; PR, polyarthrite rhumatoïde; RANKL, ligand activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa-B; VEGF-A, facteur de croissance endothélial vasculaire A; VEGFR2, récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire; vWF, facteur de von Willebrand; XLH, hypophosphatémie liée à l'X. D'après Lu et al., 2020 [27]*

Depuis 2008, 48 nouveaux mAbs ont été approuvés par la FDA américaine, contribuant à un marché mondial total de 61 mAbs en utilisation clinique à la fin de 2017. Fait frappant, un total de 18 nouveaux anticorps a été



approuvés par la FDA américaine de 2018 à 2019. Une liste exhaustive des médicaments à base d'anticorps approuvés depuis 2017 par la FDA américaine est présentée dans le tableau 2 [27].

mAb	Brand name	Company	Target	Format	Technology	Indication <sup>a</sup>	US <sup>b</sup> Approval
-----	------------	---------	--------	--------	------------	-------------------------	--------------------------

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Tableau 2 : Liste exhaustive des médicaments à base d'anticorps approuvés depuis 2017 par la FDA américaine. D'après Lu et al., 2020 [27]*

La pandémie COVID-19, causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), représente un défi sans précédent pour la santé publique mondiale. Les anticorps monoclonaux neutralisants les protéines spécifiques du SRAS-CoV-2 font partis des grandes lignes de stratégies thérapeutiques pour le traitement de la COVID-19 [28]. Ceci va donc booster davantage le marché de l'anticorps monoclonal.

Dans cette même logique, nous avons choisi d'utiliser un anticorps monoclonal en association avec notre model d'ingénierie tissulaire afin de promouvoir la régénération osseuse crânio-faciale.

### **4.1.2. Historique des anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont produits à partir d'une méthode d'immortalisation des cellules B par hybridation avec des cellules cancéreuses. Ces protéines ont d'abord été développées avec succès par Köhler et Milstein au milieu des années 1970 et publiées dans Nature en 1975 sans droits de propriété intellectuelle. Ces anticorps ont diverses applications dans les domaines de la biologie cellulaire, de l'immunologie, de la biotechnologie et des médicaments [29].

### **4.1.3. Structure de l'anticorps monoclonal**

L'anticorps monoclonal (mAb) est une IgG typique à un poids moléculaire total d'environ 150 kDa, qui présente une fonctionnalité biologique en interagissant avec des domaines complémentaires. C'est une molécule globulaire symétrique en forme de Y comprenant deux chaînes lourdes (~ 50 kDa chacune) et deux chaînes légères (~ 25 kDa chacune) identiques. Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable et de trois domaines constants, et les chaînes légères se composent d'un domaine variable et d'un domaine constant. Le domaine variable est en outre constitué de trois petites sections de peptide qui sont appelées régions déterminant la complémentarité (CDR). Les CDR sont les régions hypervariables qui déterminent la liaison spécifique des anticorps (Figure 17).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 17 : La structure de l'anticorps monoclonal et ses composants. D'après Saeed et al., 2016 [30].*

#### **4.1.4. Méthode de production d'anticorps monoclonaux**

Le principe de production d'un anticorps monoclonal (mAb) reste identique à celui développé par Köhler et Milstein dans les années 70 [31]. Cette technique consiste à injecter l'antigène d'intérêt chez une souris puis de prélever, au bout de quelques semaines, les cellules de la rate. Parmi ces cellules se trouvent des plasmocytes sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène choisi. On fusionne ces plasmocytes avec des cellules de tumeur appelées cellules myélomateuses (cellules immortelles). Ceci permet ainsi d'obtenir des hybridomes qui ont la capacité de se multiplier plus rapidement que les cellules normales et de développer indéfiniment des anticorps spécifiques. Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques multi-puits de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits. Afin d'éliminer les plasmocytes et les cellules myélomateuses non fusionnées, un milieu de culture sélectif (milieu de culture HAT) est utilisé.

Les plasmocytes non fusionnés meurent rapidement et les cellules myéломateuses utilisées ayant un gène non fonctionnel pour une enzyme intervenant dans la synthèse des nucléotides-hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGRPT) sont incapable de survivre dans un milieu HAT (hypoxanthine aminoptérine thymidine). Seules les cellules hybrides se multiplient. Les clones cellulaires producteurs sont isolés et conservés dans l'azote liquide (Figure 18) [32].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 18 : Méthode de production des anticorps monoclonaux. D'après Diallo et al., 2019 [33].*

### **4.1.5. Humanisation des anticorps monoclonaux**

Il a été démontré que les mAbs de souris ont une utilisation limitée en tant qu'agent thérapeutiques en raison d'une courte demi-vie sérique et d'une incapacité à déclencher des fonctions effectrices humaines lié à la production d'anticorps anti-souris humains (la réponse HAMA). Afin de réduire l'immunogénicité des anticorps de souris, le génie génétique a été utilisé pour générer des anticorps chimériques, c'est-à-dire des anticorps avec des régions constantes (Fc) humaines et des régions variables (Fab) de souris. Cependant, bien que les anticorps chimériques soient perçus comme moins étrangers, et donc moins immunogènes, que les anticorps monoclonaux de souris, des réponses anticorps anti-chimériques humains (HACA) ont néanmoins été observées. Une minimisation supplémentaire de la composante de souris des anticorps a été obtenue par greffe de CDR (Figure 46). Dans de tels anticorps « humanisés », seules les boucles CDR qui sont responsables de la liaison à l'antigène sont insérés dans le cadre de domaine variable humain. Cette capacité de manipuler des anticorps et d'obtenir des variantes plus humaines a finalement rendu les anticorps utilisables en clinique.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 19 : Ingénierie des anticorps. La technologie de l'hybridome de souris génère des anticorps monoclonaux de souris. Le génie génétique a favorisé la génération d'anticorps chimériques, humanisés et humains grâce à l'insertion de CDR et de fragments d'anticorps humains déjà existant dans des bibliothèques in vitro. D'après Brekke et al., 2003 [34].*

Dans notre étude, l'anticorps monoclonal utilisé chez notre model murin était humanisé. Il a donc pu provoquer une réponse immunitaire antihumaine chez nos souris.

#### **4.1.6. Dose d'administration**

Le rationnel des doses administrées dans les essais de première administration chez l'homme (EPAH) repose sur des données de toxicologie (dans environ la moitié des cas), sur des considérations de pharmacocinétique ou pharmacodynamique, ou encore sur la détermination de l'effet biologique minimal prévu.

Les méthodes d'escalade de dose traditionnelles et prudentes sont appliquées. Ainsi dans la plupart des essais, le design 3 + 3 ou des méthodes dérivées sont utilisés. Le design 3 + 3 prévoit que trois patients sont inclus dans chaque palier de dose, suivis de trois autres dans le cas où

une dose maximale tolérée (DMT) est rencontrée. L'escalade est possible seulement si aucun patient sur trois ou un sur six n'a expérimenté une toxicité limitante (TL).

## **4.2. Les anticorps monoclonaux anti-sclérostine**

Aujourd'hui, les anticorps monoclonaux mise à notre disposition dans le traitement des désordres métaboliques osseux sont l'anti-RANLK développé par Amgen (Denosumab) et l'anti-sclérostine (Scl-Ab), développé par Amgen (Romosozumab) ou Novartis (Setrusumab).

### **4.2.1. Le Romosozumab et le Setrusumab**

Le Romosozumab (EVENITY<sup>™</sup>) est un anticorps monoclonal humanisé contre la sclérostine développé par Amgen et pour le traitement de l'ostéoporose [35]. Il est approuvé au Japon, aux États-Unis et fait l'objet d'un examen réglementaire pour l'ostéoporose post ménopausique et l'ostéoporose masculine dans l'Union Européenne. Le développement du Romosozumab pour la guérison des fractures a été arrêté. La posologie approuvée pour le Romosozumab chez l'adulte au Japon est de 210 mg administrés par voie sous-cutanée une fois par mois pendant 12 mois [36]. L'utilisation du Romosozumab chez les patients atteints d'hypocalcémie est contre-indiquée et, sur la base des résultats de l'essai ARCH (NCT01631214), l'administration chez les patients à haut risque de cardiopathie ischémique ou de trouble cérébrovasculaire nécessite de la prudence, et doit prendre en considération les avantages et les risques du traitement. La majorité des études précliniques et cliniques traitant de l'ostéoporose post-ménopausique [37] et des défauts osseux de taille critique ont utilisé cet anticorps monoclonal [38, 39].

Le Setrusumab (anciennement connu sous le nom de BPS804) est un anticorps monoclonal neutralisant la sclérostine développé par Novartis en collaboration avec MorphoSys et récemment acquis par Mereo BioPharma [40]. Comme le précédent anticorps monoclonal, le Setrusumab est un anticorps monoclonal lambda d'immunoglobuline G entièrement humain (IgG2) sélectionné pour se lier à la sclérostine, et est formulé pour l'administration intraveineuse (I.V). Il a une affinité de 21 pM pour la sclérostine humaine. Le Setrusumab et sa version chimère humain / souris BPS545 ont augmenté de manière significative la masse osseuse corticale et spongieuse dans tous les modèles d'ostéoporose murine préclinique par induction de la formation osseuse. L'utilité clinique potentielle du Setrusumab comprend le traitement et la prévention de l'ostéogénèse imparfaite dominante sévère (OI) [41], et d'autres indications où la formation osseuse pourrait être bénéfique sur le plan thérapeutique, par exemple : hypophosphatasie, maladie rénale chronique, perte osseuse induite par la thérapie anticancéreuse, atrophie de la mâchoire, cicatrisation des fractures.

Le Setrusumab a été principalement expérimenté dans des modèles animal d'OI, chez des patients souffrant de cette maladie et a été l'anticorps avec lequel nous avons réalisé notre projet. De ce fait, nous avons choisi de présenter principalement les études qui utilisent cette molécule.

#### **4.2.2. Son mécanisme d'action à l'échelle moléculaire**

Les anticorps monoclonaux anti-sclérostines empêchent la liaison de la sclérostine aux corécepteurs LPR 5/6, induisent une inactivation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et ainsi une augmentation de la formation osseuse (Figure 20). Ce mécanisme suit les mêmes étapes que celles



décrites précédemment dans le schéma dédié à la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 20 : Inhibition et activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par l'anticorps anti-sclérostine. APC = adénomatose polypose coli; Dsh = échevelé; GSK3 = glycogène synthase kinase-3; LRP5/6 = protéine 5/6 associée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité; Scl-Ab = anticorps monoclonal contre la sclérostine; SOST = sclérostine. D'après Suen et al. 2016 [42].*

### **4.2.3. Effets de l'anticorps anti-sclérostine en culture cellulaire**

#### **4.2.3.1. Effet sur les cellules ostéoprogénitrices**

Plusieurs équipes [43] [44] ont cherché à identifier le rôle que pouvait jouer l'inoculation d'un mAb neutralisant la sclérostine (Scl-AbII) sur la

prolifération cellulaire et la capacité à former des nodules de calcium minéralisés. Les résultats révèlent une augmentation significative de la prolifération et du nombre de nodules dans les cultures cellulaires de souris ayant reçu Scl-Ab.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 21 : Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab. Des cellules stromales de la moelle osseuse ont été cultivées et le nombre de CFU (en haut) ainsi que le nombre de nodules minéralisation (en bas) ont été comptabilisés. \* indique une  $p < 0,05$  ; \*\* indique une  $p < 0,001$ . D'après Shahnazari et al., 2012 [44].*

### **4.2.3.2. Effet sur les ostéoclastes**

D'autres équipes [44] [45] ont souhaité évaluer les effets de Scl-Ab sur le nombre de pré-ostéoclastes dans la moelle osseuse. Les résultats révèlent une réduction significative de l'activité phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) chez les animaux traités avec Scl-Ab.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 22 : Traitement de souris soumises à des charges mécaniques (L) ou non (UL) recevant Scl-Ab. La formation d'ostéoclastes (TRAP cellules multinucléées) a été quantifiées ex vivo (moyenne  $\pm$  SE, n = 8). Des images représentatives sont présentées pour chaque groupe. \* indique une différence significative avec  $p < 0,05$ . \*\* indique une différence significative entre les groupes L et UL à  $p < 0,001$ . D'après Shahnazari et al., 2012 [44]*

### **4.2.4. Effet de l'anticorps anti-sclérostine chez le modèle murin**

#### **4.2.4.1. Sur les ostéoblastes**

L'équipe de Kim et al., en 2017 [46] a souhaité savoir comment se traduisait *in vivo* l'impact de l'administration de Scl-Ab dans l'augmentation de l'activité des ostéoblastes. Pour cela, ils ont utilisé le traçage de lignées *in vivo* pour déterminer si Scl-Ab favorise la conversion des cellules bordantes

en ostéoblastes sur les surfaces osseuses périostées et endocorticales de la souris. Deux stratégies indépendantes de traçage de lignée inductibles par le Tamoxifène ont été utilisées pour marquer les ostéoblastes matures et leur progéniture en utilisant les promoteurs DMP1 et l'ostéocalcine (Figure 23). Les souris ont été traitées avec un placebo ou Scl-Ab (25 mg / kg) deux fois entre la semaine 12 et 13. Après euthanasie, les cellules marquées ont été dénombrées, leur épaisseur quantifiée, et la prolifération et l'apoptose examinées.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 23 : Protocole expérimental. D'après Kim et al., 2017 [46].*

Les résultats de cette expérimentation révèlent que Scl-Ab a conduit à une augmentation significative de l'épaisseur moyenne des cellules bordantes marquées sur les surfaces osseuses périostées et endocorticales.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 24 : Effets de l'anticorps Scl-Ab sur les descendants des ostéoblastes LacZ $\beta$  sur la surface périostée du fémur. (A) La coloration X-gal a été effectuée à 8 semaines et 12 semaines après la dernière injection de Tamoxifène, ou les animaux ont reçu une injection d'Scl-Ab (25 mg / kg / j) ou un placebo deux fois par semaine. Analyse quantitative du nombre (B) et de l'épaisseur (C) des cellules X-gal (b) avant et après traitement avec Scl-Ab ou avec le placebo. Les données sont exprimées en moyenne SEM, a :  $p < 0,05$ . D'après Kim et al., 2017 [46].*

#### **4.2.4.2. Lors du remodelage osseux**

Afin de connaître l'effet de Scl-Ab lors de l'apposition osseuse dans un contexte ostéoporotique, l'équipe de Li et al en 2009 (Figure 25) [43] a injecté en sous-cutanée soit du PBS ou un anticorps anti-sclérostine (Scl-AbII) murin deux fois par semaine pendant 5 semaines chez des rats qui ont subi (OVX) ou non (SHAM) une ovariectomie. Le poids corporel et la DMO surfacique ont été déterminés avant et après le début du traitement (chaque semaine). Pour une analyse histomorphométrique dynamique, des rats ont reçu par voie intrapéritonéale de la tétracycline et de la calcéine, respectivement, 10 et 3 jours avant l'autopsie. Les résultats révèlent que le traitement avec Scl-AbII augmente le volume osseux (BV/TV) pour les rats OVX et restaure le volume osseux trabéculaire, en particulier grâce à un doublement de l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th).

Une autre étude plus récente conduite par Stolina et al., en 2014 [45] a réussi à mettre en évidence les mêmes effets du traitement avec Scl-Ab sur l'apposition osseuse.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 25 : Effet du traitement Scl-AbII du le remodelage osseux. (A) Images micro-CT représentatives d'une section centrale de 1 mm dans chacun des trois groupes (B et C) Quantification du Tb.vDMO et Tb.BV/TV. \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au véhicule OVX. D'après Li et al., 2009 Li [43].*

#### **4.2.4.3. Dans la réparation osseuse**

De nombreuses équipes [47] [22, 48-52] ont souhaité mettre en évidence les effets du traitement avec Scl-Ab sur la réparation osseuse au niveau d'une fracture du fémur. Toutes démontrent une augmentation significative de la fraction volumique osseuse (BV/TV) et de la minéralisation dans le groupe de traitement Scl-Ab.

**Control Group**

**Scl-Ab Group**

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 26 : Réparation d'un fémur sous traitement Scl-Ab. En haut : Reconstruction du tissu minéralisé néoformé obtenue grâce au micro-CT et coupes histologiques de fémurs fracturés et traité avec Scl-Ab ou avec un placebo, à 4 semaines. En bas : Graphique représentant la quantification du BV/TV dans les groupes traités par Scl-Ab ou avec une placebo. \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . D'après Cui et al. 2013 [47].*

#### **4.2.4.4. Dans l'ostéointégration des implants dentaires**

L'équipe de Viridi et al., en 2015 [53] a mis en évidence l'impact du traitement avec Scl-Ab dans l'ostéointégration d'un implant placé chez des rats qui ont subi ou non une ovariectomie. L'étude révèle que le traitement avec Scl-Ab permet d'augmenter significativement la force de fixation implantaire à 8 et 12 semaines après implantation. Cet effet n'est pas retrouvé chez des souris qui ont subi une ovariectomie.



« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 27 : Histogramme montrant le niveau d'ostéointégration des implants sous traitement Scl-Ab. Les rats ayant reçu le véhicule (barres vides) ont une force de fixation significativement inférieure à ceux ayant reçu Scl-Ab (barres pleines). Les différences significatives suivent ceci : \* si  $p < 0,017$  (le niveau ajusté pour la signification, en tenant compte des comparaisons multiples). D'après Viridi et al., 2015 [53].*

#### **4.2.4.5. Dans un contexte de maladie parodontale**

L'équipe de Taut et al., en 2013 [54] a souhaité évaluer le potentiel thérapeutique de Scl-Ab pour stimuler la régénération osseuse alvéolaire après une parodontite expérimentale (PE). La PE induite par la ligature chez le rat a permis de générer des défauts osseux alvéolaires localisés. Après 4 semaines d'induction de la maladie, Scl-Ab ou un placebo ont été administrés par voie systémique jusqu'à 6 semaines pour déterminer la capacité de Scl-Ab à régénérer l'os autour des défauts osseux soutenant les dents. Les résultats révèlent que 6 semaines de traitement avec Scl-Ab permettent d'améliorer significativement la guérison de l'os maxillaire, telle que mesurée par calcul de la fraction du volume osseux (BVF).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 28 : Évaluation par micro-CT de la BVF dans l'os alvéolaire pendant le traitement avec Scl-Ab après l'induction d'une parodontite expérimentale. \* :  $p < 0,05$  versus Scl-Ab. D'après Tau et al., 2013 [54].*

#### **4.2.4.6. Lors de la croissance crânienne**

L'équipe de Scheiber et al., en 2019 [55] a choisi d'analyser l'impact du traitement Scl-Ab dans la croissance crânienne chez un modèle de souris présentant les signes d'une Ostéogénèse imparfaite (OI) dominante sévère. Dans l'étude, des mesures dimensionnelles et volumétriques du crâne de ces souris Brl /+ OI en croissance traitées avec Scl-Ab ont été entreprises. Les souris traitées entre 3 et 14 semaines d'âge avec des doses élevées d'Scl-Ab montrent un épaissement pariétal significativement capable de réduire les déficiences de l'épaisseur du crâne induites par l'OI. D'autres changements dans la morphologie crânienne, tels que les longueurs et les distances entre les repères anatomiques, le volume intracrânien et l'interdigitation des sutures, ont montré des effets minimes de Scl-Ab par rapport aux différences induites par la croissance.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 29 : Les données micro-CT de l'os pariétal chez les souris *Brtl* /+ *OI* en croissance traitées avec *Scl-Ab*. Les résultats révèlent que l'épaisseur pariétale moyenne est affectée par le génotype et le traitement (A, B). Échantillon d'épaisseur pariétale dans une régions d'intérêt. L'échelle de recherche des couleurs représente l'épaisseur mesurée à chaque emplacement en mm à l'aide du calcul d'épaisseur locale. (C, D) L'imagerie micro-CT révèle que le volume intracrânien est affecté par le génotype mais pas par le traitement *Scl-Ab*. Les données sont présentées sous forme de SEM moyen des mesures. D'après Scheiber et al., 2019 [55].*

#### **4.2.4.7. Lors de la croissance mandibulaire**

L'équipe de Tamplen et al., en 2018 [56] a souhaité connaître l'effet d'un traitement *Scl-Ab* sur la croissance de la mandibule chez des souris jeunes sauvage (WT) et chez des souris *Ts65Dn*, qui présentent une carence osseuse dépendante du syndrome de Down. Après 3 semaines de traitement, les souris de type sauvage traitées avec *Scl-Ab* ont une augmentation de l'épaisseur trabéculaire et de la hauteur alvéolaire mandibulaire par rapport aux témoins. *Scl-Ab* augmente les paramètres de l'os mandibulaire *Ts65Dn* de telle sorte qu'ils sont statistiquement indiscernables de ceux des mandibules de type sauvage traitées avec un placebo.

#### **4.2.4.8. Dans la régénération d'un défauts péri-implantaire**

L'équipe de Yu et al., en 2018 [57] a souhaité déterminer l'effet du traitement Scl-Ab dans la régénération osseuse d'un défaut situé autour d'un implant placé dans un site post-extractionnel chez des rats. Pour cela, un mois après l'extraction des premières molaires maxillaires, des défauts d'ostéotomie ont été créés sur la face coronale de chacun des sites d'extraction puis des implants ont été placés dans les ostéotomies. Coïncidant avec la pose de l'implant, Scl-Ab a été administré par voie sous-cutanée et comparé à un véhicule témoin à 28 jours. A J14 et J28, les résultats révèlent une fraction du volume osseux significativement augmenté chez les rats qui ont reçu le traitement Scl-Ab par rapport au placebo.

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

Figure 30 : Régénération osseuse dans les défauts péri-implantaires. En haut : Reconstruction 3D et images sagittales bidirectionnelles obtenues avec le micro-CT représentant l'os alvéolaire maxillaire entourant les implants en titane aux jours 10, 14 et 28 post-opératoire. La ligne pointillée jaune marque les dimensions approximatives du défaut. En bas : Graphiques représentant la quantification du volume osseux néoformé (A) et de sa densité (B). ANOVA unidirectionnelle ( $p < 0,05$ ). D'après Yu et al., 2018 [57].

#### **4.2.4.9. Dans un modèle d'Ostéogénèse imparfaite dominant sévère**

Scl-Ab a été testé chez des souris sauvages et des souris Col1a1Jrt /+, un modèle d'Ostéogénèse imparfaite (OI) dominant sévère. Pour ce faire, le Setrusumab (100 mg/kg I.V) a été administré aux souris en croissance et aux souris adultes [58]. Les analyses micro-CT du fémur ont montré que le traitement au Setrusumab entraînait un volume osseux trabéculaire et une épaisseur corticale plus élevés chez les souris WT aux deux âges et chez les souris au phénotype de l'Ostéogénèse imparfaite en croissance, mais pas chez les souris OI adultes. Ainsi, les données montrent que le Setrusumab a un effet plus important chez les souris WT que chez les souris Col1a1Jrt /+, ce qui suggère que l'efficacité démontrable du Setrusumab pourrait être plus importante dans un modèle de souris OI non sévère.

#### **4.2.5. Intérêt de l'anticorps Setrusumab chez le primate**

Le Setrusumab a également été administré à des singes cynomolgus (deux applications I.V de 10 mg/kg). Cette administration a entraîné une augmentation substantielle et prolongée de l'ostéocalcine sérique (OC) et du propeptide N-terminal (PINP) de type I procollagène, deux marqueurs de la formation osseuse. La demi-vie d'élimination du Setrusumab est d'environ 14 jours, ce qui correspond à celle d'un anticorps IgG2 chez un singe cynomolgus. Ensemble, ces données suggèrent que le Setrusumab

peut avoir un impact dans les maladies osseuses où la formation osseuse est nécessaire, comme par exemple l'ostéoporose post ménopausique [58].

#### **4.2.6. Essais cliniques sur l'Ostéogénèse imparfaite avec l'anticorps Setrusumab**

Le Setrusumab a été administré à des sujets humains dans cinq études cliniques à ce jour, dont quatre sont déjà terminées. L'étude MBPS205 est une étude de phase IIb, multicentrique, multinationale, de recherche de dose, comprenant une sous-étude ouverte, chez des patients adultes atteints d'OI de type I, III ou IV traités par le Setrusumab [41, 59].

### **4.3. Conclusion**

L'ensemble des résultats scientifiques présentés précédemment semblent démontrer que Scl-Ab présente un intérêt bénéfique dans le traitement de pathologies osseuses congénitales et dans la réparation osseuse post-traumatique. Cependant aucune étude n'a identifié ses effets dans le cadre de la régénération osseuse crânio-faciale au sein de défaut de taille critique comblés à l'aide d'hydrogels de collagène denses enrichis de cellules pro-ostéoblastiques.

# **Chapitre 2 : Régénération osseuse crânio-faciale**

Le complexe crânio-facial est composé des os plats de la voûte crânienne et d'une mosaïque osseuse des 3 étages de la face. Ainsi, ce massif osseux est en mesure de remplir un rôle protecteur et masticatoire. Suite à des délabrements structurels de taille critique, des greffes osseuses autogènes, xénogènes et allogènes sont aujourd'hui réalisées afin de restaurer ces deux fonctions [60]. Cependant, ces greffes ne sont pas toujours possibles ou sans danger. C'est pourquoi, cliniciens et ingénieurs-chercheurs tentent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les techniques d'ingénierie tissulaire osseuse.

## **1. Défauts osseux de taille critique**

### **1.1. Définition**

Un défaut de taille critique est défini comme une perte osseuse importante qui empêche la guérison spontanée. De tels défauts peuvent être causés par un traumatisme contondant /pénétrant, un traitement chirurgical des tumeurs ou une nécrose causée par des radiations/diverses substances chimiques. L'incapacité du tissu osseux à se régénérer au sein du défaut conduit à une réparation fibreuse qui évoluent vers une pseudarthrose. Des modèles expérimentaux de pseudarthrose ont été rapportés chez différents animaux de laboratoire et les études révèlent la présence de cellules fibroblastiques associées à une matrice extracellulaire collagénique au sein des défauts [61].

Les approches thérapeutiques traditionnelles dans le traitement de défauts osseux de taille critique comprennent les greffes osseuses autologues, les allogreffes et les xéngreffes. Ces approches ont fait leurs preuves sur le

plan clinique mais présentent certains inconvénients que la bio-ingénierie tente de contourner. Les défauts de taille critiques font donc partie de l'indispensable dans le design des études expérimentales qui cherchent à tester les nouveaux biomatériaux permettant la réparation/régénération osseuse [62, 63].

## **1.2.Intérêt du défaut osseux pariétal dans l'étude de la régénération osseuse**

### **1.2.1.Origine embryologique et mécanisme d'ossification singuliers**

Le massif crânio-facial a une origine embryologique qui lui est propre et qui se distingue du reste du squelette appendiculaire. En effet, le squelette de la face, des mâchoires, des fosses nasales et de l'oreille moyenne est issu des crêtes neurales [64]. Cette particularité embryologique est associée à un mécanisme d'ossification membraneuse qui s'oppose à l'ossification enchondrale, retrouvée dans les os longs (Figure 31) [65].

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*



*Figure 31 Dérivation des os du complexe crânio-facial. Deux vues du squelette crânio-facial humain, frontal (A) et latéral (B) représentant à la fois la source cellulaire et le mécanisme de formation osseuse. Bleu clair - ossification intramembraneuse. Jaune - ossification endochondrale. Vert - ossification intramembraneuse et endochondrale. Pointillées - dérivé des cellules de la crête neurale. Lignes diagonales - dérivées du mésoderme paraxial. Hachuré - dérivé de la crête neurale et du mésoderme paraxial. Eth, os éthmoïdal; Fro, os frontal; Lac, os lacrymal; mandibule; Max, maxillaire; Nas, os nasal; Occ, os occipital; Par, os pariétal; Squ, os squameux; Tem, os temporel; Vom, vomer; Zyg, os zygomatique. D'après Runyan et al. 2017 [65].*

La biologie du développement a montré que cette ossification membraneuse crânio-faciale comporte, d'abord, une phase de morphogenèse où les cellules mésenchymateuses migrent, se condensent et prolifèrent pour former des centres d'ossification. Puis, ces cellules mésenchymateuses se différencient en pré-ostéoblastes et en ostéoblastes avant de synthétiser une matrice extracellulaire non minéralisée, appelée la matrice ostéoïde. Après maturation et enrichissement en ions calcium et phosphates, cette matrice ostéoïde devient la matrice osseuse minéralisée. Ces centres d'ossification croient dans le mésenchyme. A la périphérie, le tissu conjonctif fibreux se transforme en périoste et, enfin, les ostéoblastes emmurés dans la matrice minéralisée deviennent des ostéocytes (Figure 32). La réparation osseuse crânio-faciale fait appel aux mêmes mécanismes physiologiques que ceux utilisés lors du développement embryonnaire du squelette.

De par son origine embryologique et son mécanisme d'ossification membraneuse, l'os pariétal est un site anatomique de choix pour pouvoir étudier les mécanismes de réparation osseuse crânio-faciale. Notons, cependant, une nette différence entre le développement fœtal osseux et la réparation osseuse chez l'adulte. En effet, les contraintes mécaniques de l'environnement présentes après la naissance influencent la différenciation des cellules ostéoprogénitrices [66].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes de la mise en place du squelette crânio-facial lors de la morphogénèse. D'après John Bilezikian, 2019 [67].*

## **1.2.2.Site anatomique favorable à l'expérimentation**

D'un point de vue expérimental, plusieurs arguments sont favorables à l'usage d'un défaut de taille critique pariétal. D'abord, l'os pariétal permet aisément l'établissement d'un défaut uniforme, reproductible et standardisé qui est facile à évaluer par analyse radiographique et histologique. Ensuite, la dure-mère et les tissus cutanés de recouvrement constituent un support adéquat pour les matériaux implantés, sans nécessité de fixation interne ou externe. Et finalement, la large utilisation de ce modèle rend la comparaison des résultats possible.

Néanmoins, il ne permet pas d'évaluer la réponse biologique de la réparation osseuse au sein du substitut implanté sous contrainte biomécanique [68]. Pour pallier à cela, la mandibule pourrait être envisagée mais ce site nécessite une plus grande expertise chirurgicale.

## **2.Approches thérapeutiques visant à traiter les défauts de taille critique**

### **2.1.Substitut osseux d'origine naturelle**

#### Autogreffe :

Elle correspond à l'implantation d'os prélevé sur le même individu. Elle reste le « gold standard », c'est-à-dire le matériau de référence dans le domaine des substituts osseux. Cette technique écarte tout risque de rejet et possède un potentiel ostéogénique et des propriétés mécaniques optimales. Pourtant elle est associée à des complications majeures (infections, hématomes, réinterventions et douleurs prolongées durant 6 mois) dans 9 % des cas et à des complications mineures dans 18 % des cas [69].

#### Allogreffe :

La recherche d'autres produits de substitution permettant d'éviter la morbidité du prélèvement d'os autogène et ses limitations a conduit à la mise au point des allogreffes. C'est une alternative consistant à implanter de l'os provenant d'un individu différent mais de la même espèce. Elle peut être issue de rebuts chirurgicaux (têtes fémorales, par exemple) ou de prélèvements post-mortems. Ces produits sont obtenus à partir d'os d'un individu sain vivant ou d'un cadavre prélevé dans les 48 heures suivant le décès.

La performance de ces produits dépend fortement du donneur et de la procédure de préparation qui varie d'un laboratoire à un autre. Le greffon a de bonnes propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices [70].

#### Xénogreffe :

La xénogreffe est apparue comme une solution de remplacement à l'allogreffe. Ce substitut osseux provient d'un individu d'une espèce

différente, principalement le bœuf et le porc. Des matériaux d'origine naturelle ont également été commercialisés, notamment le corail ou la nacre. Le contenu organique de ces prélèvements est supprimé, seule la structure minérale est laissée intacte ce qui leur confère un potentiel ostéoconducteur et une biocompatibilité intéressante.

## **2.2.Substituts osseux alloplastiques**

L'idée de remplacer un membre manquant n'est pas récente : les hommes auraient cherché à remplacer des dents perdues par des matériaux naturels comme l'ivoire ou le corail dès l'Antiquité. Mais le développement de matériaux synthétiques comme matériaux de comblement est plus récent et a connu des avancées rapides au cours du XXème siècle [71].

Les progrès dans le domaine des biomatériaux pour la réparation osseuse et les évolutions associées au concept de comblement osseux ont été affinées conjointement aux progrès scientifiques (Figure 33). La première génération de substituts osseux alloplastiques à avoir été développée correspond à des matériaux bioinertes qui avaient pour rôle principal de remplacer la fonction mécanique de l'os. Ce sont des prothèses métalliques, ou des céramiques comme l'alumine qui ont d'abord été utilisées. L'amélioration de la biointégration de l'implant a conduit à la deuxième génération de substituts osseux, dits bioactifs et biodégradable, car capables de former un lien fort avec le site receveur comme par exemple l'hydroxyapatite ou des bioverres. Aujourd'hui, les recherches ont permis de développer une troisième génération de biomatériaux biomimétiques capables de favoriser, non seulement l'intégration, mais aussi la régénération osseuse [72].

Le biomatériau proposé dans le projet de ma thèse appartient à cette troisième catégorie qui répond aux principes de l'ingénierie tissulaire de l'os.

C'est un matériau hybride collagénique enrichi de cellules souches mésenchymateuses porteuses de la délétion du gène *Sost*.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 33 : Évolution des différentes générations de biomatériaux de comblement osseux, de leur nature, leur rôle et leur propriété. D'après la thèse de S. Jacquart, 2013.*

## **3. Ingénierie tissulaire de l'os**

### **3.1. Ses principes**

L'ingénierie tissulaire se traduit comme « l'application des principes et des méthodes de l'ingénierie et des sciences du vivant à travers les connaissances fondamentales des structures et des fonctions des tissus normaux et pathologiques et le développement des substituts biologiques pour restaurer, maintenir ou améliorer des fonctions » (National Science Foundation) [73].

Les stratégies sur lesquelles reposent l'ingénierie tissulaire s'appuient sur les composants fondamentaux de la réparation osseuse qui sont l'ostéoconduction, l'ostéoinduction, l'ostéogénicité et l'angiogenèse [74] grâce à l'association d'un échafaudage enrichi de cellules ostéoprogénitrice,

d'un apport vasculaire et de facteurs biochimiques/génétique favorable à la réparation osseuse (Figure 34).

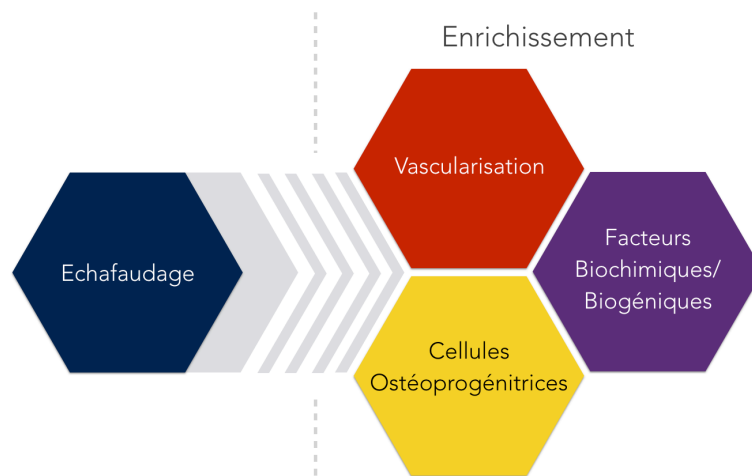


Figure 34 : Principaux piliers permettant l'ingénierie tissulaire de l'os. Adapté de Vallet-Regi, Izquiero-Barba, 2012 [75]

#### Ostéoconduction :

L'ostéoconduction fait référence à la capacité d'un matériau/échafaudage à soutenir la croissance du tissu osseux sur la surface, dans les pores, les canaux ou les tuyaux d'une greffe. Les matériaux ostéoconducteurs permettent aux cellules ostéogéniques de s'infiltrer, de proliférer, puis de former un nouvel os dans la structure du substrat. Selon la conférence de 2018 [76], la définition de l'ostéoconduction est la suivante: « le processus consistant à laisser passivement les os croître et se remodeler sur une surface » [77]. Les caractéristiques physiques d'un substitut osseux participent nettement à l'ostéoconduction de celui-ci.

#### Ostéoinduction :

L'ostéoinduction est le processus dans lequel l'ostéogenèse est encouragée. Elle est également décrite comme la capacité à stimuler la différenciation des cellules souches ou des cellules ostéoprogénitrices en cellules osseuses matures. L'ostéoinduction a été définie, lors de la conférence de 2018 [76], comme « action ou processus de stimulation de l'ostéogenèse » [77].

Lorsque qu'une fracture se produit, l'ostéoinduction est initiée grâce à un ensemble de signaux locaux et systémiques. Ces signaux sont médiés par des impulsions neuronales, par l'hématome et par le traumatisme causé aux tissus entourant la fracture. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les signaux inflammatoires (c'est-à-dire IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et de formation osseuse (BMP et WNT). Ces facteurs participent à la migration des cellules phagocytaires vers la zone de la fracture, à l'élimination du tissu nécrotique, à la propagation de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans le site de fracture, à l'apport de nutriments et de cellules permettant la réparation [74].

#### L'ostéogénicité :

D'après la conférence de 2018 [76], l'ostéogénèse décrit le processus de formation et de développement osseux et les matériaux ostéogéniques sont capables de former un nouvel os à partir des cellules ostéoblastiques présentes dans ces matériaux [77]. Pour permettre l'ostéogénicité des matériaux, des méthodes d'isolement de cellules au potentiel ostéogénique ont été développées. Ainsi, de manière stérile et peu invasive, des dizaines de millions de cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent être isolées et purifiées puis implanté dans un biomatériau afin de promouvoir le potentiel ostéogénique de celui-ci [78, 79]. À l'heure actuelle, plusieurs types de cellules souches ont été proposés comme source de progéniteurs d'ostéoblastes. Les exemples sont les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh), les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) [80]. Dans le cadre de notre projet de recherche, les cellules souches mésenchymateuses issues du parenchyme pulpaire des dents (dental pulpe stem cells, DPSC) ont été les cellules choisies pour induire cette ostéogénicité.

## 3.2. Notre échafaudage : un hydrogel compressé de collagène de type I

### 3.2.1. La fabrication de l'hydrogel de collagène compressé

*In vitro* dans des solutions tampons, à pH neutre et à des températures > 20 ° C, le collagène de mammifère s'assemble en microfibrilles et fibrilles conduisant à la réticulation croisée typique qui est observée dans les images microscopiques électroniques.

Le rapport protéines/eau extrêmement faible ne confère pas de résistance mécanique intrinsèque à ce matériau ce qui limite son application immédiate *in vivo* au sein de défauts de taille critique [81]. C'est pourquoi diverses méthodes de compression ont été développées pour améliorer leurs propriétés mécaniques [82].

Parmi toutes ces techniques de compression, nous avons opté pour une compression plastique non confinée. Ainsi, les gels polymérisés sont comprimés entre une pile de papier buvard, une maille en nylon et une maille en acier inoxydable (Figure 35) [83].

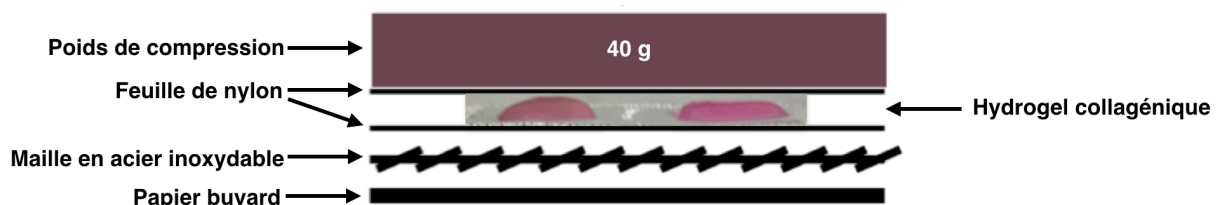


Figure 35 : Schéma montrant les éléments superposés en couche pour former des hydrogels de collagène dense par compression plastique de gels de collagène hautement hydratés. Adapté à partir de Coyac et al., 2013 [83].



Des études ont montré que ce processus de compression plastique (CP) est capable de produire des matrices de collagènes avec une résistance mécanique favorable à la viabilité cellulaire et la prolifération des fibroblastes dermiques. Les matrices de collagène traitées par CP peuvent donc être considérées comme des systèmes matriciels potentiellement idéaux pour l'ingénierie du tissu osseux [81]. De plus, il a été démontré qu'une augmentation supplémentaire des propriétés mécaniques pouvait être produite en soumettant les matériaux à un processus de compression secondaire. Cette « double compression » contrôlée des matrices de collagène a réduit la teneur en liquide de 50 à 60% supplémentaires et a augmenté de manière reproductible les propriétés mécaniques.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 36 : Microscopie électronique à balayage (MEB) de matrice de collagène dense acellulaire incubé à 37 ° C en milieu ostéogénique. Le maillage fibrillaire de collagène est clairement visible à faible et fort grossissement, tout comme le motif de bandes de fibrilles. D'après Coyac et al., 2013 [83].*

Notons pour finir que d'autres résultats obtenus par Bitar et al., [81] et Coyac et al., [83] mettent en évidence que la combinaison des cellules ensemencées dans la matrice de collagène dense permet la viabilité cellulaire avec une forte interaction cellule-matrice collagène (Figure 37).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 37 : Coloration des cellules Live / Dead® ensemencées dans un hydrogel collagénique dense dans des conditions ostéogéniques à différents temps. Les cellules marquées en vert représentent des cellules viables sans rupture de membrane, tandis que le noyau des cellules mortes se colore en rouge (régions encadrées). A J0, immédiatement après la compression plastique, toutes les cellules sont jugées viables (vertes) et bien dispersées dans tout l'hydrogel. A J8 et J16, une densité élevée de cellules viables est observée avec un nombre limité de cellules mortes (rouge, dans les cases du panneau C). La barre d'échelle est égale à 250 µm. A droite, Micrographies MEB à fort grossissement de cellules individuelles (astérisques) intégrées dans le collagène. D'après Coyac et Chicatun, 2013 [83]*

L'hybridation du collagène à un autre biomatériau comme l'hydroxyapatite aurait pu permettre d'améliorer les propriétés mécaniques de notre substitut (Figure 38) [84]. Ceci n'a pas été notre choix pour des raisons techniques et conceptuels. En effet, nous avons le souhait de comparer nos résultats à ceux obtenus auparavant.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 38 : Graphique représentant les propriétés des matériaux naturels et synthétiques, illustrant l'augmentation de la ténacité des matériaux naturels composites. D'après Wegst et Bai, 2015 [84]*

### **3.2.2. Les Caractéristiques favorables des matrices collagéniques**

Composé de collagène de type I :

Le collagène de type I est le plus abondant dans la peau, les tendons et les os. En tant que principale protéine de la matrice extracellulaire (MEC) dans les tissus musculo-squelettiques, ce collagène fait donc parti des biomatériaux de choix en régénération osseuse [85].

Les membranes en collagène de type I sont couramment utilisées dans la régénération des os alvéolaires dentaire selon le concept de régénération osseuse guidée (GBR). Des études récentes mettent en évidence que l'utilisation d'une membrane de collagène résorbable d'origine naturelle pour couvrir des défauts osseux de fémurs de rat améliore significativement l'expression précoce et tardive des facteurs de recrutement cellulaire, tels

que le récepteur de chimiokine CXCR4 (CXCR4) et la protéine chimio-attractante des monocytes (MCP-1) dans les défauts sous-jacents. En plus de l'effet sur le recrutement cellulaire, la présence de la membrane de collagène semble favoriser significativement une augmentation précoce de l'expression des gènes impliqués dans la formation osseuse (le gène codant pour l'ostéocalcine) et dans le remodelage osseux (gène codant pour la cathepsine K, le récepteur de la calcitonine et le RANKL). Ceci laisse penser que la membrane de collagène présente un rôle bioactif favorisant le processus de régénération osseuse [86].

#### Propriétés de diffusion-absorption :

Des études utilisant un système de chambres de diffusion (deux chambres agitées qui ont été séparées par une membrane de collagène) ont montré que le taux de diffusion entre les chambres dépend du poids moléculaire et de la nature chimique des substances. Ainsi, les petites molécules telles que le chlorure de sodium se diffuse très rapidement à travers une membrane commerciale issue de derme porcin (Biogide®), tandis que l'acide hyaluronique (poids moléculaire  $M_w \sim 1,2$  MDa) est largement exclu [87].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 39 : Perméabilité de différentes substances à travers des membranes de collagène (Biogide®) préparées à partir de derme porcin. Le taux de diffusion entre les chambres A et B dépend du poids moléculaire et de la nature chimique des*

substances. Triangle : Tryptophane ; cercle rempli : NaCl; carré rempli: glucose; diamant chargé: acide hyaluronique (Mw ~ 1,2 MDa). D'après Meyer et al., 2019 [87].

Dans le cadre de notre projet, cette caractéristique laisse penser que les facteurs biochimiques indispensables à la réparation osseuse pourront librement circuler au sein de notre hydrogel.

#### Taux de dégradation :

Les mêmes études mettent en évidence que le collagène triple hélice présent dans les membranes commerciales issue de derme porcine est stable et résiste à de nombreuses protéases à l'exception des collagénases. De plus, ces études révèlent qu'une réticulation supplémentaire stabilise davantage le collagène [87].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 40 : Dégradation du derme porcine avec et sans réticulation. La dégradation du derme porcine sans (à gauche) et avec réticulation synthétique (à droite) se fait en fonction du temps de traitement et du type d'enzyme. Triangle plein : collagénase A; cercle ouvert : protéinase K ; carré rempli : protéinase E ; triangle ouvert : trypsine ; diamant rempli : thermolysine ; carré ouvert : chymotrypsine. D'après Meyer et al., 2019 [87].*

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 41 : Tableau récapitulatif des temps de dégradation in vivo des différentes membranes collagéniques commercialisées. D'après Meyer et al., 2019 [87]*

Dans le cadre de notre projet, cette stabilité du collagène liée à sa réticulation laisse penser que notre biomatériau collagénique pourra remplir son rôle de support cellulaire et moléculaire sur une plus longue durée.

### **3.3.L'enrichissement de l'hydrogel avec des cellules issues du parenchyme pulpaire de dents murines (mDPSC)**

#### **3.3.1.Cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ingénierie tissulaire**

À ce jour, les principales cellules souches utilisées dans l'ingénierie tissulaire sont des cellules souches dérivées de tissus, appelées cellules souches adultes, qui peuvent être obtenues à partir de la plupart des tissus adultes.

En raison de sa facilité d'isolement, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont les plus utilisées en recherche régénérative [88]. La distribution diversifiée *in vivo* de ces cellules comprend la moelle osseuse, l'adipose, le périoste, la membrane synoviale, le muscle squelettique, le derme, les péricytes [89], les cellules adventices de la niche périvasculaire, le sang,

l'os trabéculaire, le cordon ombilical humain, les sutures osseuses, le poumon, la pulpe dentaire et le ligament parodontal. Les CSM sont des cellules de type « fibroblastique », qui forment en culture cellulaire des colonies de fibroblastes (CFU-F) [90]. Selon la définition de l'International Society pour la thérapie cellulaire (ISCT) [91], ces cellules sont des cellules adhérentes et positives pour les marqueurs suivants CD73, CD90 et CD105 (> 95%) et négatives pour d'autres antigènes spécifiques, tels que CD45, CD34, CD14, CD79 et HLA classe II (<2%).

Les MSC peuvent se renouveler par division cellulaire, alors qu'elles se différencient en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes après exposition à des facteurs solubles spécifiques dans le microenvironnement [92, 93]. Lorsqu'il est souhaité d'orienter les CSM vers une différenciation ostéogénique, l'utilisation de dexaméthasone, de  $\beta$ -glycérophosphate et d'acide ascorbique dans le milieu de culture est nécessaire [92].

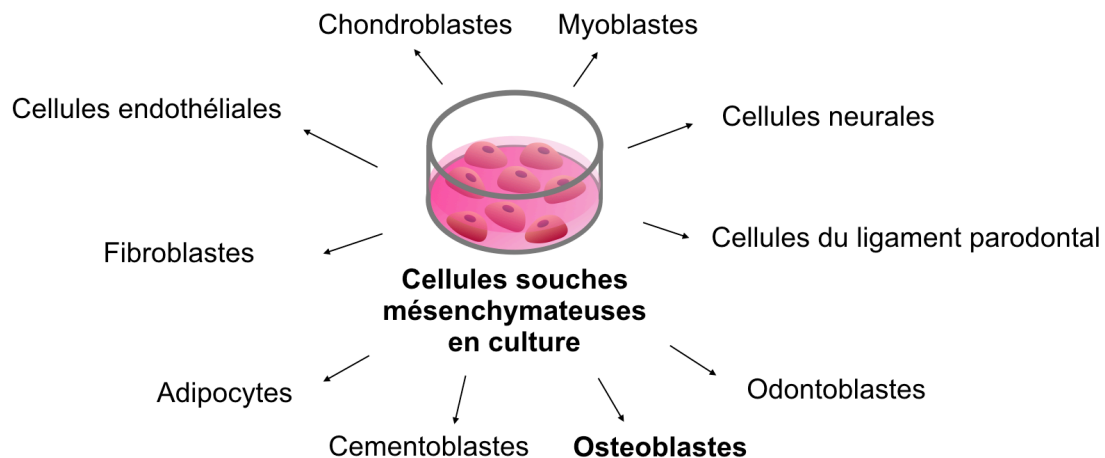


Figure 42 : Schéma expliquant l'engagement et la maturation possible des cellules souches mésenchymateuses. Adapté d'après Rosenbaum, Grande, 2008 [94].

Parmi les CSM issues des tissus dento-pulpeaux, les CSM de la pulpe dentaire seraient les premières à avoir été identifiées [95]. Par la suite, d'autres CSM dentaires ont été découvertes, dérivant de dents temporaires humaines (SHED), de germes dentaires (TGPC), de follicules dentaires (DFPC), du ligament parodontal (PDLSC), de l'os alvéolaire (ABMSC), de la

papille apicale (SCAP) et du tissu gingival (GMSC). Ces CSM, dérivées de tissus dentaires, présentent certaines propriétés, telles que l'auto-renouvellement, le potentiel de multi-différenciation, les fonctions immunomodulatrices, ainsi qu'une capacité de régénération tissulaire, en particulier de tissu osseux [96].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 43 : Schéma représentant la localisation des cellules souches dentaires humains. Abréviations: DFPC, cellules progénitrices de follicules dentaires ; DPSC, cellules souches de la pulpe dentaire ; PDLSC, cellules souches du ligament parodontal ; SCAP, cellules souches de la papille apicale ; SHED, cellules souches de dents déciduales exfoliées. D'après Botelho 2017 [97].*

### **3.3.2. Les cellules souche d'origine pulpaire (DPSC)**

En 2000, Gronthos et son équipe ont signalé pour la première fois la présence de CSM dans la pulpe dentaire de la 3e molaire [98], les dental pulp stem cells (DPSC). Ils ont démontré que ces cellules présentaient une forme de fibroblaste typique et un modèle d'expression de marqueurs protéiques similaires aux CSM de la moelle.

Les tissus dentaires sont des tissus spécialisés qui ne subissent pas de remodelage continu comme le montre le tissu osseux; par conséquent, les cellules souches/progénitrices dérivées de tissus dentaires peuvent être plus engagées ou restreintes dans leur pouvoir de différenciation par



rapport à des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BMMSC).

Pour autant, les études ont démontré que les DPSC possèdent un pouvoir prolifératif plus intéressant que les BMMSC, elles ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, odontoblastes, chondroblastes, myoblastes et neuroblastes et elles sont en mesure de fabriquer un tissu osseux et dentinaire comparable à celui obtenu in situ (Tableau 3).

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales propriétés des cellules souches d'origine dentaire. D'après Huang et al. 2009 [97]*

Pour autant, les DPSC ne prolifèrent pas aussi rapidement que les cellules souches issues des dents déciduales exfoliées (SHED) (Figure 44) [99]. De plus, les DPSC ne sont pas en mesure de fabriquer de cément et un ligament parodontal contrairement aux cellules souches issues de la papille apicale (SCAP) et du ligament parodontal (PDLSC). Nous savons par contre que les DPSC peuvent se différencier *in vitro* en plusieurs lignées cellulaires, comprenant toutes les lignées de tissu conjonctif et certaines lignées de cellules neurales.

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 44 : Morphologie cellulaire et unités formatrices de colonies de SHED et de DPSC. Une incisive médiane temporaire exfoliée et (E) une première prémolaire extraite. Morphologie cellulaire de (B) SHED et (F) DPSC (40T). Unités formant colonie pour (C et D) SHED et (G et H) DPSC adultes. (I) Le graphique indique une différence statistiquement significative du nombre total de colonies entre SHED et DPSC. (\*\*  $p < 0,01$ ). Barre d'échelles = 50  $\mu$ m. D'après Wang et al. 2012 [100].*

### **3.3.3. Leur intérêt dans la régénération osseuse**

Au cours de la dernière décennie, les DPSC et SHED ont été étudiés en profondeur en médecine régénérative et ont montré des capacités thérapeutiques étonnantes dans la dystrophie oro-faciale, neurologique, cornéenne, cardiovasculaire, hépatique, diabétique, rénale et musculaire et les conditions auto-immunes chez l'animal et l'homme [101].

En effet, chez l'animal, dans des défauts pariétaux de rat, De Mendonca Costa et al., [102] et Chamieh et al., (Figure 44) [103] ont étudié le

potentiel des DPSC ensemencées dans un hydrogel de collagène pour accélérer le processus de cicatrisation de l'os crânio-facial. Les résultats mettent en évidence une densité minérale osseuse et des paramètres micro-architecturaux osseux significativement supérieurs en présence de mDPSC [102, 103]. L'enrichissement de SHED dans des défauts mandibulaires chez le cochon nain ont également permis d'améliorer significativement la réparation des défauts mandibulaires de taille critique [104].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 45 : Réparation osseuse crânio-faciale à J35 après comblement à l'aide d'un hydrogel collagénique dense. Analyse micro-CT à J35. A gauche : Image micro-CT montrant une cicatrisation osseuse améliorée dans un défaut de calvaria comblé à l'aide d'un hydrogel de collagène dense cellularisé (#) par rapport à un défaut comblé avec un hydrogel acellulaires (¶). Au centre : Histogramme montrant la significative augmentation de volume osseux néoformé dans un défaut comblé avec un hydrogel cellularisé. A droite : Coloration Von Kossa révélant l'augmentation de surface osseuse régénérée dans un défaut ayant reçu un hydrogel cellularisé. D'après Chamieh et Collignon, 2016 [103].*

Chez l'homme, dans des défauts mandibulaires, les études mettent également en évidence que la présence de DPSC associées à une matrice de collagène favorise significativement la réparation osseuse [105]. En effet, à trois ans, les résultats révèlent un os alvéolaire compact qui confère une rigidité mandibulaire très satisfaisante [106].

### **3.4. Conclusion**

Les bénéfices apportés par l'enrichissement d'un hydrogel collagénique avec des MCS dans la régénération osseuse a été mise en évidence à travers une littérature riche et bien menée. Parallèlement à ces découvertes, l'usage exponentiel des anticorps monoclonaux, et en particulier celui capable de neutraliser la sclérostine, semble être une voie prometteuse dans la modulation du métabolisme osseux en activant la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Il nous a donc semblé naturel de vouloir combiner ces deux approches afin de potentialiser la vitesse de la réparation osseuse et la qualité du tissu minéralisé néoformé.

# Objectifs de la thèse

---

*« Il n'est pas de vent favorable pour celui qui ne sait où il va »*

*Sénèque*

La synthèse bibliographique a, d'une part, démontré l'intérêt de la suppression du gène *SOST* et de l'inhibition de la sclérostine, par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal anti-sclérostine, dans la voie d'activation de la formation osseuse. D'autre part, la revue de littérature a permis de mettre en évidence que l'association d'un hydrogel collagénique dense enrichi de cellules DPSC permet d'améliorer la réparation osseuse crânio-faciale. Cependant, aucune étude n'a évalué l'intérêt de la suppression du gène *SOST* et l'inhibition de la sclérostine dans l'amélioration de l'efficacité d'une stratégie d'ingénierie tissulaire, faisant appel à un hydrogel collagénique dense enrichi de DPSC, pour traiter les défauts osseux crânio-faciaux.

Dans ce contexte, mon projet a eu pour but d'identifier le bénéfice de la suppression du gène *SOST* et de la neutralisation de la sclérostine dans la réparation osseuse crânio-faciale. Mon travail de thèse s'est donc déroulé autour de ces deux axes de recherche qui ont donné lieu à deux séries expérimentations.

Dans la première expérimentation, nous avons utilisé des souris *Sost* Knock out (KO) afin de définir si un déficit total en sclérostine améliorerait la formation osseuse au sein d'un défaut pariétal de taille critique. Ces défauts ont soit été laissés vides ou comblés avec des hydrogels collagéniques denses ensemencés de mDPSC issues de souris *Sost* KO ou de souris WT. Ensuite, nous avons utilisé les résultats obtenus dans la première expérimentation pour leur trouver une application clinique potentielle. Nous avons donc, dans une seconde expérimentation, utilisé des souris WT présentant les mêmes défauts osseux et des conditions de comblement identiques à la première expérimentation pour déterminer si ces souris soumises à un traitement systémique Scl-Ab présentaient une réparation osseuse augmentée en comparaison à des souris WT sans traitement (placebo).

## **Deuxième partie : Travaux et résultats expérimentaux**

---

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de  
l'information »*

*Albert Einstein*

# Résumé : Impact de la suppression de la sclérostine dans la régénération osseuse crânio-faciale

Les défauts osseux crânio-faciaux sont une préoccupation majeure en chirurgie reconstructive car ils conduisent à des troubles fonctionnelles, esthétiques et psychologiques majeurs. Dans le contexte de défauts osseux de taille importante, la chirurgie plastique fait appel au lambeau libre autologue qui est pédiculé et prélevé par section du site donneur puis rebranché par anastomose au site receveur. En 2020, cette technique de référence présente de nombreux inconvénients qui justifient le développement de stratégies d'ingénierie tissulaire capables de fournir des substituts associant matrice ostéoconductrice, des cellules souches et des facteurs de signalisation afin de reproduire le plus fidèlement possible le tissu naturel à remplacer.

Pour répondre aux exigences de l'ingénierie tissulaire, nous avons choisi d'utiliser un modèle expérimental déjà validé au sein de notre laboratoire, combinant un hydrogel de collagène dense avec des cellules mésenchymateuse/stromales originaires de la pulpe dentaire issues de molaire de souris (mDPSC). L'essor récent des travaux portant sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine indiquent que la sclérostine et le gène *SOST* la codant, sont des éléments clés dans la réparation osseuse. Cependant, aucune étude n'a évalué l'intérêt de la suppression du gène *SOST* et l'inhibition de la sclérostine dans l'amélioration de l'efficacité d'une stratégie d'ingénierie tissulaire pour traiter les défauts osseux crânio-faciaux.



Dans ce contexte, mon projet avait pour but d'identifier le bénéfice de la suppression du gène *SOST* ou de la neutralisation de la sclérostine grâce à un anticorps anti-sclérostine (Scl-Ab) dans la réparation osseuse crânio-faciale. Mon travail de thèse s'est donc déroulé autour de ces deux axes de recherche qui ont donné lieu à deux séries d'expérimentation.

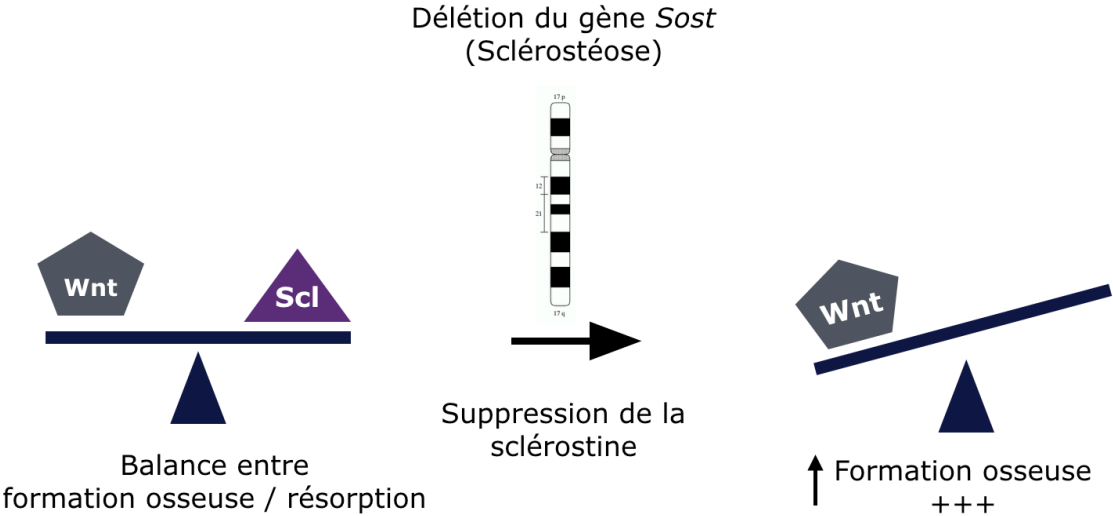
Dans la première série, nous avons utilisé des souris *Sost* Knock-out (KO) afin de définir si une déficience totale en sclérostine améliorerait la formation osseuse au sein d'un défaut pariétal de taille critique traité dans des conditions expérimentales avec des hydrogels de collagène denses ensemencés de mDPSC issues de gerles de souris *Sost* KO ou WT. Ensuite, nous avons traduit les résultats obtenus dans la première expérimentation pour leur trouver une application clinique potentielle.

Dans notre deuxième série, nous avons utilisé des souris WT présentant des défauts osseux et des conditions de comblement identiques à la première expérimentation. Nous avons ainsi cherché à déterminer si ces souris soumises à un traitement systémique Scl-Ab présentaient une réparation osseuse augmentée en comparaison à des souris WT sans traitement (placebo).

Les résultats obtenus dans la première expérimentation mettent en évidence une réparation osseuse quantitativement et qualitativement meilleure chez les souris *Sost* KO et chez les souris WT ayant reçu un hydrogel enrichi de *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC. La deuxième expérimentation révèle que le traitement systémique Scl-Ab associé à notre modèle d'ingénierie tissulaire, la matrice collagénique dense cellularisée améliore significativement la réparation osseuse. En effet, la quantité et la densité d'os régénéré sont augmentées dans les défauts pariétaux comblés par des hydrogels enrichis en mDPSC chez les animaux traités par injection avec Scl-Ab.

En conclusion, nos travaux mettent en évidence le rôle d'une inhibition systémique et locale de la sclérostine dans la régénération osseuse via la régulation positive de l'activité des ostéoblastes. Cette découverte est pertinente pour des approches thérapeutiques visant à restaurer des défauts osseux crânio-faciaux de taille critique et valide l'intérêt de développer des substituts osseux enrichis localement d'anticorps neutralisant de la sclérostine.

# Chapitre 1 : Détermination de l'intérêt de la délétion du gène *Sost* dans réparation osseuse crânio-faciale



# 1. Introduction et objectifs

La revue bibliographique a permis de dresser l'état des connaissances lors du commencement de ce travail. Il est cependant nécessaire de rappeler certaines notions propres à l'objectif fixé ici.

Les maladies hyperostotiques telles que la sclérostéose et la maladie de Van Buchem, sont dues à des mutations du gène *SOST*, qui code pour la sclérostine, une glycoprotéine impliquée dans la voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. La sclérostine, sécrétée principalement par les ostéocytes, s'est avérée être un puissant inhibiteur de la formation osseuse par l'inhibition de la voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie est activée suite à la liaison de l'une des protéines Wnt et régulée à la baisse après interaction avec la sclérostine [107, 108] et le récepteur 5/6 LRP [109-112]. L'accumulation de preuves a révélé que la suppression de la sclérostine, via la délétion du gène *Sost*, permet de promouvoir la cicatrisation osseuse d'une fracture ou d'un défaut fémoral de taille critique dans des modèles de rongeurs normaux et pathologiques.

Au cours de la dernière décennie, les cellules souches mésenchymateuses/stromales (CSM) ont suscité un intérêt considérable pour leur potentiel de régénération tissulaire auprès des cliniciens et des chercheurs [113]. En effet, leur accessibilité, leur stabilité génomique, leur forte expansion in vitro, leur potentiel de différenciation et leur acceptabilité éthique en font de bonnes cellules souches candidates pour l'ingénierie tissulaire. Les MSC dérivées de la pulpe dentaire (DPSC) sont plus particulièrement considérées comme une source cellulaire attractive pour la régénération de l'os crânio-facial en raison de leurs propriétés commune aux MSC, de leur accès facile, de l'approche moins invasive lors de leur extraction [114-116], de leur origine embryologique identique [98, 117] et leur grande capacité de prolifération et de différenciation [118]. Des

preuves récentes ont placé les DPSC comme candidates idéales pour l'enrichissement de substituts osseux crânio-faciaux [103, 119, 120].

Une grande variété de biomatériaux a été utilisée comme matrice cellulaires pour des approches d'ingénierie tissulaire osseuse, y compris des hydrogels à base de polymères naturels tels que le collagène de type I [121, 122]. Pour compenser le manque inhérent de cohérence structurelle de l'hydrogel de collagène, une «compression plastique» a été proposée pour augmenter la densité fibrillaire relative [83, 123], résultant en une densité similaire au tissu ostéoïde [81, 124]. Soutenant l'intérêt de cette approche, notre équipe a mis en évidence le potentiel ostéogénique des hydrogels de collagène dense ensemencés de DPSC lorsqu'ils sont implantés dans des défauts pariétaux murins [125, 126].

Dans cette première expérimentation, nous souhaitons déterminer si la carence en sclérostine chez les souris *Sost* knock out (KO) améliore la formation osseuse au sein de défauts pariétaux comblés avec des hydrogels de collagène denses enrichis de *Sost* KO mDPSC ou WT mDPSC.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Design de l'étude**

Dans cette première expérience (Figure 46), un défaut de taille critique de 3.5 mm a été chirurgicalement créé dans l'os pariétal chez des souris mâles *Sost* KO âgées de 10 semaines (n = 40) et des souris de type sauvage (WT) (n = 40).

Les défauts étaient soumis aux conditions suivantes :

- laissés vides (pas de collagène-hydrogel),
- comblés avec un collagène-hydrogel acellulaire,

- comblés avec un collagène-hydrogel ensemencé avec des mDPSC issues de souris WT (WT mDPSC),
- comblés avec un collagène-hydrogel ensemencé avec des mDPSC issues de souris *Sost* KO (*Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC).

Souris mâles âgées de 10 semaines : n = 80  
 2 groupes: mutants *Sost* KO et souris WT  
 4 conditions expérimentales par groupe

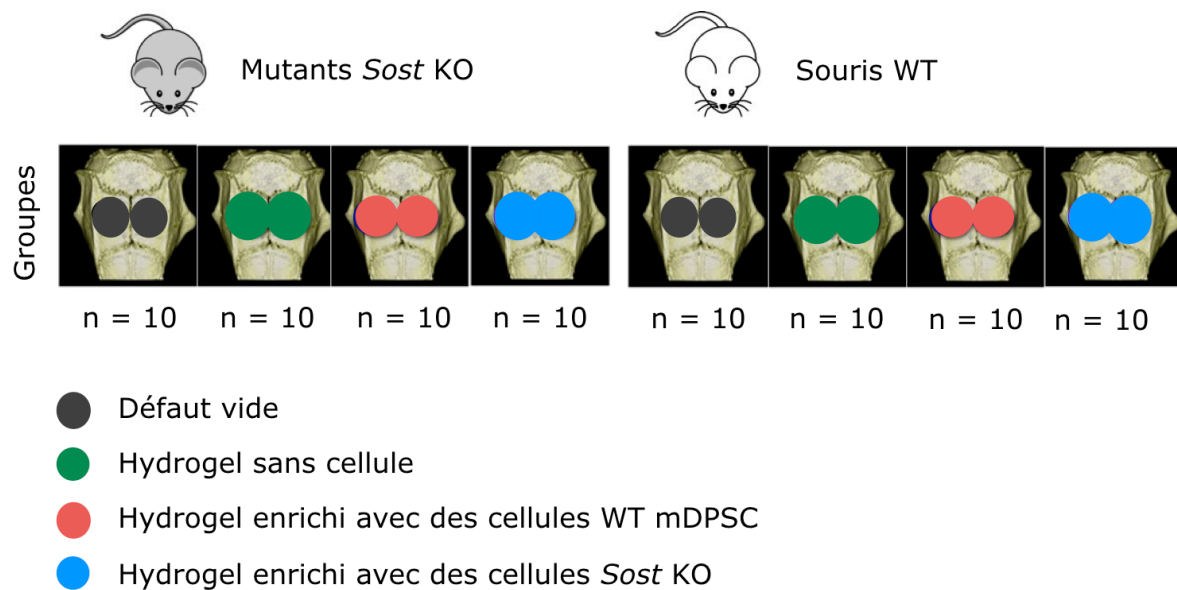


Figure 46: Schéma représentant la répartition des conditions expérimentales dans les deux lignées de souris, mutante *Sost* KO et WT.

Le suivi de l'évolution de la réparation osseuse a pu se faire à l'aide de l'analyse par tomodensitométrie par micro-rayons X (micro-CT) à 1 et 2 mois. Les animaux ont été sacrifiés à 2 mois afin de réaliser l'analyse par microscopie de seconde harmonique (SHG), l'analyse histologique et l'histomorphométrie (Figure 47).

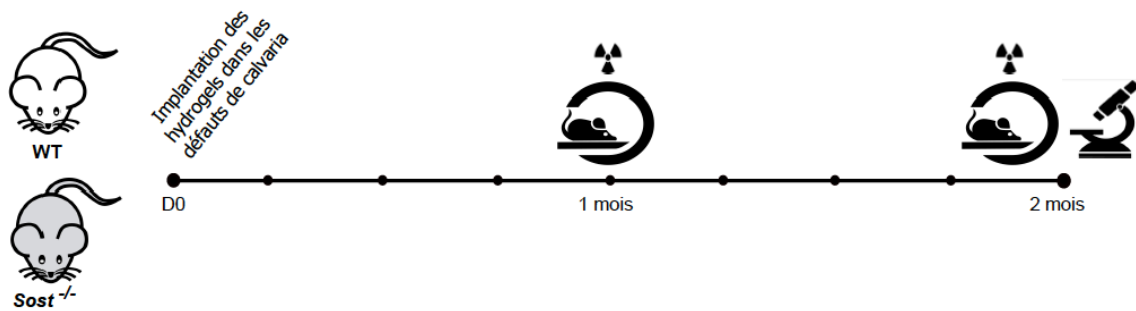


Figure 47 : Schéma représentant le déroulement de l'expérimentation.

## 2.2. Isolement et culture de cellules souches issues de la pulpe dentaire de souriceaux WT ou *Sost* KO

Des cellules souches (Figure 48) issues de la pulpe dentaire de souris dérivées de plusieurs colonies (mDPSC) ont été obtenues à partir des molaires de souriceaux *Sost* KO et WT âgés de 3 jours postnatals (PN3) en utilisant un protocole adapté de [99]. Les cellules isolées ont ensuite été cultivées dans des flasques T75 cm<sup>2</sup> enduits de gélatine à 0,1% dans le Minimum Essential Media-alpha (Gibco) supplémenté avec 20% v/v de sérum bovin fœtal (FBS) (Gibco) et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco) , 2,5 ng/ml de FGF-2 (PeproTech, Neuilly-Sur-Seine France), 10 ng/ml de BMP-2 (PeproTech), et maintenu à 37 ° C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé au bout de 2 jours, puis deux fois par semaine. Le nombre de cellules requis pour les expériences *in vivo* a été atteint après 2-3 passages.

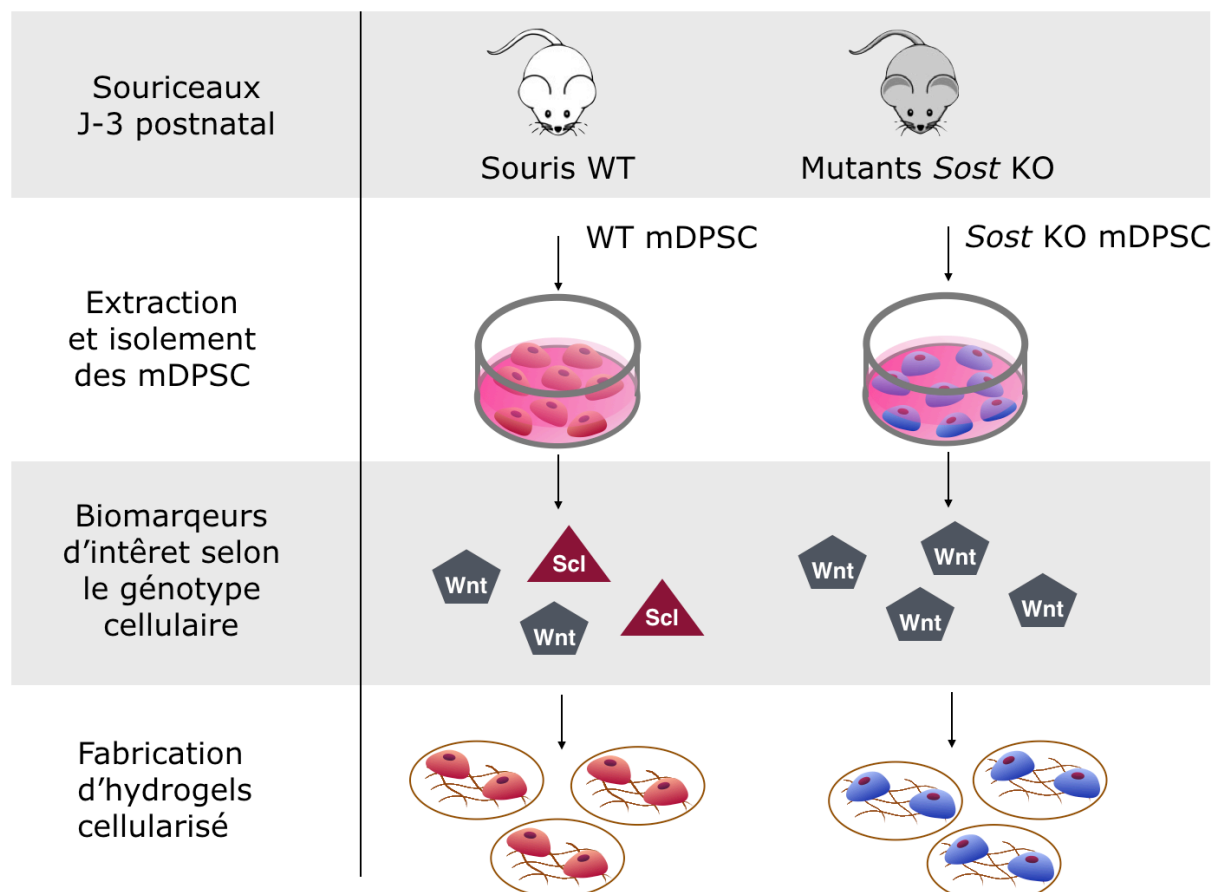


Figure 48 : Schéma représentant les étapes qui suivent l'extraction des cellules mDPSC chez les souriceaux âgés de 3 jours.

### 2.3. Préparation de l'hydrogel collagénique dense enrichi de cellules mDPSC

Des gels de collagène compressés plastiquement (Figure 49) ont été utilisés comme échafaudages 3D [83, 127]. Pour cela, du collagène de queue de rat stérile de type I (First Link Ltd., Wolverhampton, Royaume-Uni) a été mélangé avec du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) et neutralisé par du HCO<sub>3</sub> et du NaOH [128]. Après neutralisation, les mDPSC ont étéensemencées à une densité de 2.000.000 cellules/ml. Après gélification (30 min à 37 ° C), les hydrogels hautement hydratés ont été placés sur une pile de papier buvard, de nylon et de mailles en acier inoxydable. Puis ils ont



été soumis à une contrainte de compression non confinée de 1 kPa pendant 5 min pour éliminer l'excès de fluide de coulée. Les hydrogels compressés ont été coupés circulairement (4 mm de diamètre) et maintenus 24 h à 37 ° C sous 5% de CO2 dans un milieu sans sérum avant l'implantation [129].

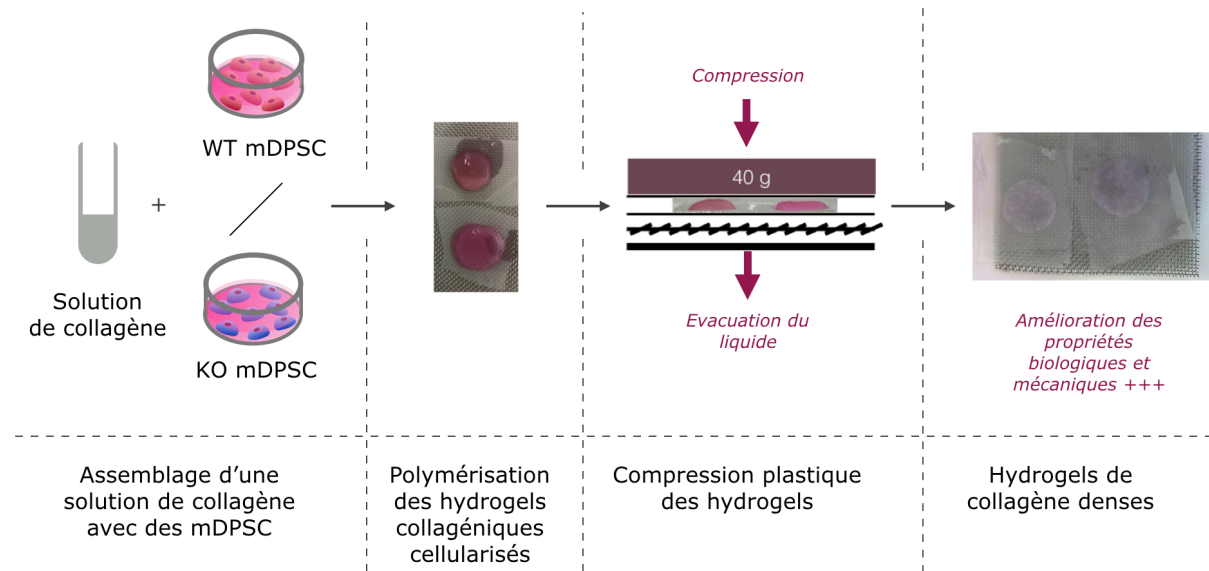


Figure 49 : Schéma représentant les principales étapes de fabrication d'hydrogels collagéniques compressés enrichis de cellules mDPSC.

## 2.4. Implantation chirurgicale

Après anesthésie, la peau du cuir chevelu des souris âgées de 10 semaines a été incisée et le périoste a été éliminé pour visualiser le crâne. Un défaut pariétal de taille critique de 3,5 mm de diamètre a été créé de chaque côté de part et d'autre de la suture sagittale à l'aide d'un trépan sous irrigation. Un soin particulier a été apporté à la préservation de la suture sagittale et à une invasion minimale de la dure-mère. Après avoir retiré délicatement le tissu osseux circulaire, un hydrogel de collagène denseensemencé ou non de mDPSC a été implanté dans un défaut osseux. Chaque animal a été réparti au hasard par cage et par groupe. La fermeture de la plaie a été réalisée par une suture (périoste, peau) résorbables. Les soins

postopératoires immédiats comprenaient une analgésie à la buprénorphine (0,02 mg/kg de poids corporel). La cicatrisation des plaies a progressé sans aucun signe d'infection, d'exposition du matériel ou autre complication. Les poids corporels ont été examinés régulièrement pour assurer une alimentation adéquate avant et après la chirurgie.



Figure 50 : Photographies représentant les étapes chirurgicales lors de l'implantation des hydrogels dans des défauts pariétaux.

## 2.5. Examen des échantillons par tomодensitométrie par micro-rayon X

Après anesthésie, les souris ont été imagées à l'aide la tomодentistométrie par micro-rayon X, la micro-CT (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA) présent dans la plateforme du laboratoire URP2496, Montrouge, France. Des images tridimensionnelles ont été acquises et enregistré sous un format DICOM. Avant la quantification, les images ont été réorientées à l'aide du logiciel DataViewer (Skyscan, version 1.5.2.4, Kontich, Belgique). Puis, un volume d'intérêt de forme cylindrique (3,5 mm de diamètre et 1 mm de hauteur) a été défini à l'aide du logiciel CT-Analyzer (Skyscan, version 1.13.5.1, Kontich, Belgique). La fraction volumique osseuse BV/TV (BV : volume osseux et TV : volume total sélectionné) (%) et la porosité totale (%) ont été utilisées pour quantifier et caractériser l'os

nouvellement réparé. L'os pariétal régénéré étant principalement un os compact, l'épaisseur trabéculaire Tb.Th (mm), le nombre trabéculaire Tb.N (1 par millilitre) et la séparation trabéculaire Tb.Sp (mm) n'ont pas été décrits en raison du fait que ces valeurs sont spécifiques à l'os trabéculaire [130].

## 2.6. Histologie et histomorphométrie

Des échantillons non décalcifiés obtenus à deux mois (n = 6 défauts par condition) ont été fixés dans de l'éthanol à 70% vol/vol (24 heures à 4 ° C) puis déshydratés [131] pour finalement être coupés (5 µm d'épaisseur) avant coloration. Ces coupes ont ensuite été colorées avec une coloration de Von Kossa ou traitées pour l'histochimie enzymatique de la phosphatase alcaline (ALP) et pour la révélation de la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) [125]. La coloration Von Kossa a été utilisée pour visualiser la quantité d'os minéralisé. TRAP a été détecté en utilisant de la pararosaniline hexazotisée (Sigma) et du phosphate de naphthol ASTR (Sigma, St Louis, MO) pour révéler l'activité des ostéoclastes; la phosphatase acide non ostéoclastique a été inhibée en ajoutant 100 mMol/L d'acide tartrique (Sigma, St Louis, MO) à la solution de substrat.

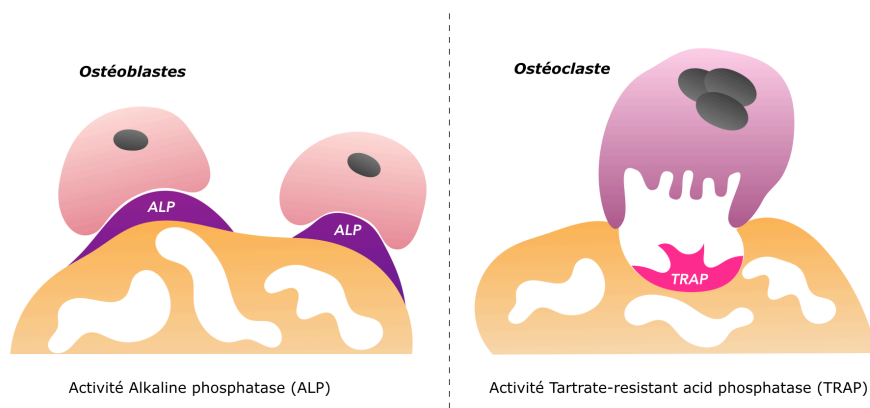


Figure 51 : Schéma représentant les activités enzymatiques explorés dans l'analyse de la fonctionnalité du tissu osseux régénéré.

## **2.7. Acquisition et quantification d'images**

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un scanner de lames multilabel Lamina (Perkin Elmer) présent sur la plateforme HistIM de l'Institut Cochin, Paris. La visualisation des images obtenus a été réalisée à l'aide du logiciel CaseViewer. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel de traitement d'images open source FijiJ (Fiji Is Just ImageJ) [132]. Six sections ont été analysées pour chaque échantillon.

## **2.8. Microscopie de seconde harmonique**

La microscopie de seconde harmonique (SHG) offre la possibilité d'imager et de quantifier le collagène sans coloration [133]. Les coupes ont donc été imagées sans préparation préalable par le microscope multiphoton Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) présent dans la plateforme IMAG'IC de l'Institut Cochin, Paris.

## **2.9. Analyses statistiques**

Les variables numériques sont exprimées sous forme d'erreur standard de la moyenne (S.E.M). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism version 7.04 (logiciel GraphPad, La Jolla, CA). La normalité de la distribution a été testée avec le test de normalité d'Agostino-Pearson et l'homogénéité de la variance a été testée avec le test-F de Fisher. Comme les données ne suivaient pas une distribution normale et que les variances étaient significativement différentes entre les groupes, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis permettant la comparaison entre plus de deux échantillons indépendants a été réalisé. Pour les expérimentations animales, le défaut calvarial a été considéré comme l'unité statistique. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ .

### 3. Résultats

#### 3.1. La suppression de la sclérostine via la délétion du gène *Sost* permet une formation osseuse plus importante

##### 3.1.1. Analyse par micro-CT

D'abord, chez l'animal WT à 1 et 2 mois, l'analyse micro-CT montre une quantité de d'os néoformé croissante au bord et au centre des défauts comblés par un hydrogel seul, un hydrogel enrichi de cellules WT ou de cellules KO (Figure 52).

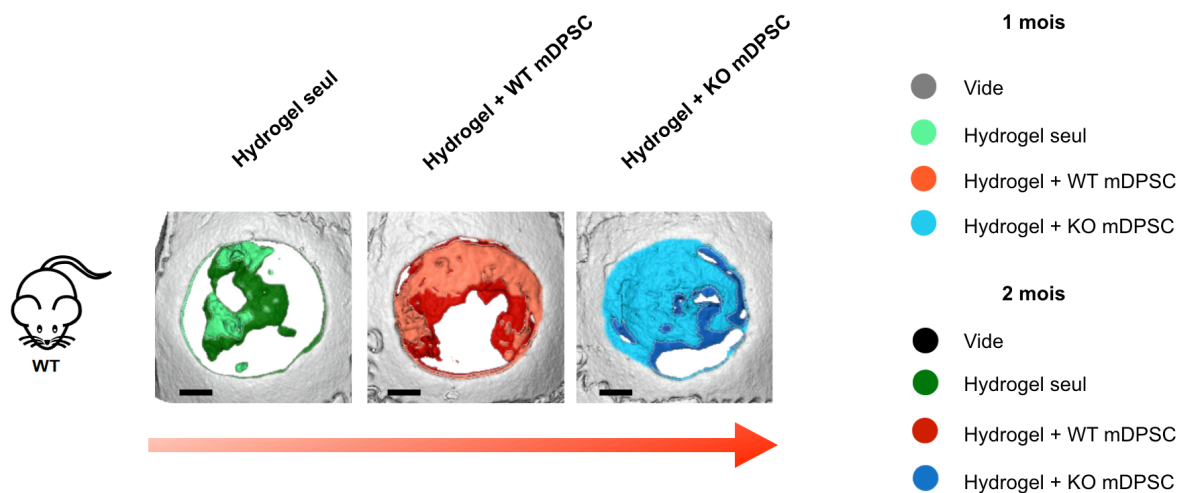


Figure 52 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez l'animal WT à 1 et 2 mois. La condition du défaut comblé par un hydrogel seul est en vert clair à 1 mois, vert foncé à 2 mois. La condition du défaut comblé par un hydrogel enrichi de WT mDPSC est en orange à 1 mois et en rouge à 2 mois. La condition du défaut comblé par un hydrogel enrichi de KO mDPSC est en bleu clair à 1 mois et bleu foncé à 2 mois.

Ensuite, à 1 et 2 mois, l'analyse quantitative réalisée à partir de l'imagerie micro-CT révèle que la fraction volumique osseuse (BV/TV) était significativement plus élevée dans les défauts créés chez les souris *Sost* KO par rapport aux souris WT pour l'hydrogel non cellularisé et l'hydrogel avec WT mDPSC (Figure 53).

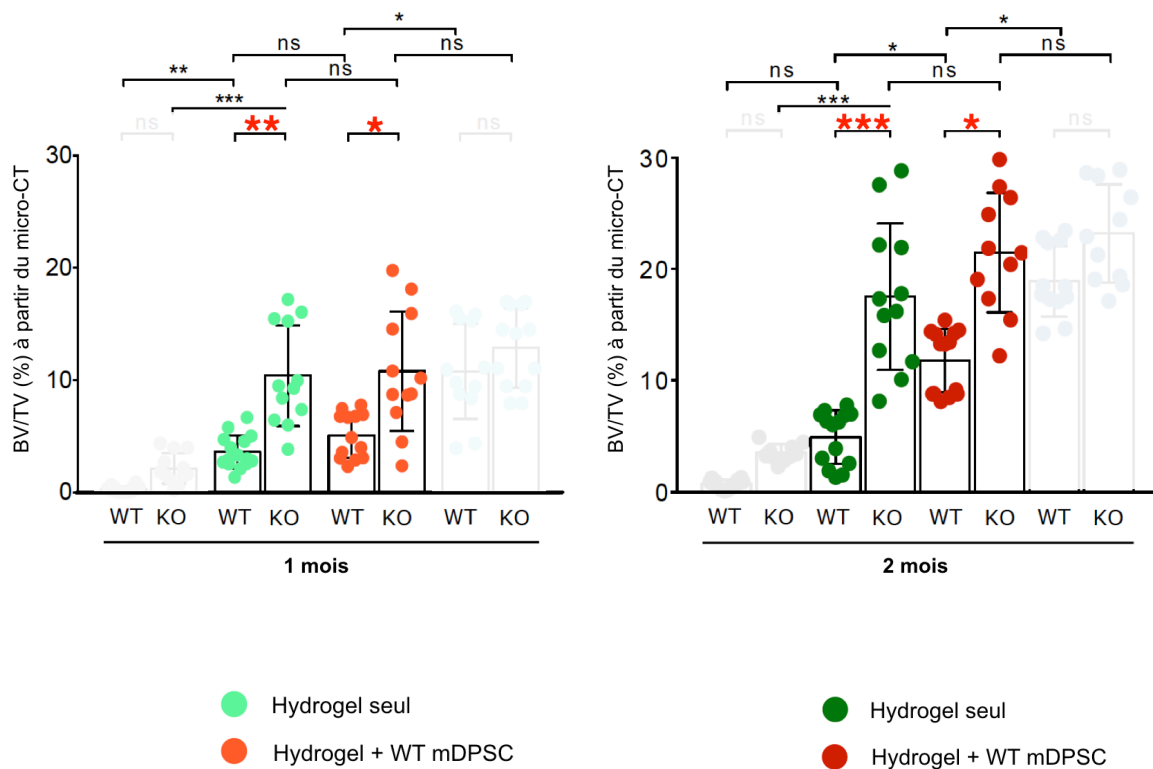


Figure 53 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissue volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitative des images réalisées par micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

Aussi, la comparaison intragroupe chez l'animal *Sost* KO n'a révélé aucune différence de réparation entre les défauts comblés avec un hydrogel seul, un hydrogel enrichi de WT mDPSC ou KO mDPSC (Figure 54).

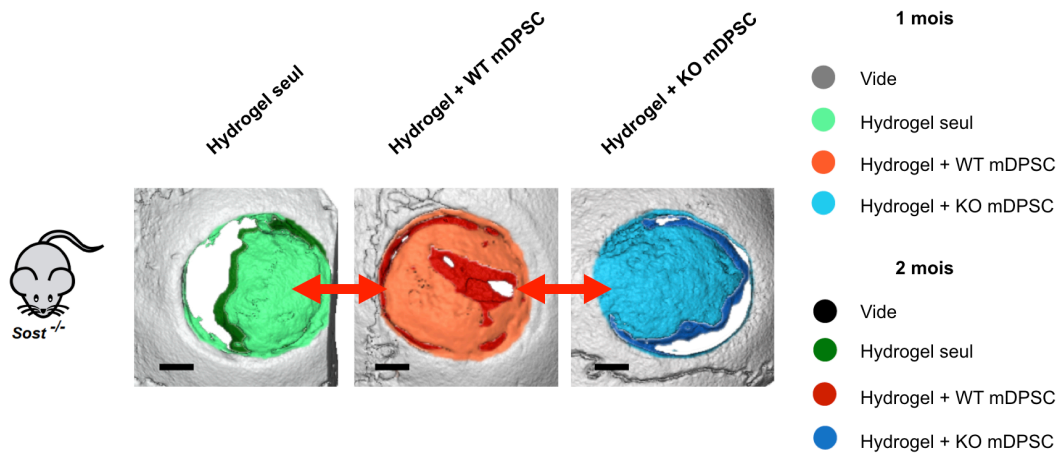


Figure 54 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez le mutant *Sost* KO à 1 et 2 mois.

L'analyse quantitative réalisée à 1 et 2 mois à partir de l'imagerie micro-CT confirme l'absence de différence significative entre chacune des conditions expérimentales chez le mutant *Sost* KO (Figure 55). Notons, en effet, que la présence de WT ou KO mDPSC n'a pas amélioré la formation osseuse chez les souris *Sost* KO par rapport à l'hydrogel non cellularisé.

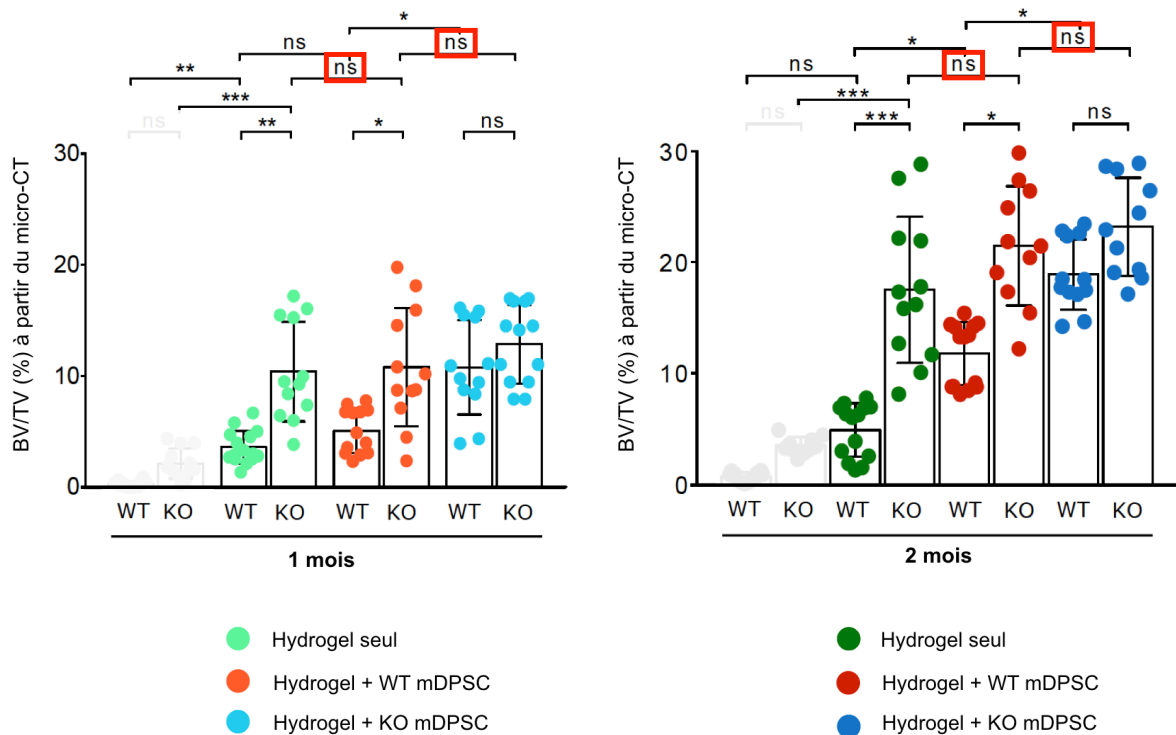


Figure 55 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitative des images réalisées par micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

De manière très intéressante, nous pouvons observer qu'à 1 et 2 mois, les défauts réalisés chez l'animal WT ou *Sost* KO ayant reçu des hydrogels enrichis de *Sost* KO mDPSC ne présente pas une quantité d'os néoformé significativement différente. En d'autre terme, la présence de *Sost* KO mDPSC au sein des hydrogels semble avoir le même potentiel ostéogénique que le fond génétique du mutant *Sost* KO (Figure 56).

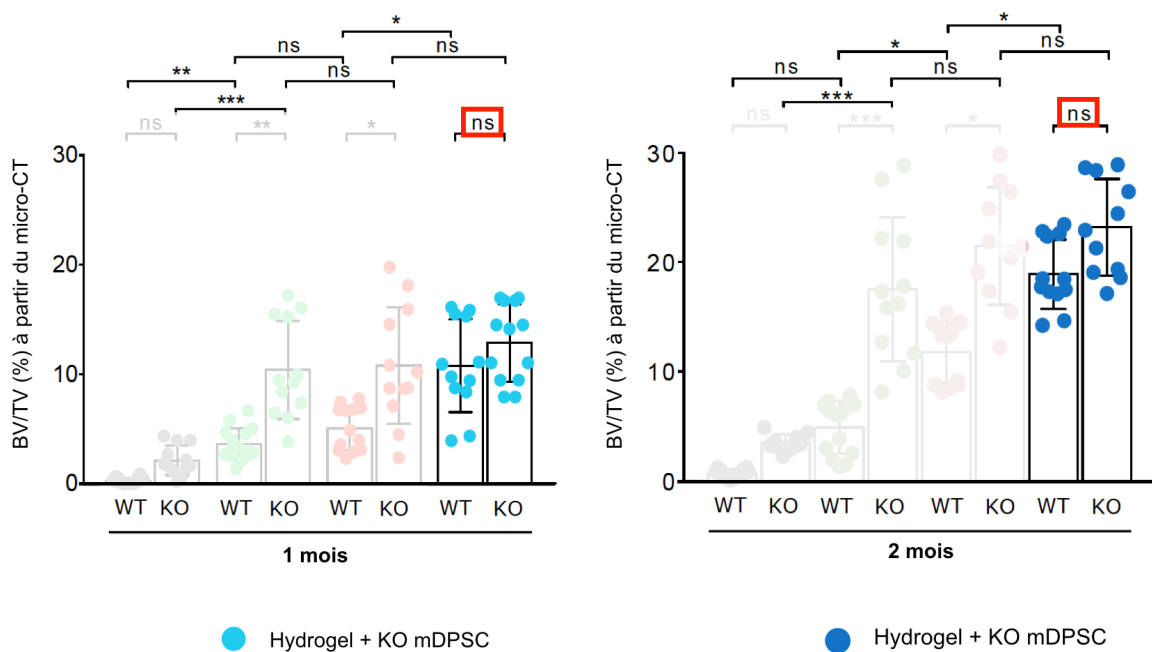


Figure 56 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitative des images réalisées par micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

Et finalement, les résultats révèlent qu'à 2 mois, les défauts pariétaux non comblés chez les souris WT et *Sost* KO restent vides (Figure 57). Ceci permet de valider le design de notre modèle de défaut critique chez les deux lignées de souris.



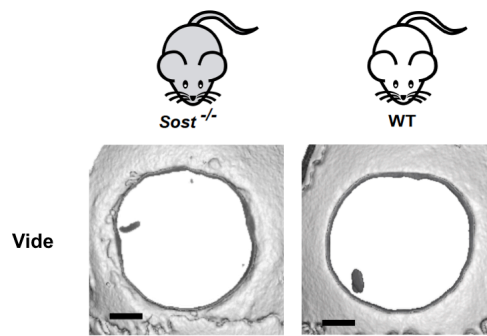


Figure 57: Schéma représentant la réparation osseuse au sein des défauts pariétaux laissés vide chez le mutant *Sost* KO et la souris WT.

### 3.1.2. Analyse par coloration Von Kossa

La quantification de la coloration Von Kossa réalisée à 2 mois a montré une formation de tissu minéralisé significativement plus élevée dans les défauts réalisés chez les souris *Sost* KO que ceux réalisés chez les souris WT dans toutes les conditions (Figure 58).

Il convient de noter que contrairement à notre analyse micro-CT, la comparaison intergroupe a montré que l'ajout de cellules *Sost* KO mDPSC améliorerait significativement le pourcentage de minéralisation dans les défauts chez le mutant *Sost* KO par rapport à ceux chez l'animal WT ( $P < 0,01$ ).

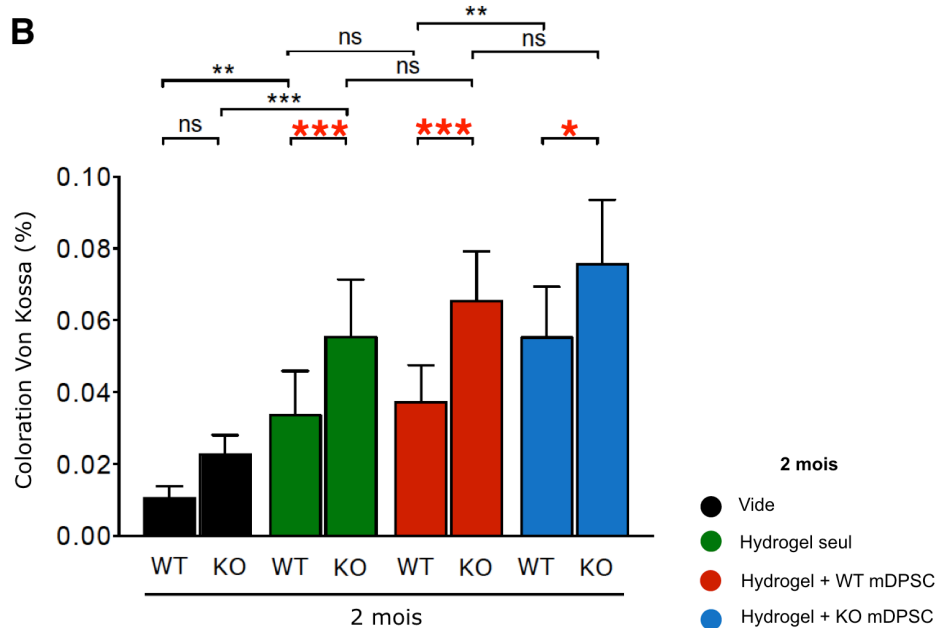
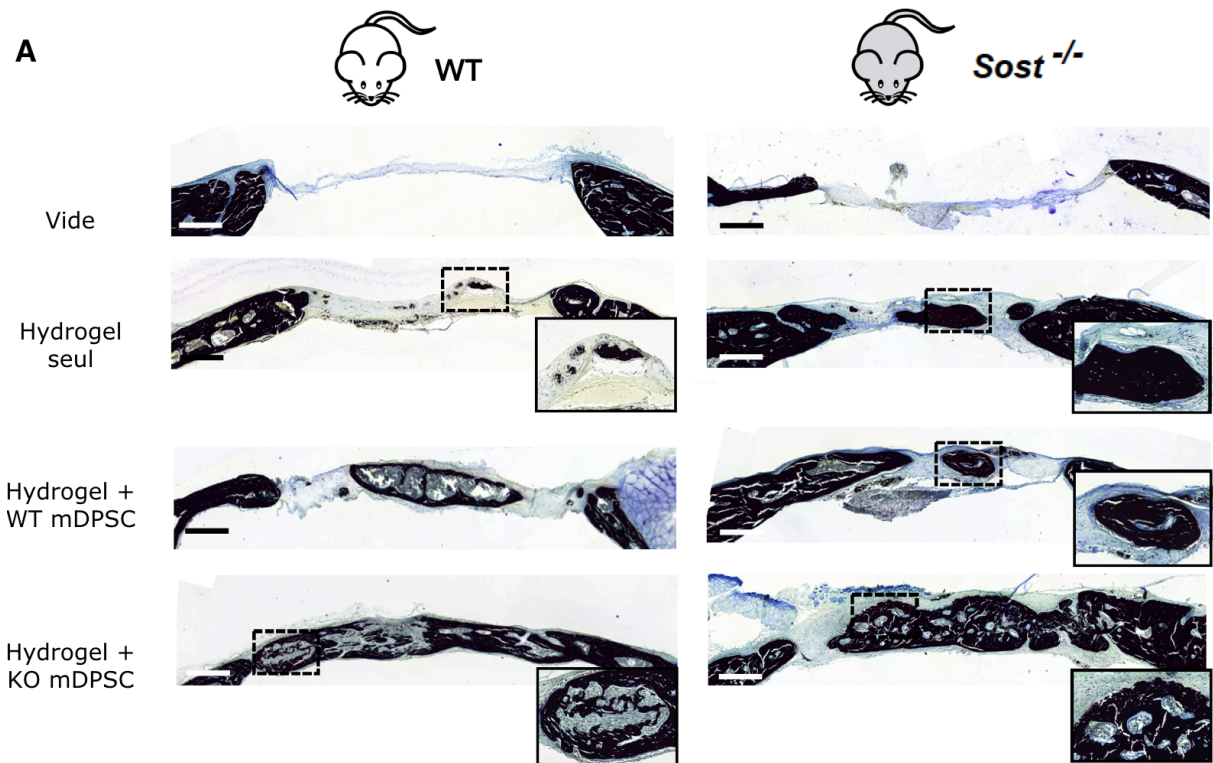


Figure 58 : Représentation des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT et  $Sost$  KO pour chaque condition. Images (A) représentatives de chaque condition expérimentale obtenues par microscopie optique (barre d'échelle : 400  $\mu$ m) . (B) Représentation graphique de la quantification du tissu minéralisé au sein des défauts pariétaux. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

### 3.2. La qualité de l'os nouvellement formé est améliorée dans un environnement dépourvu de Sclérostine

Nous avons étudié la qualité de l'os nouvellement formé à 2 mois en utilisant la SHG. Cette analyse nous permet d'observer des fibres de collagène bien organisées chez des souris *Sost* KO dans toutes les conditions. Cette observation est particulièrement frappante dans les défauts remplis d'hydrogels enrichis de *Sost* KO mDPSC. Cela semble également vrai dans les défauts WT remplis de *Sost* KO mDPSC, mais dans une moindre mesure (Figure 59).

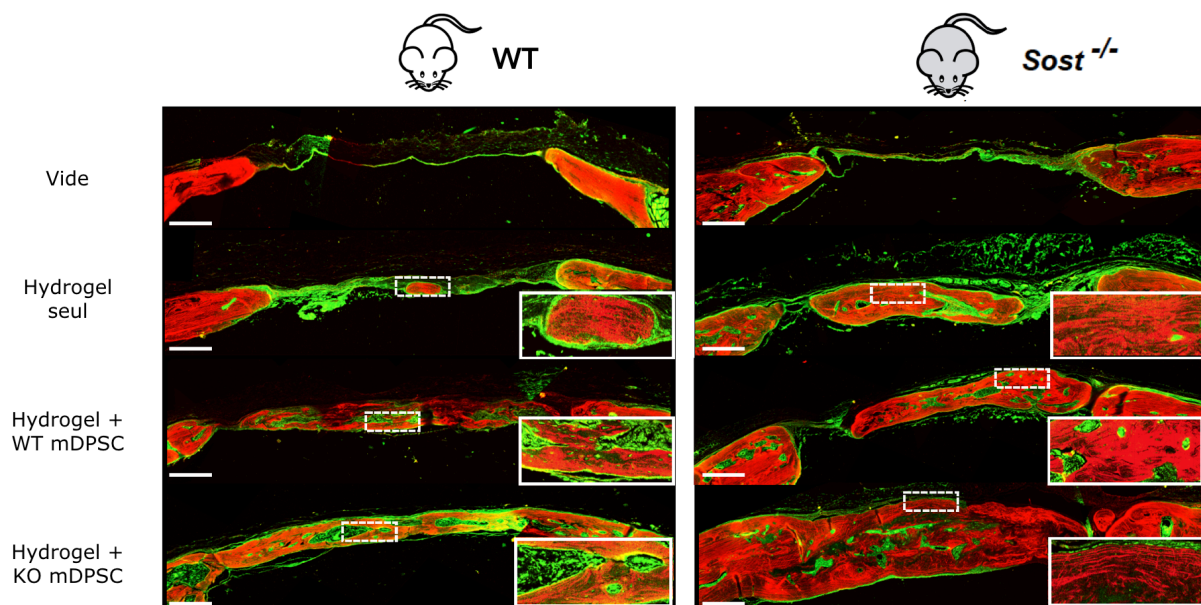


Figure 59 : Images représentatives de la microscopie seconde harmonique (SHG) révélant l'organisation des fibres de collagène. Les zones intéressantes ont été agrandies pour chaque condition. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

A l'appui de ces observations, l'analyse de la porosité osseuse (%) a été réalisée à partir des acquisitions micro-CT (Figure 60).

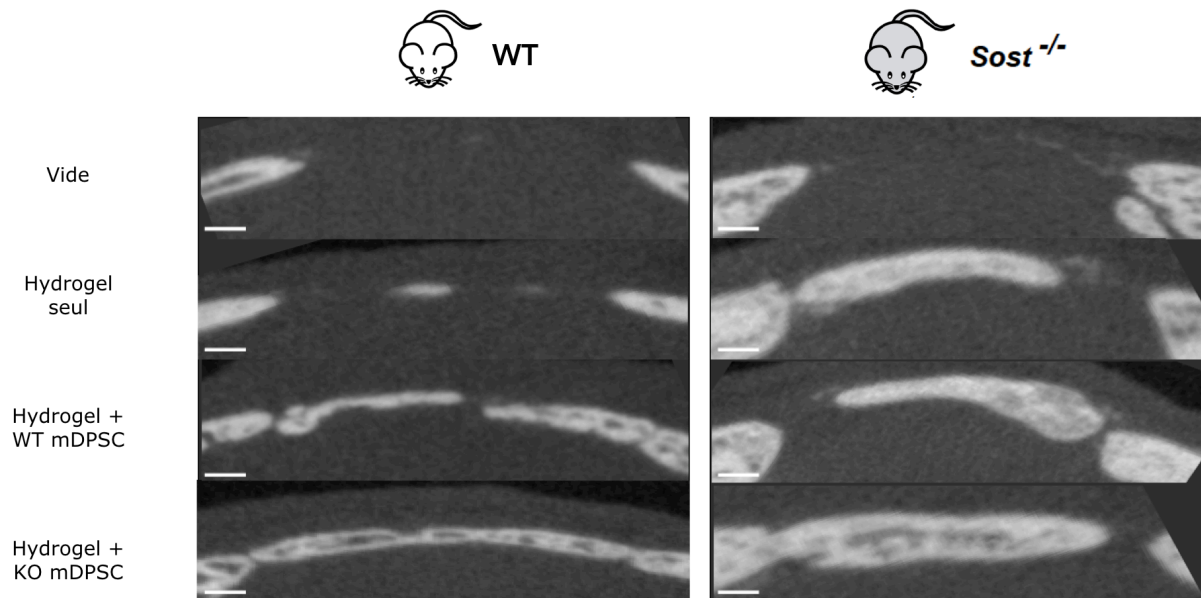


Figure 60 : Images radiographiques obtenues par micro-CT permettent d'apprécier la porosité osseuse nouvellement formée dans les défauts. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

Sa quantification, à 1 et 2 mois, a montré une porosité significativement plus faible chez les souris *Sost* KO comparée aux souris WT après implantation d'hydrogels non cellularisés et d'hydrogels ensemencés avec des WT mDPSC (Figure 61).

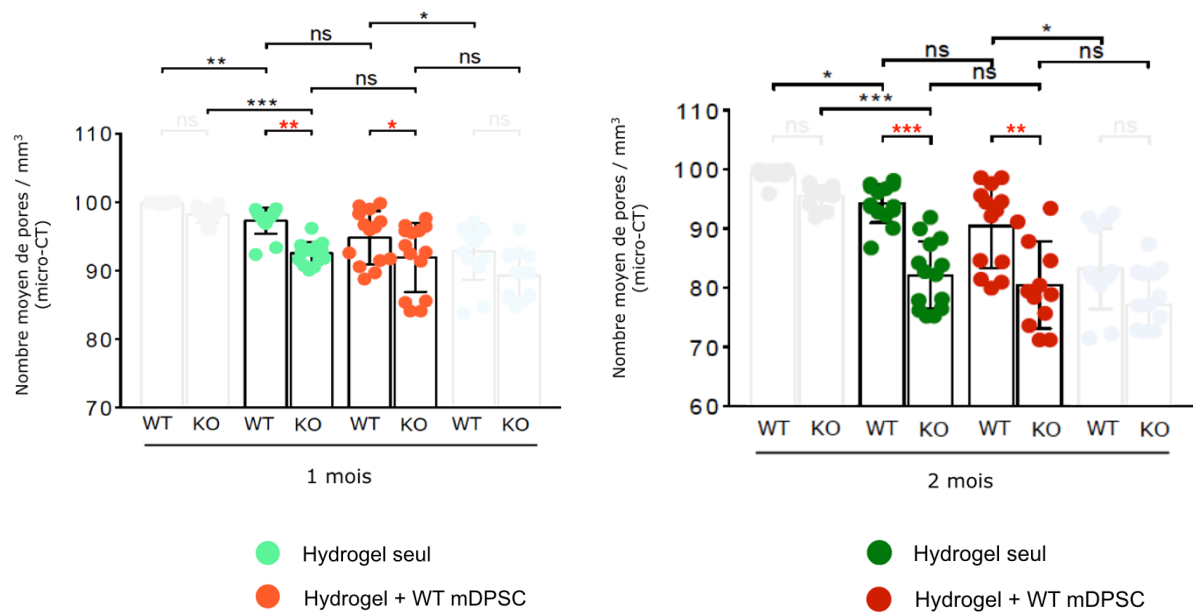


Figure 61 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT à 1 et 2 mois. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type :

ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

En revanche, aucune différence de porosité n'a été statistiquement mise en évidence entre des défauts réalisés chez l'animal WT et le mutant Sost KO en présence d'hydrogels enrichis avec des Sost KO mDPSC (Figure 62).

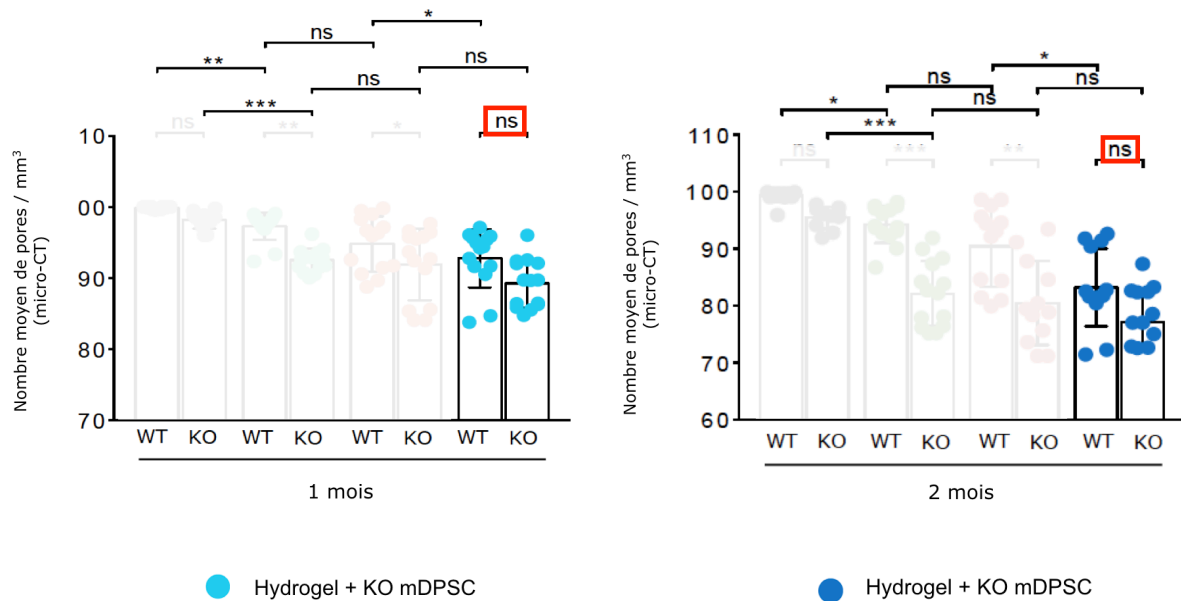


Figure 62 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

En outre, la comparaison intragroupe a révélé que, chez les souris WT, l'implantation de Sost KO mDPSC diminuait significativement la porosité osseuse par rapport aux WT mDPSC (Figure 63).

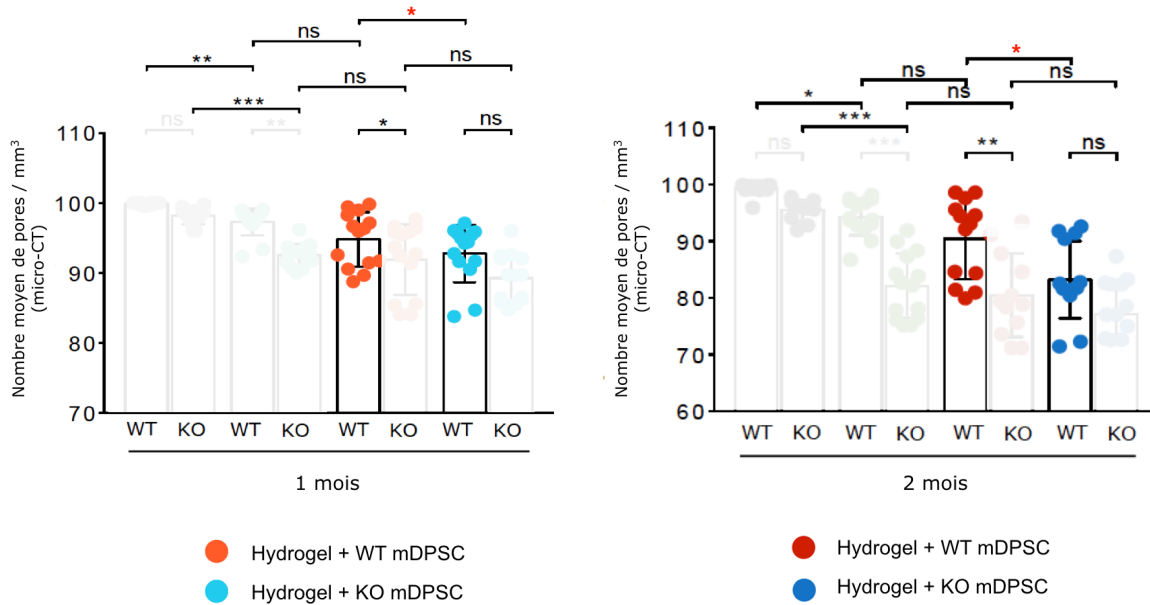


Figure 63 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

### 3.3. L'activité ostéoblastique est améliorée dans un environnement *Sost* KO

Nous avons également étudié, à 2 mois, le remodelage osseux dans les défauts en évaluant l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), qui reflète l'activité de formation osseuse par les ostéoblastes, et l'activité de la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP), qui reflète l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes.

L'activité ALP sur les coupes histologique semble être plus forte chez les souris *Sost* KO par rapport aux souris WT, mais cette observation n'est pas confirmée par la quantification de la coloration sauf pour le groupe « hydrogel non cellularisé » ( $p < 0,05$ ) (Figure 64).



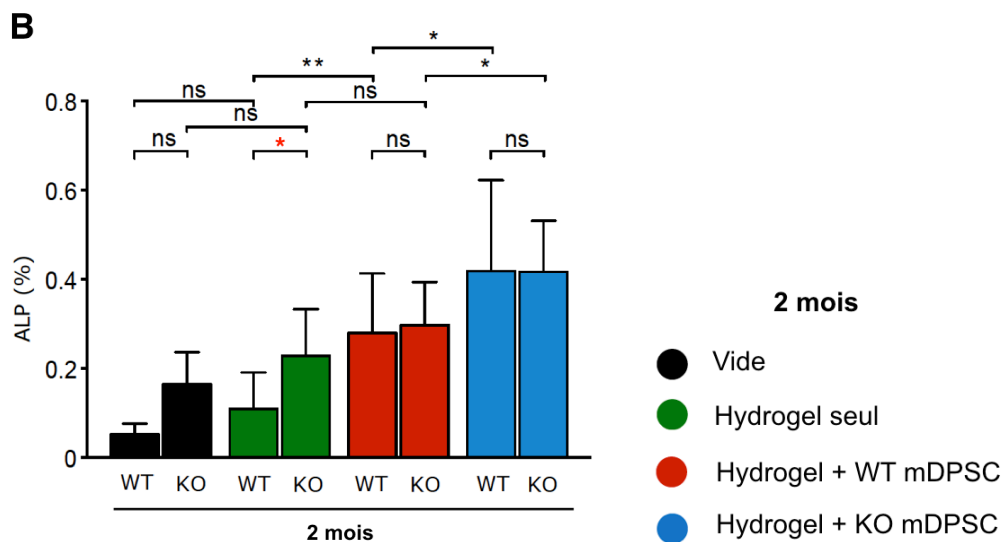
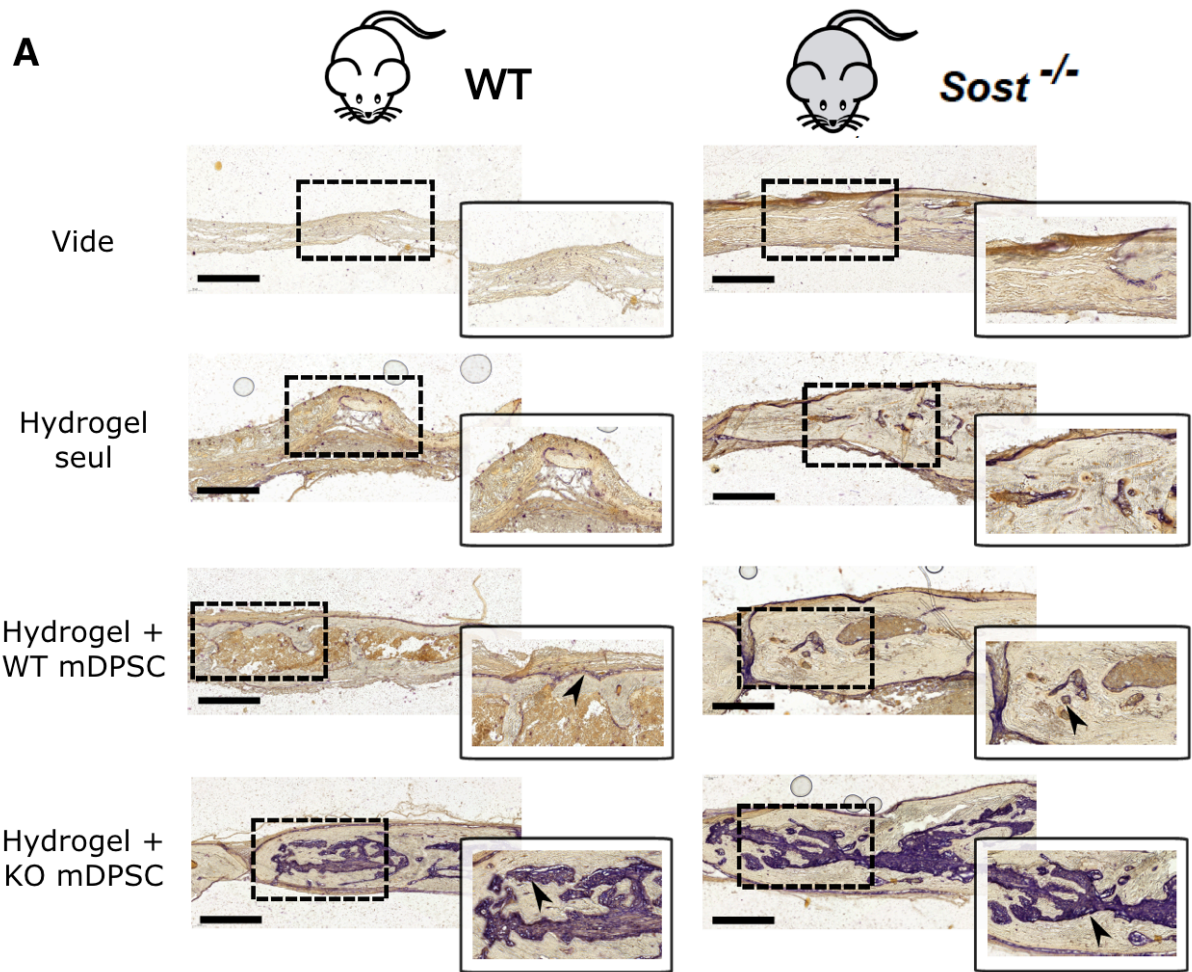
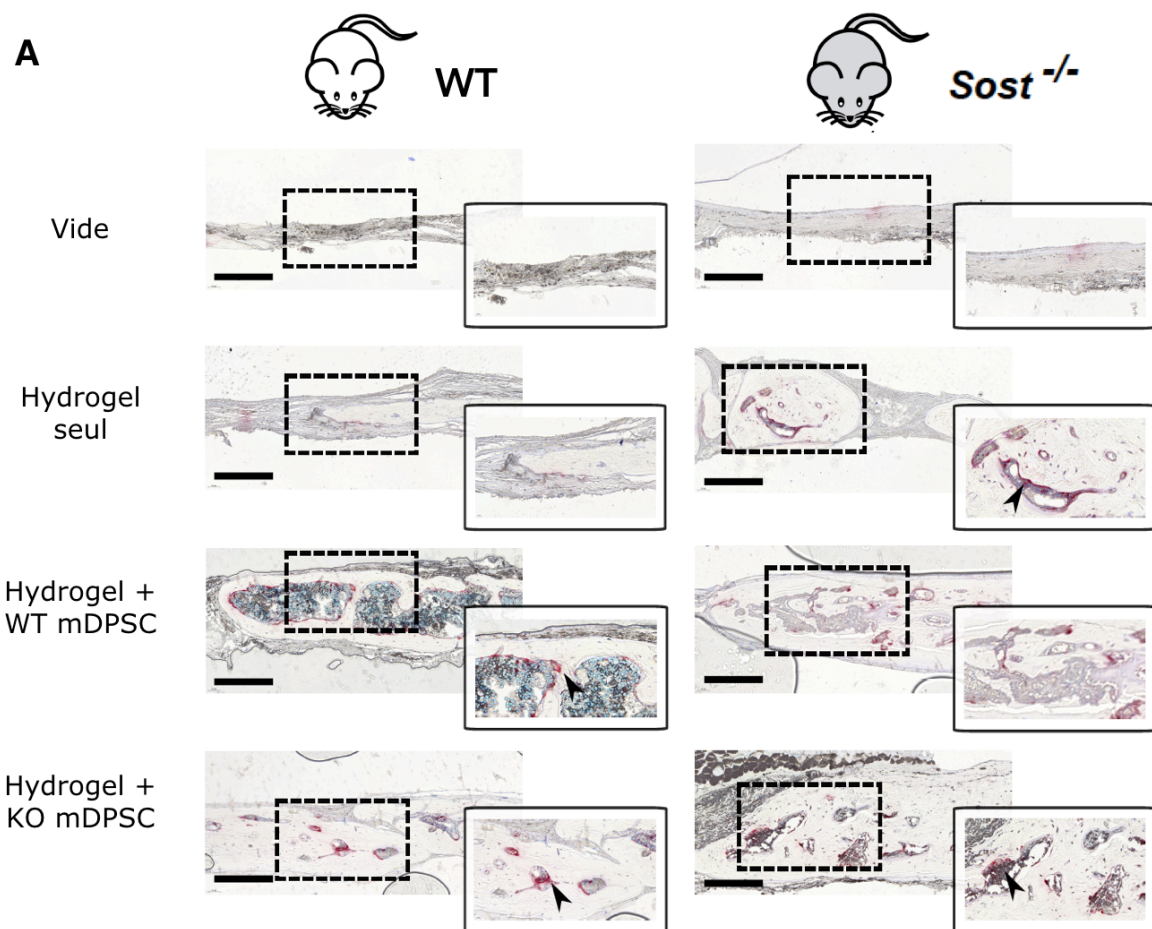


Figure 64 : Représentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) par les ostéoblastes au sein de l'os néoformé. (A) L'activité ALP semble être plus forte chez les souris  $Sost$  KO par rapport aux souris WT. Des agrandissements de zones d'intérêt ont été réalisés pour chaque condition. (B) La quantification de l'activité ALP ( $\mu\text{m}^2$ ) n'a pas soutenu une activité ALP significativement plus élevée chez les souris  $Sost$  KO par rapport aux souris WT. Barre d'échelle: 250  $\mu\text{m}$ . Les valeurs représentent la

moyenne  $\pm$  Ecart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

L'activité TRAP est apparue légèrement plus faible chez les souris KO par rapport à leurs homologues WT, mais la quantification n'a montré qu'une différence significative pour le groupe implanté avec des WT mDPSC ( $p < 0,05$ ) (Figure 65).





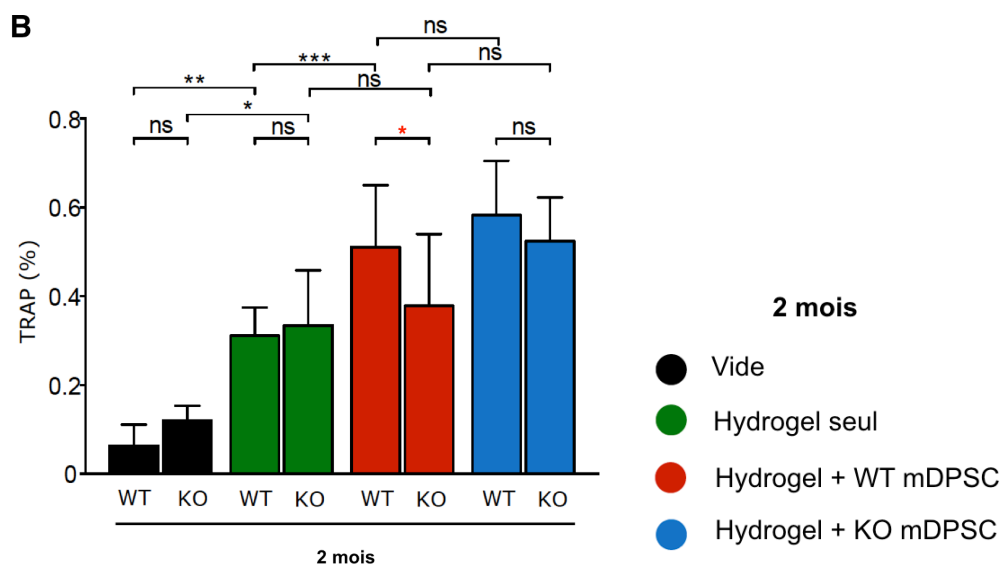
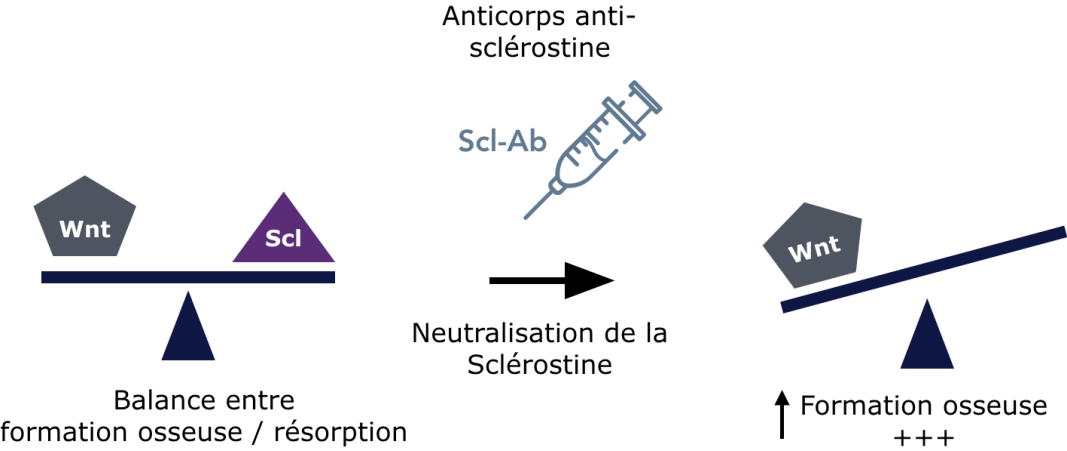


Figure 65 : Représentation de l'activité de la phosphatase acide ostéoclastique résistante au tartrate (TRAP) des ostéoclastes au sein de l'os néoformé. (A) Images de l'activité TRAP chez les souris WT et Sost KO dans des défauts comblés avec des hydrogel enrichis de WT et de Sost KO mDPSC. Des agrandissements de zones d'intérêt ont été réalisés pour chaque condition. L'activité TRAP est apparue légèrement plus faible chez les souris KO implantées avec des mDPSC par rapport à leurs homologues WT. (B) La quantification de l'activité TRAP ( $\mu\text{m}^2$ ) a montré une différence significative pour le groupe comblé avec des hydrogels enrichis de WT mDPSC. Barre d'échelle: 250  $\mu\text{m}$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  Ecart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

# Chapitre 2 : Proposition d'une stratégie thérapeutique visant à améliorer la réparation osseuse à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-sclérostine



# 1. Introduction et objectif

La revue bibliographique a permis de dresser l'état des connaissances lors du commencement de ce travail. Il est cependant nécessaire de rappeler ici également certaines notions propres à l'objectif de cette seconde expérimentation.

Les preuves *in vitro* et précliniques mettent en évidence l'influence de la délétion du gène *Sost* sur le comportement cellulaire en faveur de l'ostéogénèse. Ces résultats ont conduit à des investigations précliniques approfondies [15, 20, 134-136] et au développement de plusieurs anticorps capables de neutraliser la sclérostine. Leur évaluation dans plusieurs essais cliniques randomisés menés chez des femmes atteintes d'ostéoporose (Romosozumab et Blosozumab) [37-39], ou chez des patients atteints d'ostéogénèse imparfaite (Setrusumab-BPS-804) [41], a montré que l'administration systémique d'anticorps anti-sclérostine augmentait significative la densité de masse osseuse en favorisant la [112] différenciation des ostéoblastes tout en inhibant la formation d'ostéoclastes [112, 137]. Il a également été démontré que la neutralisation de la sclérostine améliorerait la cicatrisation osseuse d'une fracture ou d'un défaut fémoral de taille critique dans des modèles murins [42, 47, 49, 51, 138, 139]. De plus, une approche d'ingénierie tissulaire basée sur la délivrance d'un miARN ciblant la sclérostine a été évaluée dans un défaut mandibulaire canin avec des résultats positifs sur la réparation osseuse [140]. Cependant, cette dernière approche est restée isolée et aucune autre stratégie d'ingénierie tissulaire associée à l'inhibition de la sclérostine n'a été rapportée jusqu'à présent dans le cadre de la régénération osseuse.

L'objectif de ce chapitre vise à proposer une stratégie thérapeutique capable d'associer un biomatériau, qui est le nôtre, à un anticorps monoclonal afin

d'améliorer davantage la quantité et la qualité de tissu osseux régénéré au sein de défauts pariétaux. Les progrès récents dans l'association de l'immunothérapie et des biomatériaux dans le domaine du traitement du cancer [24-26] suggèrent que l'association de notre hydrogel collagénique dense avec un anticorps neutralisant la sclérostine puisse constituer une approche thérapeutique très prometteuse.

Par conséquent, pour faire suite à l'expérimentation précédente et évoluer vers une application clinique potentielle, des défauts pariétaux ont été réalisés chez des souris WT et implantés avec des hydrogels WT mDPSC, puis traités par voie systémique avec un anticorps monoclonal anti-sclérostine (Scl-Ab), sur une base hebdomadaire, pendant le processus de régénération osseuse

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Design de l'étude**

Des souris mâles WT ont été assignés au hasard au groupe qui a reçu soit une injection de Scl-AB (Setrusumab, BPS804; aimable cadeau de Mereo Biopharma (Londres, Royaume-Uni) (n = 10 par groupe) ou un placebo (solution saline), (n = 10 par groupe), selon Roschger et al., [141] (Figure 66).

Souris WT mâles âgées de 10 semaines : n = 60  
 2 groupes: injection de Scl-Ab ou injection du placebo  
 3 conditions expérimentales par groupe

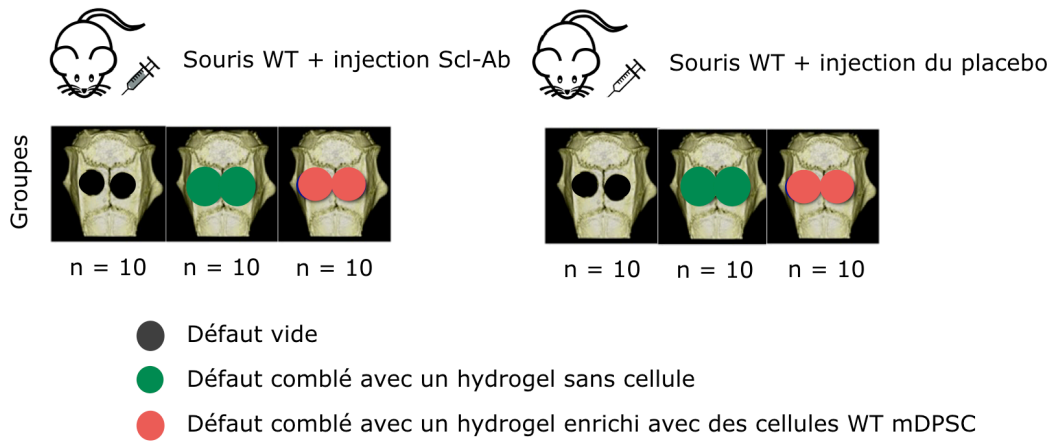


Figure 66 : Schéma représentant la répartition des conditions expérimentales dans les deux groupes de souris WT, celui qui reçoit l'injection de Scl-Ab et celui qui reçoit un placebo.

Ainsi, Scl-AB a été injecté par voie intraveineuse à une dose de 100 mg par kg de poids corporel. Des injections de Scl-Ab ou du placebo ont été administrées une fois par semaine sur une période de 8 semaines. Les souris ont été euthanasiées à la fin de la période de l'expérimentation à 8 semaines, c'est-à-dire à l'âge de 18 semaines. Les poids corporels ont été enregistrés au moment de chaque injection (Figure 67).

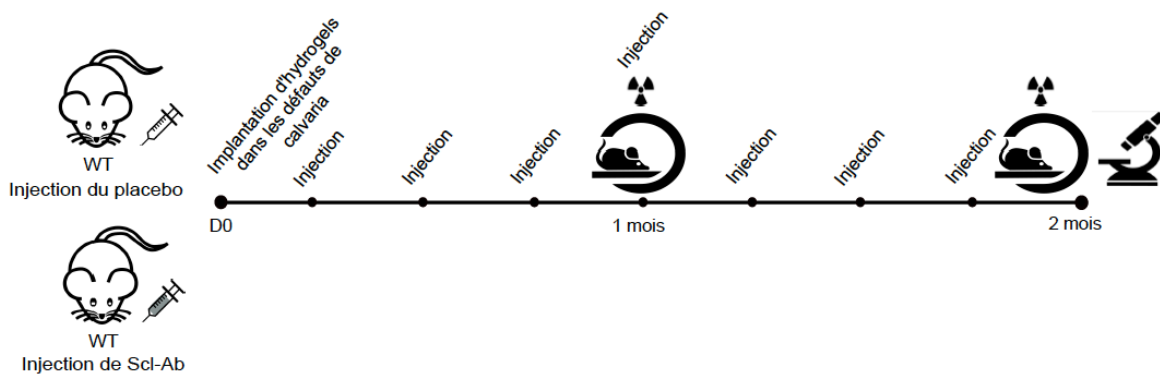


Figure 67 : Schéma représentant le déroulement de l'expérimentation

## 2.2. De l'extraction des mDPSC à l'analyse des données

Toutes les étapes méthodologiques qui ont été nécessaires dans cette seconde expérimentation sont identiques à celles du chapitre précédent. Notons cependant que dans cette expérimentation, seules les cellules mDPSC issues de souriceaux WT ont été extraites, isolées et mise en culture pour être ensuite ensemencées dans les hydrogels collagéniques denses.

## 3. Résultats

### 3.1. La formation osseuse est améliorée par le traitement Scl-Ab

#### 3.1.1. Analyse par micro-CT

D'abord, les résultats révèlent qu'à 2 mois, les défauts pariétaux non comblés chez les souris WT ayant reçu Scl-Ab et le placebo restent vides (Figure 68). En effet, la formation osseuse était limitée au bord des défauts laissés vides chez l'animal ayant reçu l'injection d'anticorps. Ceci permet de valider le design de notre modèle chez l'animal ayant reçu le placebo mais surtout celui ayant été traité avec le Scl-Ab.

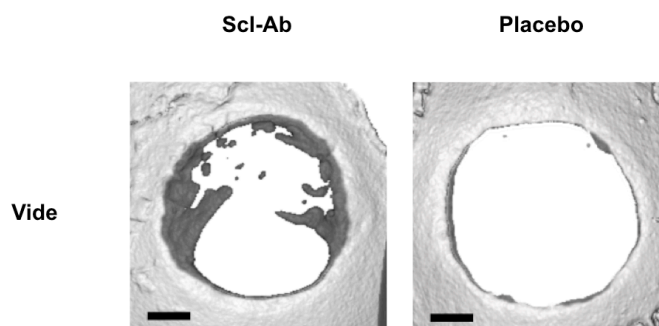


Figure 68 : Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein des défauts pariétaux laissés vides chez le mutant *Sost* KO et la souris WT.

Ensuite, chez les souris traitées avec Scl-Ab, la représentation 2D des images obtenues par micro-CT a montré une formation osseuse à la fois au bord et dans les défauts osseux comblés avec des hydrogels enrichis ou non de mDPSC. Cette réparation osseuse apparaît complète à 2 mois (Figure 69).

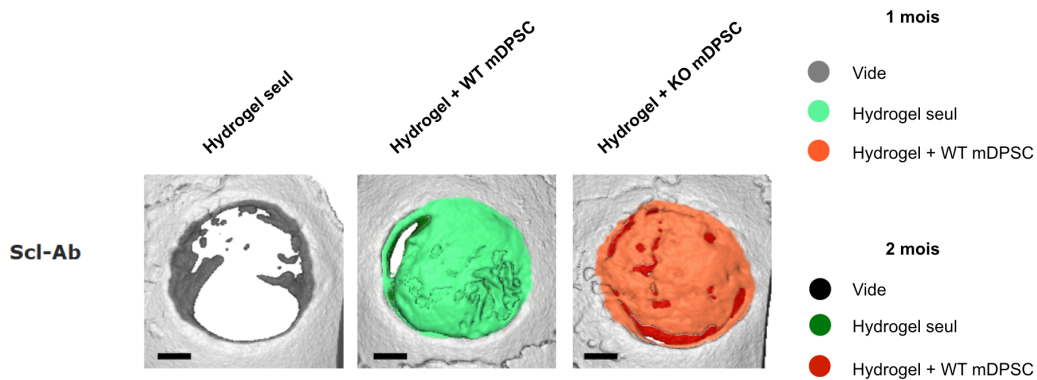


Figure 69: Représentation en 2D de la réparation osseuse au sein de défauts pariétaux chez l'animal WT ayant reçu l'anticorps anti-sclérostine, à 1 et 2 mois. La condition du défaut comblé par un hydrogel seul est en vert clair à 1 mois, vert foncé à 2 mois. La condition du défaut comblé par un hydrogel enrichi de WT mDPSC est en orange à 1 mois et en rouge à 2 mois.

Après quantification, les résultats révèlent qu'à 1 mois, la supériorité du ratio BV/TV chez les animaux traités avec l'anticorps n'est significative qu'au sein de défauts comblés avec des hydrogels enrichis de mDPSC. Par contre, à 2 mois, cette différence se révèle être significative au sein de défauts comblés avec des hydrogels acellulaires.

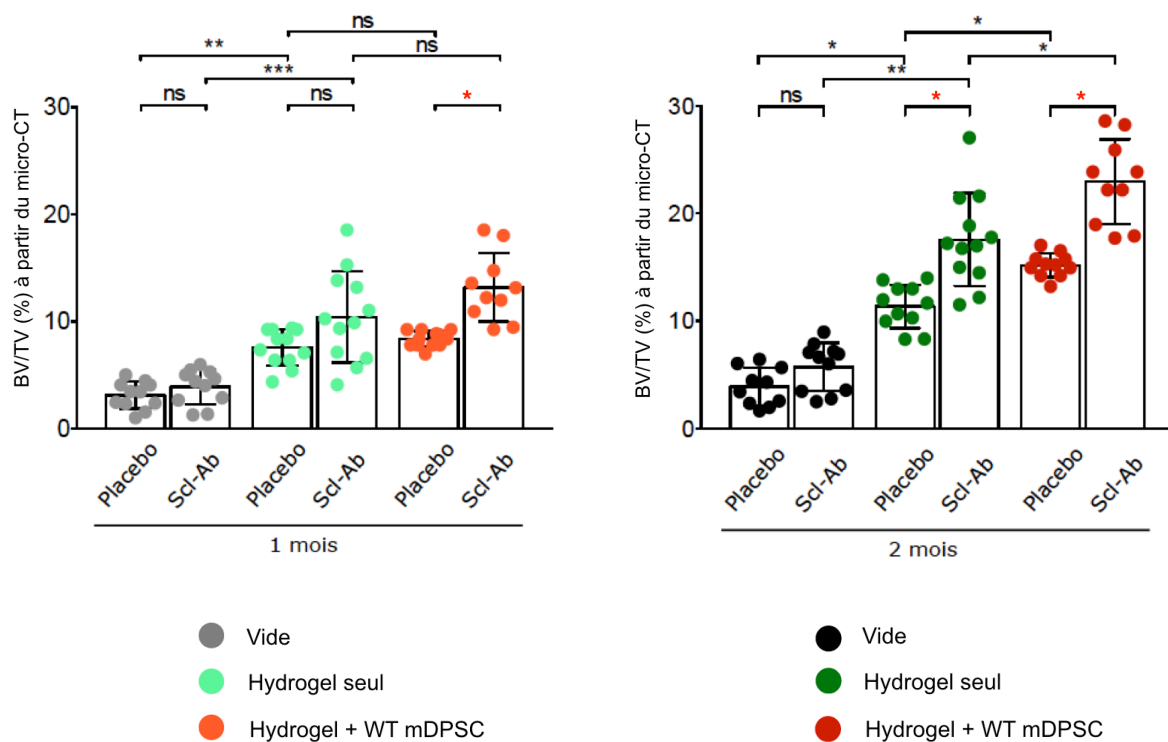


Figure 70 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitatif des images réalisées par micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis

Il convient de noter que l'ajout de mDPSC a considérablement amélioré la réparation osseuse par rapport à l'hydrogel non cellularisé chez les animaux traités le Scl-Ab ou recevant le placebo ( $p < 0,05$ ) (Figure 71).

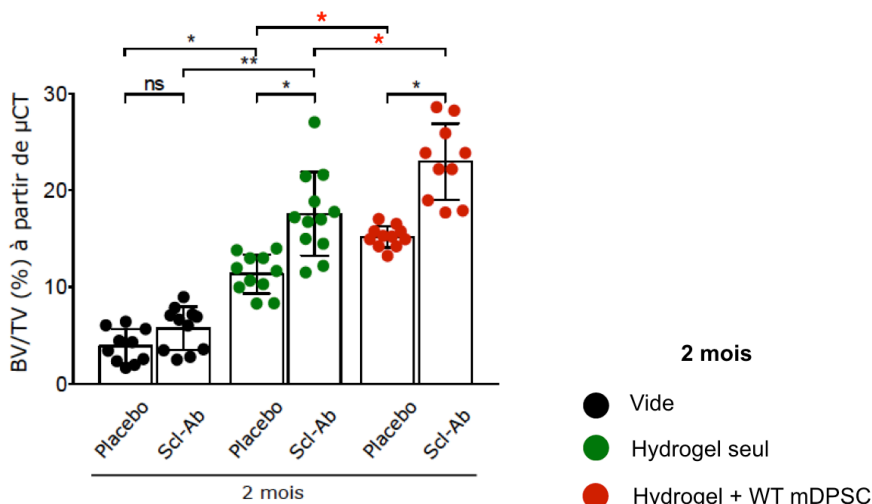




Figure 71 : Graphique représentant le ratio Bone volume/Tissu volume (BV/TV) obtenu à partir de l'analyse quantitative des images réalisées par micro-CT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis

### 3.1.2. Analyse par coloration Von Kossa

La coloration de Von Kossa effectuée à 2 mois a révélé une quantité significativement plus élevée de tissu minéralisé néoformé chez les animaux traités par injection de Scl-Ab par rapport aux témoins (Figure 72).

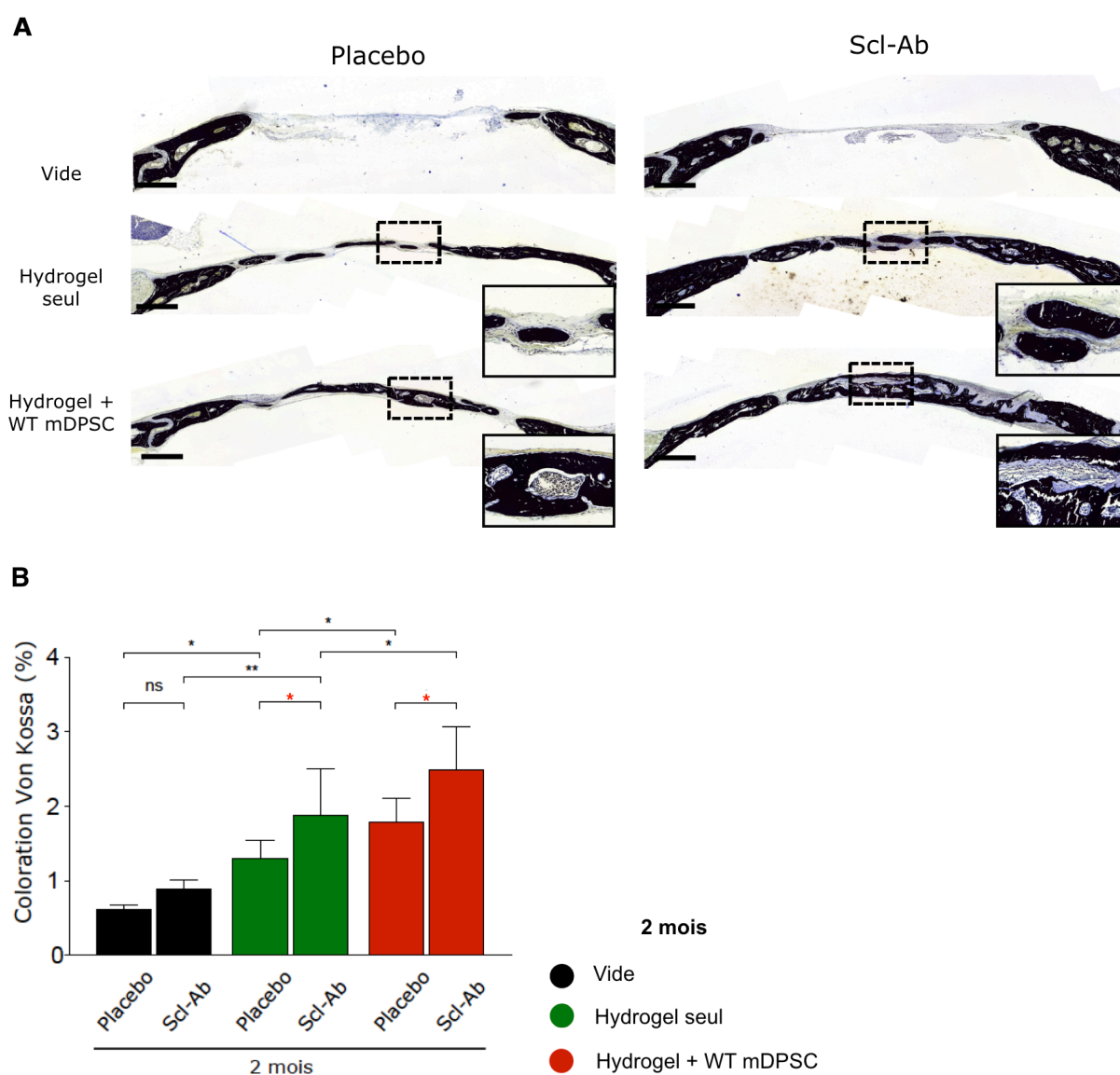


Figure 72 : Représentation graphique des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT ayant reçu Sb-Ab ou un placebo pour chaque condition. (A) Images représentatives de chaque condition expérimentale obtenues par microscopie optique (barre d'échelle : 400  $\mu$ m) . (B) Représentation graphique de la quantification du tissu minéralisé au sein des défauts pariétaux. . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis

En outre, la présence de WT mDPSC chez les animaux qui ont reçu soit Scl-Ab ou injection de véhicule a statistiquement amélioré la minéralisation par rapport à la condition «hydrogel non cellularisé» (Figure 73).

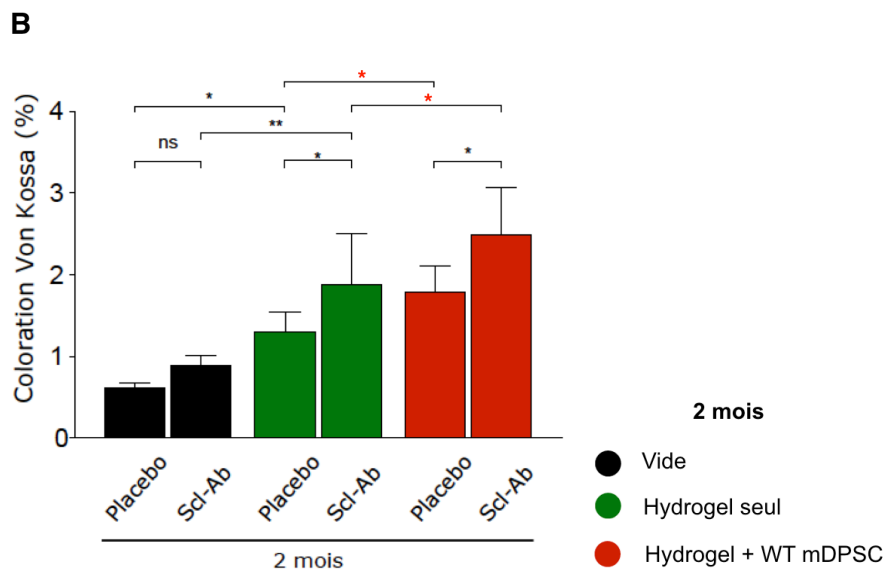


Figure 73 : Représentation graphique des résultats obtenus à partir de la coloration Von Kossa à 2 mois chez l'animal WT ayant reçu Sb-Ab ou un placebo pour chaque condition. Représentation graphique de la quantification du tissu minéralisé au sein des défauts pariétaux. . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis

### 3.2. La neutralisation de la sclérostine diminue la porosité de l'os nouvellement formé

Nous avons étudié la qualité de l'os nouvellement formé en utilisant la SHG à 2 mois. Cette analyse a indiqué une meilleure organisation des fibres de collagène chez les souris traitées avec Scl-Ab par rapport aux souris qui ont reçus le véhicule, et ce dans toutes les conditions expérimentales. Cette

observation est particulièrement frappante dans les défauts comblés avec des hydrogels enrichis de WT mDPSC (Figure 74).

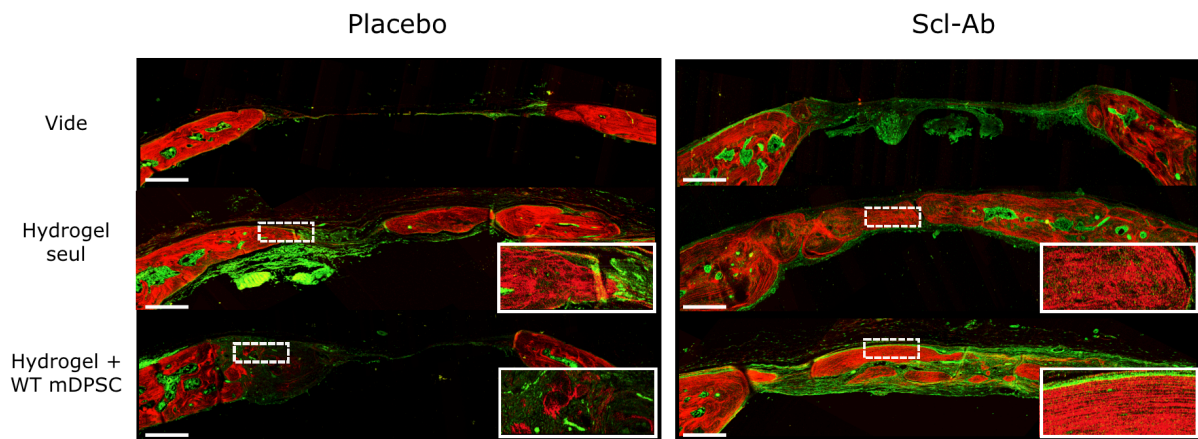


Figure 74 : Images représentatives de la microscopie seconde harmonique (SHG) révélant l'organisation des fibres de collagène. Les zones intéressantes ont été agrandies pour chaque condition. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

À l'appui de ces observations, les acquisitions micro-CT à 2 mois semble révéler une porosité osseuse moindre chez les animaux ayant reçu Scl-Ab (Figure 75).

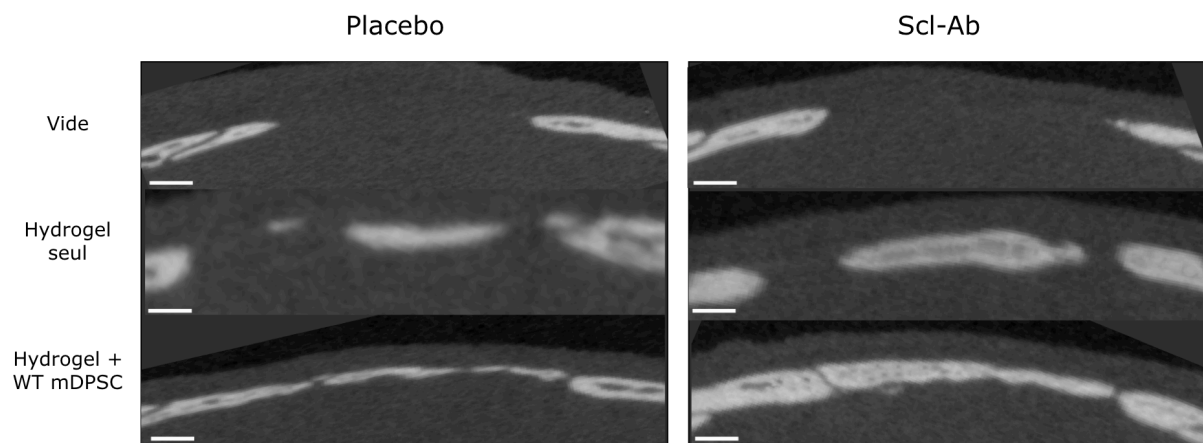


Figure 75 : Images radiographiques obtenues par micro-CT permettent d'apprécier la porosité osseuse nouvellement formée dans les défauts. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m

L'analyse quantitatif (Figure 76) de cette porosité osseuse (%) a montré une porosité significativement plus faible dans les défauts réalisés chez les

animaux traités avec Scl-Ab à 2 mois. Fait intéressant, la porosité semblait encore plus faible chez les animaux traités avec Scl-Ab dont les défauts avaient été comblés avec des hydrogels enrichis de mDPSC par rapport aux hydrogels non cellularisés. Cependant, cette observation n'a pas atteint la significativité. En revanche à 1 mois, notons que l'administration de Scl-Ab ne semble pas avoir d'effet significative sur la porosité du tissu osseux néoformé.

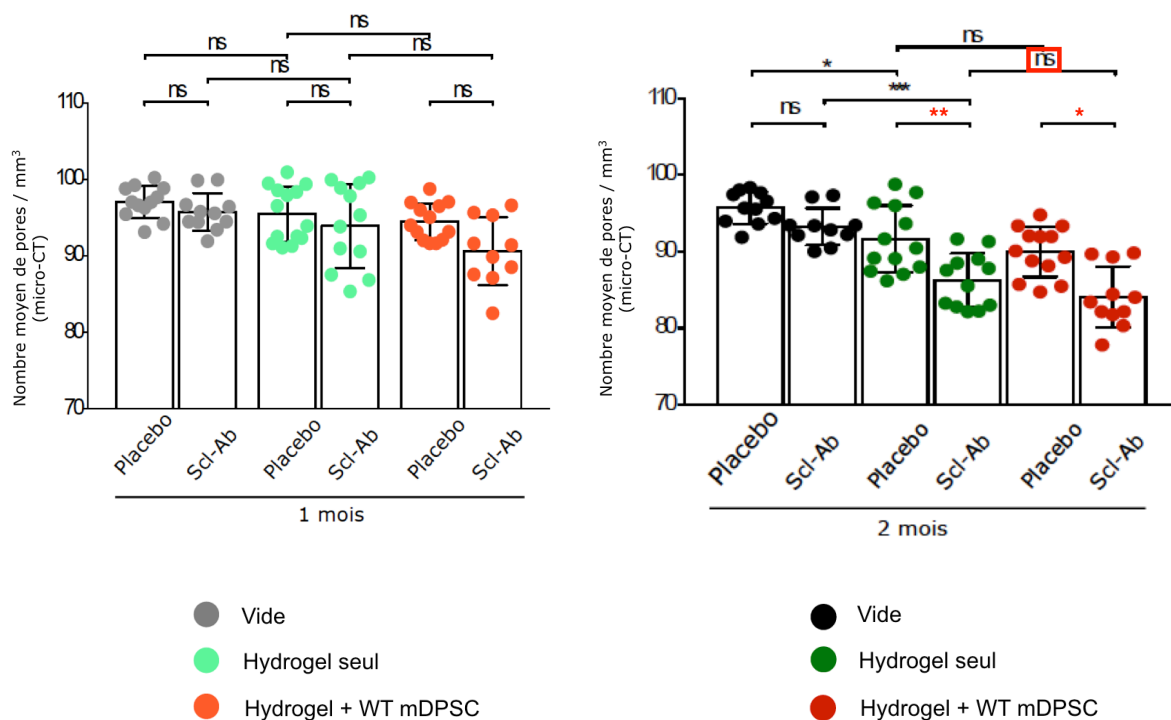


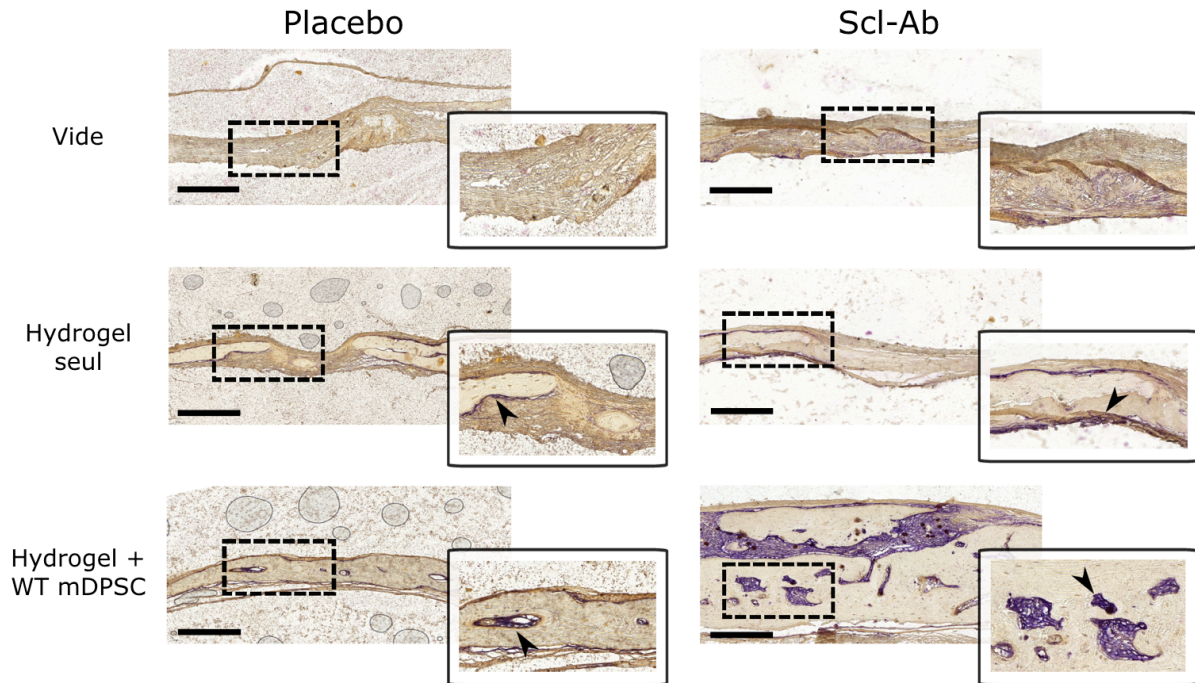
Figure 76 : Analyse quantitative de la porosité osseuse en % réalisée à partir des images micro-CT à 1 et 2 mois. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

### 3.3. La neutralisation de la sclérostine améliore l'activité des ostéoblastes

Pour déterminer si le traitement Scl-Ab a eu un impact sur le processus de remodelage osseux, les activités ALP et TRAP ont été analysées à 2 mois. La quantification de la coloration ALP (Figure 77) a révélé que, à l'exception des témoins vides, le traitement Scl-Ab a conduit à une activité

ostéoblastique plus élevée que chez les souris qui ont reçu le véhicule ( $p < 0,05$ ). Cette activité est d'ailleurs augmentée dans les défauts comblés avec des hydrogels cellularisés ( $p < 0,05$ ).

**A**



**B**

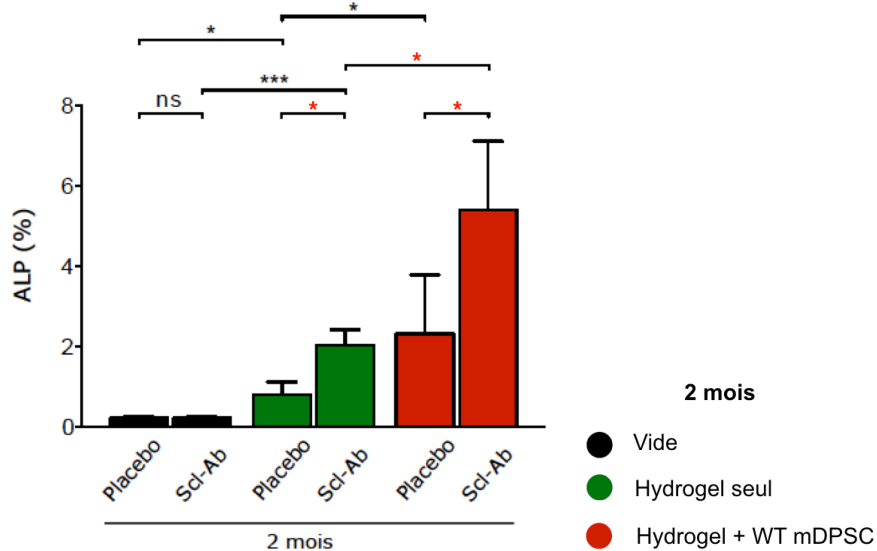
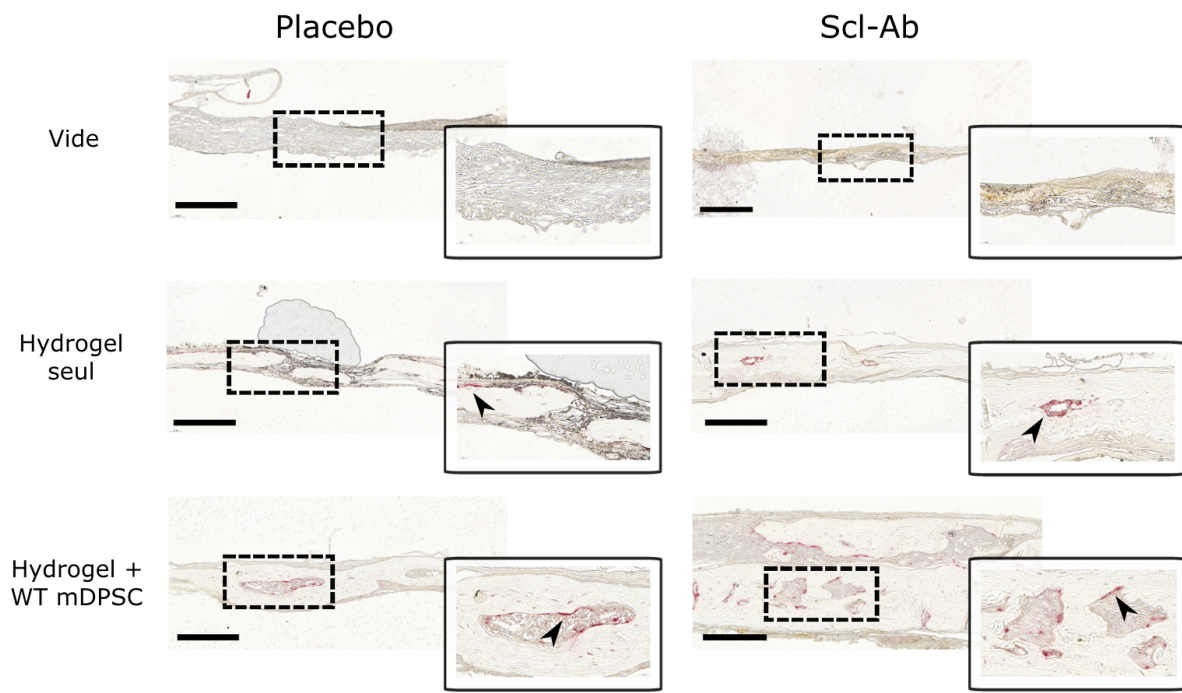


Figure 77 : Représentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) par les ostéoblastes au sein de l'os néoformé. (A) L'activité ALP semble être plus forte chez les souris traitées avec Scl-Ab par rapport aux souris ayant reçu le placebo. Des agrandissements de zones d'intérêt ont été réalisés pour chaque conditions. (B) La quantification de l'activité ALP ( $\mu\text{m}^2$ ) met en évidence une activité ALP significativement plus élevée chez les souris traitées avec Scl-Ab. Barre d'échelle: 250  $\mu\text{m}$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  Ecart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.



L'activité TRAP est apparue plus faible chez les souris traitées avec Scl-Ab par rapport à celles ayant reçu le véhicule, mais la signification n'a été atteinte que pour la condition « hydrogel non cellularisé » ( $p < 0,05$ ) (Figure 78).

**A**



**B**

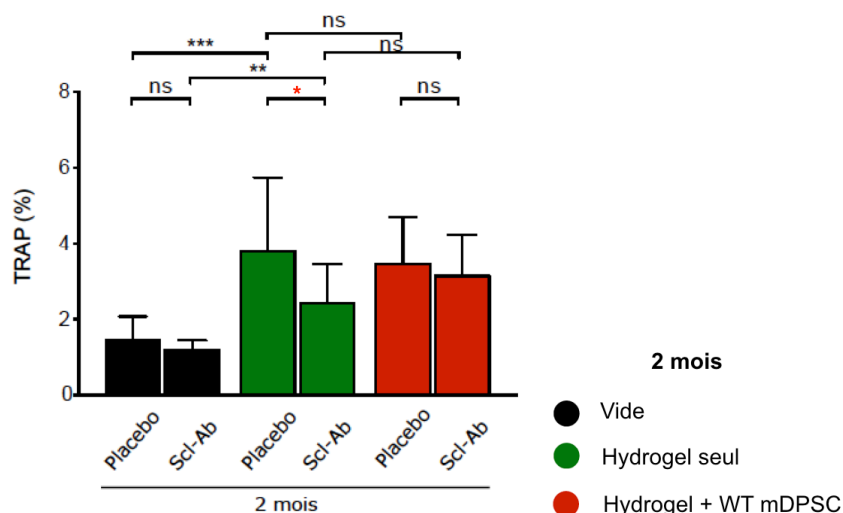


Figure 78 : Représentation de l'activité de la phosphatase acide ostéoclastique résistante au tartrate (TRAP) des ostéoclastes au sein de l'os néoformé. (A) Images de l'activité TRAP chez les souris ayant reçu Scl-Ab ou le placebo. Des agrandissements

de zones d'intérêt ont été réalisés pour chaque condition. (B) La quantification de l'activité TRAP ( $\mu\text{m}^2$ ) a montré une différence significative pour le groupe comblé avec des hydrogels non cellularisés. Barre d'échelle: 250  $\mu\text{m}$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  Ecart-type : ns : non significatif ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  avec le test de Kruskal-Wallis.

# Discussion et perspectives

---

*« Puisque nous ne pouvons pas changer la réalité changeons les yeux qui  
la regardent »*

*Nikos Kazantzakis*



Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un hydrogel collagénique dense enrichi de mDPSC associé à la suppression ou l'inhibition de la sclérostine pourrait améliorer la régénération osseuse au sein de défauts crânio-faciaux. Pour tester cette théorie, nous avons d'abord comparé la réparation de défauts de taille critique de calvaria comblés avec notre hydrogel collagénique dense enrichi de cellules mDPSC issues de souris *Sost* KO et WT. Les résultats obtenus mettent en évidence une réparation osseuse quantitativement et qualitativement meilleurs chez les souris *Sost* KO et, aussi chez les souris WT ayant reçu un hydrogel enrichi de *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC. Ces résultats prometteurs nous ont invité à tester notre hypothèse sur des souris WT présentant des défauts comblés de manière identique à la précédente expérimentation et recevant, durant tout le processus de cicatrisation osseuse, un traitement neutralisant la sclérostine (Scl-Ab). Il s'avère que ce traitement, récemment mis sur le marché pour traiter l'ostéoporose et d'autres maladies osseuses [112, 137, 142, 143], associé à notre approche d'ingénierie tissulaire utilisant l'hydrogel collagénique cellularisé, améliore significativement la réparation osseuse. En effet, la quantité et la densité d'os régénéré est augmentée dans les défauts pariétaux comblés par des hydrogels enrichis en mDPSC chez les animaux traités par le traitement Scl-Ab (Figure 79).

### **Cohérence des résultats avec la littérature.**

Les résultats obtenus dans ces deux expérimentations sont en accord avec ceux de la littérature. Tout d'abord *in vitro*, les travaux de Collignon et al., 2017 [19] révèlent que des mDPSC issues de souris *Sost* KO et placées en conditions de culture ostéogéniques génèrent un nombre de nodules de minéralisation significativement plus élevé que des mDPSC issues de souris WT. De la même manière, il a été mis en évidence [43] que l'inoculation d'un anticorps monoclonal neutralisant la sclérostine dans un milieu de culture cellulaire ostéoblastique permet d'augmenter significativement le

taux de minéralisation par rapport à des cellules qui auraient reçu un placebo.

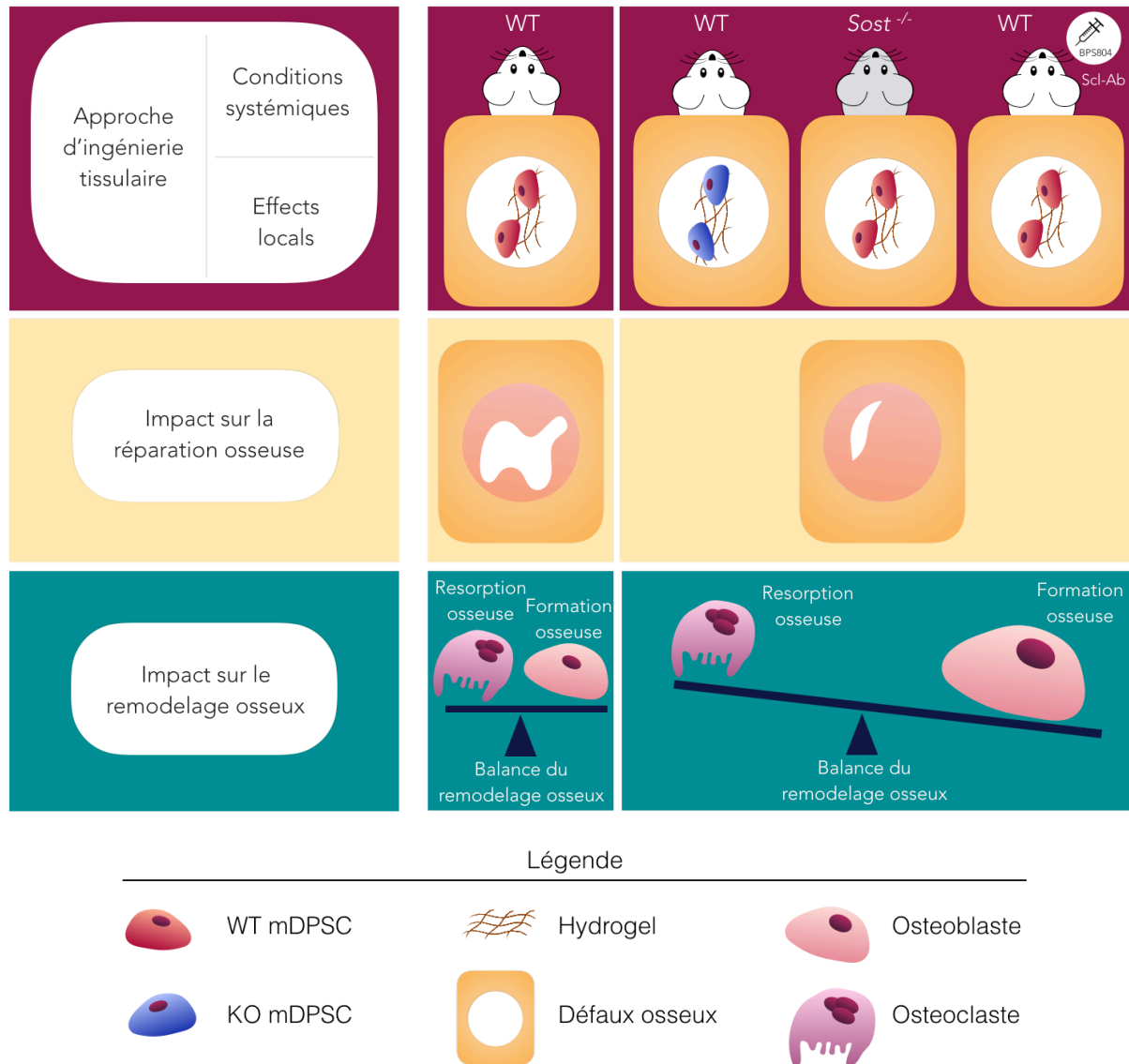


Figure 79 : Représentation schématique des principaux résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales. La stratégie proposée dans notre étude combine l'ingénierie tissulaire et l'inhibition de la sclérostine. Nos données montrent que, par rapport aux défauts de souris WT comblés avec des hydrogels enrichi de WT mDPSC (cellules rouges) (A), les défauts des souris WT qui ont reçu des hydrogels enrichis de Sost KO mDPSC (cellules bleues) (B), ceux des souris Sost KO qui ont reçu des hydrogels enrichis de WT mDPSC (C), et ceux des souris WT traitées avec Scl-Ab (D) ont montré une réparation osseuse considérablement améliorée avec une fermeture quasi complète des défauts. Cette amélioration est associée au découplage de l'équilibre du remodelage osseux, qui se traduit par une augmentation de l'activité des ostéoblastes et à une diminution de l'activité des ostéoclastes.

Ensuite les études *in vivo* rapportent que l'absence constitutive de sclérostine chez les souris présentant la délétion du gène *Sost* participe à une meilleure cicatrisation osseuse au sein de traits de fracture d'os long [20, 144] et dans des défauts pariétaux de taille critique [23]. De même, les travaux souhaitant comprendre l'impact de l'administration de Scl-Ab dans le métabolisme osseux [43] et dans la réparation osseuse au sein de traits de fracture d'os appendiculaires [47] montrent que le volume osseux néoformé est significativement plus important chez des murins ayant été traités par Scl-Ab comparé à ceux ayant reçu un placebo.

### **Particularité de notre modèle d'ingénierie tissulaire**

L'absence totale de sclérostine liée à la mutation du gène *Sost* aurait pu nous permettre d'imaginer une guérison complète des défauts osseux laissés vides (pas d'hydrogel) chez les souris *Sost* KO, comme suggéré précédemment par Kang et al. [145]. Ces auteurs ont rapporté que les souris déficientes en sclérostine étaient capables de régénérer 40% de la zone de défaut de taille critique initiale 8 semaines après la chirurgie. Cependant, dans cette étude, une formation osseuse a été rapportée chez un nombre limité de souris et n'a été observée qu'au bord des défauts. Notre étude a donné des résultats similaires pour les souris *Sost* KO et WT qui ont reçu un traitement Scl-Ab. En d'autres termes, la cicatrisation osseuse n'a été observée que dans les défauts remplis d'un hydrogel de collagène. Cet effet a été potentialisé graduellement par l'ajout de WT mDPSC et de *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC. Ceci valide donc l'intérêt de notre approche d'ingénierie tissulaire dans la réparation osseuse crânio-faciale chez les animaux WT et chez ceux qui n'expriment pas la sclérostine.

Concernant la justification de l'utilisation d'un hydrogel de collagène dense [82] [83] comme matrice ostéoconductrice dans la réparation osseuse, notre laboratoire et d'autres équipes ont déjà démontrés que de tels

hydrogels sont totalement tolérés par l'hôte lors de l'implantation. Aussi, ils permettent d'obtenir une densité fibrillaire favorable à la régénération osseuse grâce à leur capacité de recrutement cellulaire, tels que le récepteur de chimiokine CXCR4 (CXCR4) et la protéine chimio-attractrice des monocytes (MCP-1) [86]. Finalement, des études ont montré que le processus de compression plastique appliqué à l'hydrogel de collagène donne lieu à une matrice résistante sur le plan mécanique, capable de soutenir d'abord la viabilité cellulaire avec une forte interaction cellule-matrice et ensuite la prolifération des fibroblastes dermiques [81]. Notons que dans notre étude, chez l'animal WT, l'ajout d'un hydrogel seul au sein d'un défaut crânio-facial permet de favoriser significativement la réparation osseuse dès 1 mois post-opératoire comparé à un défaut vide.

L'ingénierie tissulaire cherche aujourd'hui à produire des biomatériaux hybrides capables de mimer au plus près les tissus à régénérer. C'est la raison pour laquelle notre hydrogel est enrichi de cellules souches mésenchymateuse. Ces cellules, les DPSC, ont été identifiées pour la première fois dans la pulpe dentaire de la 3<sup>e</sup> molaire en 2000 par Gronthos et son équipe [98]. Ces cellules capables *in vitro* de se différencier en ostéoblastes et de produire une matrice extracellulaire minéralisée de type osseux [146], se sont révélées être extrêmement intéressantes *in vivo* dans la réparation osseuse de défauts crânio-faciaux de taille critique [103, 125, 126, 147]. Le choix de la pulpe dentaire comme source de cellules souches mésenchymateuses/stromales (CSM) est aussi expliqué par le fait que la plupart des os crânio-faciaux et la pulpe dentaire partagent la même origine embryonnaire, la crête neurale [117, 148].

Le rôle de ces cellules souches implantées dans un défaut ne semble cependant pas direct comme l'indique la littérature [149] mais paracrine. En effet, elles favoriseraient la réparation osseuse en stimulant la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la différenciation des cellules environnantes en cellules ostéoblastiques. Ainsi, la différence de quantité d'os néoformé

entre des défauts comblés avec un hydrogel seul, ceux comblés avec un hydrogel enrichi de *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC et ceux comblés avec un hydrogel enrichi de WT mDPSC n'est certainement pas à attribuer au pouvoir minéralisant des cellules implantées mais plutôt à l'effet paracrine qu'elles peuvent induire.

Le choix d'utiliser un anticorps monoclonal neutralisant la sclérostine a été motivé par les résultats de notre première expérimentation chez l'animal *Sost* KO et par ceux obtenus à travers d'autres études qui révèlent le pouvoir minéralisant du traitement Scl-Ab *in vitro* [43] [44], dans des essais précliniques [46] et cliniques chez les patients atteints d'ostéoporose post-ménopausique ou d'ostéogénèse imparfaite [112, 137, 142, 143].

Notre modèle expérimental associe un hydrogel, des mDPSC et un facteur impliqué dans la stimulation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Il a donc la particularité de réunir les trois éléments clés de l'ingénierie tissulaire qui permettent la fonction et la régulation de la réparation osseuse [150].

### **Perspectives à court et moyen terme.**

Nos résultats montrent de manière tout à fait remarquable que les défauts chez les souris WT comblés avec des hydrogels contenant des *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC présentent une cicatrisation osseuse considérablement améliorée par rapport aux souris WT traitées avec des WT mDPSC. De plus, la qualité osseuse de ces animaux était presque aussi bonne que celle de leurs homologues porteurs de la mutation *Sost* KO. Cette constatation importante suggère l'idée que l'absence locale de l'expression du gène *Sost* au sein d'un défaut osseux suffit à potentialiser la régénération tissulaire. Ces résultats concordent avec une étude précédente montrant que la délivrance locale de petits fragments actifs d'anticorps anti-sclérostine chargés sur des

microsphères de poly (lactide-co-glycolide) et implantées dans un site de fracture fémorale favorise la cicatrisation osseuse (OVX) [151].

A court terme, il pourrait, d'abord, être proposé de concevoir un hydrogel capable de libérer de manière lente et progressive l'anticorps monoclonal anti-sclérostine au sein de nos défauts crânio-faciaux. Cette proposition est d'autant plus légitime que certains essais cliniques de phase III menés chez des patients souffrant d'ostéoporose ont montré que la neutralisation systémique de la sclérostine avec un anticorps monoclonal n'était pas dépourvue d'événements indésirables, tels que l'arthrose, l'arthralgie, la rhinopharyngite ou les maux de dos ainsi qu'une incidence accrue d'événements cardiovasculaires [152, 153]. Ces événements indésirables, même extrêmement rare (deux cas rapportés dans l'essai clinique FRAME) [154], sont à mettre en balance avec les bénéfices recherchés et nous confortent dans l'idée qu'une solution thérapeutique locale serait à envisager (Figure 80).

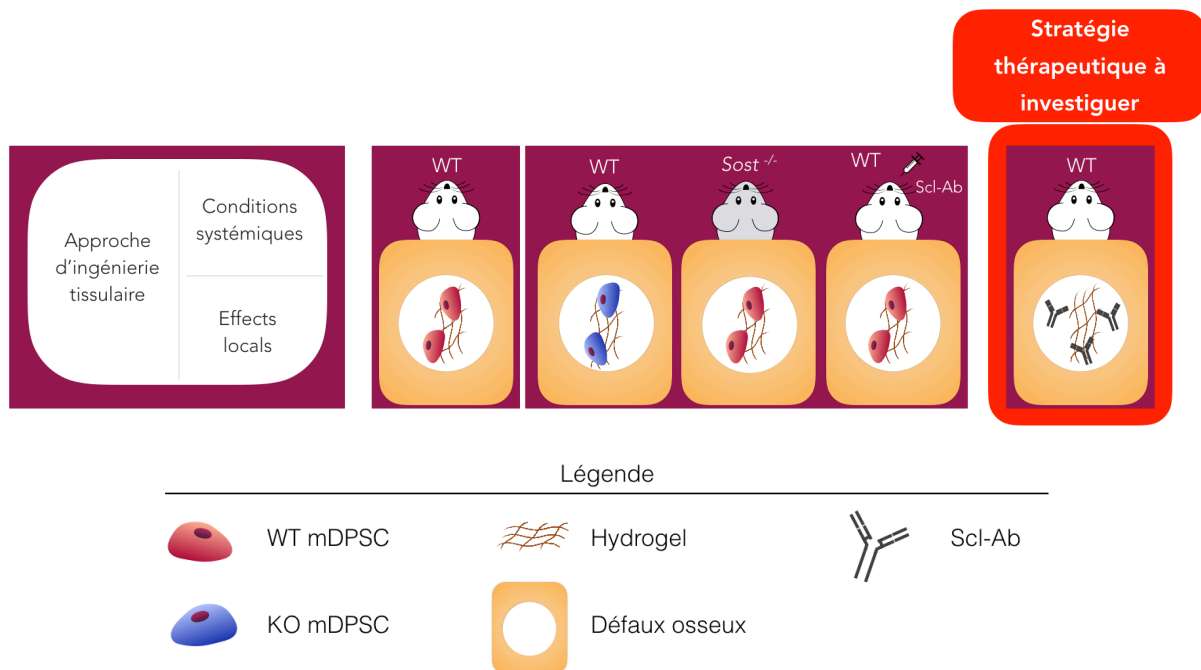
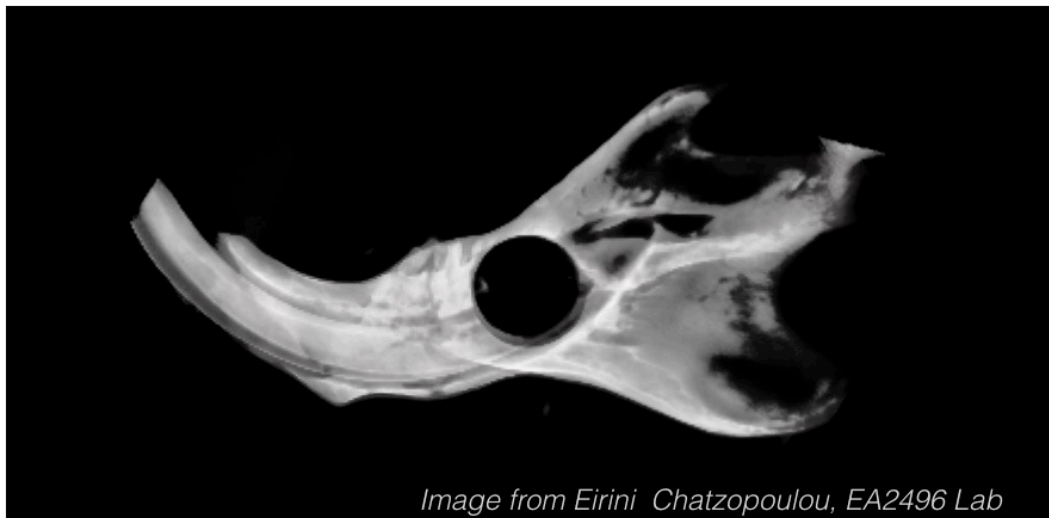


Figure 80 : Représentation schématique de la stratégie thérapeutique à investiguer. Elle consiste à développer un hydrogel capable de libérer de manière lente et

*progressive l'anticorps monoclonal anti-sclérostine au sein de nos défauts crânio-faciaux.*

Ensuite, compte tenu des faibles contraintes exercées sur l'os pariétal, ces travaux pourraient être désormais conduit dans un modèle de lésion osseuse exposées à des contraintes mécaniques plus importantes, telles que celles exercées à la mandibule (Figure 81).



*Figure 81 :Représentation 2D d'un défaut osseux de taille critique au sein d'une mandibule de rat. Le visuel 3D a été obtenue à partir d'images micro-CT.*

Aussi, la versatilité de l'hydrogel de collagène dense limite ses applications pour des défauts osseux plus larges avec une architecture plus complexe soumis à des contraintes plus fortes. Il nous semble donc intéressant d'imaginer incorporer à notre matrice un biomatériau présentant une stabilité structurelle qui permette d'aboutir à un échafaudage composite à base de collagène plus résistant pour la régénération osseuse (Figure 82) [155].

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

*Figure 82 : Représentation d'un biomatériau hybride à base de collagène associé à des matériaux divers. GAG : glycosaminoglycans ; (CaP)  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , HA : calcium phosphate Hydroxyapatite. D'après Linda et al . 2019 [155]*

Et finalement, nos résultats mettent en évidence que l'administration systémique de Scl-Ab améliore significativement le volume et la densité osseuse au sein de défauts pariétaux de taille critique lorsque ces derniers sont comblés avec un hydrogel enrichi de mDPSC. Compte tenu du fait que l'anticorps Scl-Ab est déjà mis sur le marché aux États-Unis (approuvée par la FDA) et qu'il est en cours d'évaluation par l'agence européenne de médecine, il est tout à fait imaginable de soumettre l'idée et de proposer, à moyen terme, une étude préclinique sur un animal d'une plus grande envergure afin de confirmer le bénéfice de cet Scl-Ab sur la réparation de défauts de taille critique crânio-faciaux.



# Conclusion

---

*« On écrit aussi le mot fin en conclusion des ouvrages les plus épais »*

*Jean Augustin Izoard*

De par les conséquences esthétiques et fonctionnelles majeures qu'ils engendrent, les défauts osseux sont une préoccupation majeure en chirurgie crânio-faciale. Les patients présentant de telles conditions sont souvent confrontés à des troubles physiques et psychologiques. À ce jour, les traitements proposés sont invasifs et présentent certains inconvénients et un taux d'échec élevé. Il existe donc un réel besoin de développer des stratégies d'ingénierie tissulaire biomimétiques capables de régénérer les tissus osseux délabrés.

Parmi les substituts osseux proposés, l'hydrogel de collagène dense enrichi de CSM issues de la pulpe dentaire, les DPSC, nous a semblé être le matériau idéal. A cette stratégie d'ingénierie tissulaire, nous avons choisi d'y associer une thérapie visant soit à supprimer la sclérostine, par la délétion du gène *SOST*, ou à la neutraliser grâce à l'anticorps anti-sclérostine (Scl-Ab).

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de mettre en évidence l'intérêt de l'absence totale de la sclérostine ou de sa neutralisation dans la réparation osseuse crânio-faciale. Les travaux, permettant de répondre à ces objectifs, ont été présentés dans la seconde partie du manuscrit. Nos résultats mettent en évidence l'intérêt d'une inhibition locale (grâce aux cellules *Sost*<sup>-/-</sup> mDPSC) et systémique de la sclérostine (par délétion du gène *Sost* ou par l'administration en intraveineuse de Scl-Ab) dans la régénération osseuse via la régulation positive de l'activité des ostéoblastes.

Cette découverte est pertinente pour des approches thérapeutiques visant à restaurer des défauts osseux crânio-faciaux de taille critique. Elle valide l'intérêt de développer des substituts osseux enrichis localement d'anticorps neutralisant la sclérostine.

# **Article et communications scientifiques**

---

*« Aucun de nous ne sait ce que nous savons tous, ensemble »*

*Lao-Tseu*

Ces trois années de travail ont conduit à la publication et aux communications suivantes :

## **1. Publication en soumission**

Sophie Maillard, Ludovic Sicard, Caroline Andrique, Coralie Torrens, Julie Lesieur, Brigitte Baroukh, Thibaud Coradin, Anne Poliard, Lotfi Slimani, Catherine Chaussain

*"Combining Sclerostin-neutralization and tissue engineering as a new strategy to promote bone regeneration in craniofacial critical defect"*.

## **2. Communications à des congrès scientifiques**

### 2.1. Congrès international

Communication orale :

- Juin 2019: "97<sup>th</sup> International of Dental Research (IADR)", Vancouver, Canada  
"Impact of sclerostin inhibition on cranio-facial bone regeneration"

### 2.2. Congrès nationaux

Communication orale :

- Septembre 2019 : "Journée du Collège national des enseignants en parodontologie (C.N.E.P)", Prix Méridol, Lille, France. « Impact de la délétion de la sclérostine sur la réparation osseuse »
- Juin 2019 : "Journée Française de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM)", Boulogne sur Mer, France. « Impact de la délétion de la sclérostine sur la réparation osseuse cranio-faciale dans un modèle murin ».

- Juin 2019 : "Congrès national de la Société Française de parodontologie et d'implantologie Orale (SFPIO)", Paris, France. « Impact de la délétion de la sclérostine sur la réparation osseuse »
- Janvier 2019 : "Journée de la recherche à Garancière", Université d'odontologie Paris Diderot, France. « Impact de la délétion de la sclérostine sur la réparation osseuse »

Affichée :

- Janvier 2019 : "Journée de la recherche à Garancière", Université d'odontologie Paris Diderot, France. « Impact de la délétion de la sclérostine sur la réparation osseuse »

### **3. Bourse obtenue**

Bourse de financement de doctorat (2017-2020) de la « Fondation des Gueules Cassées » dans le cadre de l'appel à projet « Pathologie cranio-faciale traumatique : Prise en charge et réparation de lésions traumatiques et tumorales, prise en charge de pathologies s'accompagnant de séquelles fonctionnelles d'origine traumatique ou dégénérative ».

**Article en soumission**

---

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*



*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*



*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

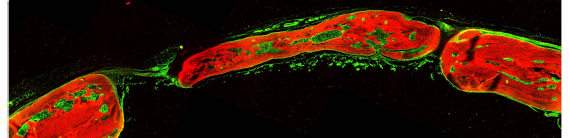
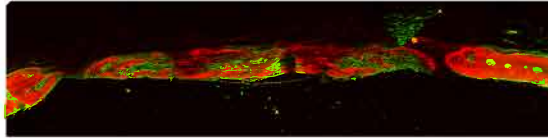
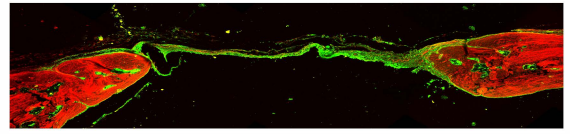
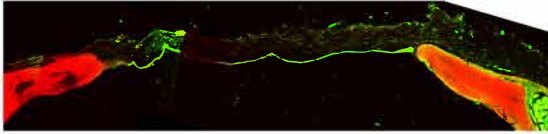


*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

*« élément sous droit, diffusion non autorisée »*

« élément sous droit, diffusion non autorisée »



« élément sous droit, diffusion non autorisée »

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

« élément sous droit, diffusion non autorisée »



« élément sous droit, diffusion non autorisée »

« élément sous droit, diffusion non autorisée »

# **Références bibliographiques**

---

1. Truswell, A., *Osteopetrosis with syndactyly*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1958. **40**(2): p. 208-218.
2. Sebastian, A. and G.G. Loots, *Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models*. Metabolism, 2018. **80**: p. 38-47.
3. Beighton, P., et al., *The syndromic status of sclerosteosis and van Buchem disease*. Clinical genetics, 1984. **25**(2): p. 175-181.
4. Van Hul, W., et al., *Van Buchem disease (hyperostosis corticalis generalisata) maps to chromosome 17q12-q21*. The American Journal of Human Genetics, 1998. **62**(2): p. 391-399.
5. Balemans, W., et al., *Localization of the Gene for Sclerosteosis to the van Buchem Disease–Gene Region on Chromosome 17q12–q21*. The American Journal of Human Genetics, 1999. **64**(6): p. 1661-1669.
6. Holdsworth, G., et al., *Characterization of the interaction of sclerostin with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) family of Wnt co-receptors*. J Biol Chem, 2012. **287**(32): p. 26464-77.
7. Ellies, D.L., et al., *Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(11): p. 1738-49.
8. Sebastian, A. and G.G. Loots, *Transcriptional control of Sost in bone*. Bone, 2017. **96**: p. 76-84.
9. Weivoda, M.M., S.J. Youssef, and M.J. Oursler, *Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte*. Bone, 2017. **96**: p. 45-50.
10. van Bezooijen, R.L., et al., *Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 805-14.
11. GeneCards, T.h.g.d., *SOST sclerostin [ Homo sapiens (human) ]*. 2020.
12. Holdsworth, G., S.J. Roberts, and H.Z. Ke, *Novel actions of sclerostin on bone*. J Mol Endocrinol, 2019. **62**(2): p. R167-r185.
13. Bonewald, L.F., M. Johnson, and M. Kneissel, *Preface: the osteocyte*. Bone (New York, NY), 2013. **54**(2).
14. Gasser, J.A. and M. Kneissel, *Bone physiology and biology*, in *Bone Toxicology*. 2017, Springer. p. 27-94.
15. Compton, J.T. and F.Y. Lee, *A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(19): p. 1659-68.
16. Sutherland, M.K., et al., *Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation*. Bone, 2004. **35**(4): p. 828-835.
17. Li, X., et al., *Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength*. Journal of Bone and Mineral Research, 2008. **23**(6): p. 860-869.
18. Li, X., et al., *Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(6): p. 860-9.
19. Collignon, A.-M., et al., *Sclerostin deficiency promotes reparative dentinogenesis*. Journal of Dental Research, 2017. **96**(7): p. 815-821.

20. Li, C., et al., *Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene*. Bone, 2011. **49**(6): p. 1178-1185.
21. McGee-Lawrence, M.E., et al., *Sclerostin deficient mice rapidly heal bone defects by activating beta-catenin and increasing intramembranous ossification*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 886-90.
22. Alzahrani, M.M., F. Rauch, and R.C. Hamdy, *Does Sclerostin Depletion Stimulate Fracture Healing in a Mouse Model?* Clin Orthop Relat Res, 2016. **474**(5): p. 1294-302.
23. Kang, K.S., et al., *Loss of mechanosensitive sclerostin may accelerate cranial bone growth and regeneration*. J Neurosurg, 2018. **129**(4): p. 1085-1091.
24. Leach, D.G., S. Young, and J.D. Hartgerink, *Advances in immunotherapy delivery from implantable and injectable biomaterials*. Acta Biomater, 2019. **88**: p. 15-31.
25. Wang, C., et al., *Tailoring Biomaterials for Cancer Immunotherapy: Emerging Trends and Future Outlook*. Adv Mater, 2017. **29**(29).
26. Weber, J.S. and J.J. Mulé, *Cancer immunotherapy meets biomaterials*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(1): p. 44-5.
27. Lu, R.M., et al., *Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases*. J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 1.
28. Twomey, J.D., et al., *COVID-19 update: The race to therapeutic development*. Drug Resist Updat, 2020. **53**: p. 100733.
29. Llewelyn, M.B., R.E. Hawkins, and S.J. Russell, *Discovery of antibodies*. Bmj, 1992. **305**(6864): p. 1269-72.
30. Saeed, A. and S. Awan, *Advances in monoclonal antibodies production and cancer therapy*. MOJ Immunol, 2016. **3**(4): p. 00099.
31. Köhler, G. and C. Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*. European journal of immunology, 1976. **6**(7): p. 511-519.
32. Reichert, J.M., et al., *Anticorps médicaments* Med Sci (Paris), 2019. **35**(12): p. 924-925.
33. Diallo, B.K., et al., *Les anticorps monoclonaux-L'histoire d'une recherche fondamentale ou la curiosité comme source de richesse*. médecine/sciences, 2019. **35**(12): p. 926-936.
34. Brekke, O.H. and I. Sandlie, *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*. Nature reviews Drug discovery, 2003. **2**(1): p. 52-62.
35. Miller, S.A., E.L. St. Onge, and K.L. Whalen, *Romosozumab: A Novel Agent in the Treatment for Postmenopausal Osteoporosis*. Journal of Pharmacy Technology, 2020: p. 8755122520967632.
36. Cart, S. and C. T-Cells, *Amgen and UCB Provide Regulatory Update on Status of EVENITY™(Romosozumab) in the EU*.
37. McClung, M.R., et al., *Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 412-20.
38. Miyauchi, A., et al., *Increased bone mineral density for 1 year of Romosozumab, vs placebo, followed by 2 years of denosumab in the*

- Japanese subgroup of the pivotal FRAME trial and extension. Arch Osteoporos*, 2019. **14**(1): p. 59.
39. Lewiecki, E.M., et al., *One Year of Romosozumab Followed by Two Years of Denosumab Maintains Fracture Risk Reductions: Results of the FRAME Extension Study. J Bone Miner Res*, 2019. **34**(3): p. 419-428.
  40. BioPharma, M., *Trinity Delta. Outlook*, 2019.
  41. Glorieux, F.H., et al., *BPS804 Anti-Sclerostin Antibody in Adults With Moderate Osteogenesis Imperfecta: Results of a Randomized Phase 2a Trial. J Bone Miner Res*, 2017. **32**(7): p. 1496-1504.
  42. Suen, P.K. and L. Qin, *Sclerostin, an emerging therapeutic target for treating osteoporosis and osteoporotic fracture: A general review. Journal of orthopaedic translation*, 2016. **4**: p. 1-13.
  43. Li, X., et al., *Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res*, 2009. **24**(4): p. 578-88.
  44. Shahnazari, M., et al., *Early response of bone marrow osteoprogenitors to skeletal unloading and sclerostin antibody. Calcif Tissue Int*, 2012. **91**(1): p. 50-8.
  45. Stolina, M., et al., *Temporal changes in systemic and local expression of bone turnover markers during six months of sclerostin antibody administration to ovariectomized rats. Bone*, 2014. **67**: p. 305-13.
  46. Kim, S.W., et al., *Sclerostin Antibody Administration Converts Bone Lining Cells Into Active Osteoblasts. J Bone Miner Res*, 2017. **32**(5): p. 892-901.
  47. Cui, L., et al., *Time-dependent effects of sclerostin antibody on a mouse fracture healing model. J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2013. **13**(2): p. 178-84.
  48. Alaei, F., et al., *Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model. Journal of Orthopaedic Research*, 2014. **32**(2): p. 197-203.
  49. Alaei, F., et al., *Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model. J Orthop Res*, 2014. **32**(2): p. 197-203.
  50. Liu, Y., et al., *Effects of Sclerostin Antibody on the Healing of Femoral Fractures in Ovariectomised Rats. Calcif Tissue Int*, 2016. **98**(3): p. 263-74.
  51. Suen, P.K., et al., *Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength of Intact Bones in Adult Male Rats. Sci Rep*, 2015. **5**: p. 15632.
  52. Yao, Q., et al., *Expression of sclerostin scFv and the effect of sclerostin scFv on healing of osteoporotic femur fracture in rats. Cell Biochem Biophys*, 2014. **69**(2): p. 229-35.
  53. Viridi, A.S., et al., *Sclerostin antibody treatment improves implant fixation in a model of severe osteoporosis. J Bone Joint Surg Am*, 2015. **97**(2): p. 133-40.

54. Taut, A.D., et al., *Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(11): p. 2347-56.
55. Scheiber, A.L., et al., *Sclerostin Antibody-Induced Changes in Bone Mass Are Site Specific in Developing Crania*. J Bone Miner Res, 2019. **34**(12): p. 2301-2310.
56. Tamplen, M., et al., *Treatment with anti-Sclerostin antibody to stimulate mandibular bone formation*. Head Neck, 2018. **40**(7): p. 1453-1460.
57. Yu, S.H., et al., *Sclerostin-Neutralizing Antibody Enhances Bone Regeneration Around Oral Implants*. Tissue Eng Part A, 2018. **24**(21-22): p. 1672-1679.
58. Varga, P., et al., *Finite element analysis of bone strength in osteogenesis imperfecta*. Bone, 2020. **133**: p. 115250.
59. Seefried, L., et al., *Efficacy of anti-sclerostin monoclonal antibody BPS804 in adult patients with hypophosphatasia*. J Clin Invest, 2017. **127**(6): p. 2148-2158.
60. Campana, V., et al., *Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(10): p. 2445-61.
61. Han, Z., et al., *Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models*. Tissue Eng Part C Methods, 2018. **24**(5): p. 272-279.
62. Bosch, C., B. Melsen, and K. Vargervik, *Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials*. J Craniofac Surg, 1998. **9**(4): p. 310-6.
63. Vajjgel, A., et al., *A systematic review on the critical size defect model*. Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(8): p. 879-93.
64. Berendsen, A.D. and B.R. Olsen, *Bone development*. Bone, 2015. **80**: p. 14-18.
65. Runyan, C.M., R.L. Flores, and J.G. McCarthy, *Distraction Osteogenesis: Biologic and Biomechanical Principles*, in *Craniofacial Distraction*. 2017, Springer. p. 11-43.
66. Steinmetz, N.J., et al., *Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering*. Acta biomaterialia, 2015. **21**: p. 142-153.
67. John Bilezikian, T.J.M., Thomas Clemens, Clifford Rosen, *Principles of Bone Biology 4th Edition*. 2019, Academic Press
68. Gomes, P.S. and M.H. Fernandes, *Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies*. Lab Anim, 2011. **45**(1): p. 14-24.
69. Younger, E.M. and M.W. Chapman, *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma, 1989. **3**(3): p. 192-5.
70. Zimmermann, G. and A. Moghaddam, *Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes*. Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S16-21.

71. Marin, E., F. Boschetto, and G. Pezzotti, *Biomaterials and biocompatibility: An historical overview*. J Biomed Mater Res A, 2020.
72. Chocholata, P., V. Kulda, and V. Babuska, *Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration*. Materials (Basel), 2019. **12**(4).
73. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
74. Schroeder, J.E. and R. Mosheiff, *Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence*. Injury, 2011. **42**(6): p. 609-13.
75. Vallet-Regí, M., I. Izquierdo-Barba, and M. Colilla, *Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2012. **370**(1963): p. 1400-21.
76. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Key terminology in biomaterials and biocompatibility*. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2019. **10**: p. 45-50.
77. Williams, D.F., *Biomaterials and biocompatibility*. Med Prog Technol, 1976. **4**(1-2): p. 31-42.
78. Seppänen-Kaijansinkko, R., *Tissue Engineering in Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019: Springer Nature.
79. Khan, W.S., et al., *An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we?* Stem cells international, 2012. **2012**.
80. Iaquina, M.R., et al., *Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 268.
81. Bitar, M., et al., *Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(2): p. 237-44.
82. Griffanti, G. and S.N. Nazhat, *Dense fibrillar collagen-based hydrogels as functional osteoid-mimicking scaffolds*. International Materials Reviews, 2020: p. 1-20.
83. Coyac, B.R., et al., *Mineralization of dense collagen hydrogel scaffolds by human pulp cells*. J Dent Res, 2013. **92**(7): p. 648-54.
84. Wegst, U.G., et al., *Bioinspired structural materials*. Nature materials, 2015. **14**(1): p. 23-36.
85. Cen, L., et al., *Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications*. Pediatric research, 2008. **63**(5): p. 492-496.
86. Taguchi, Y., et al., *A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane*. Biomaterials, 2005. **26**(31): p. 6158-66.
87. Meyer, M., *Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties*. Biomedical engineering online, 2019. **18**(1): p. 24.
88. Rosenbaum, A.J., D.A. Grande, and J.S. Dines, *The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment*. Organogenesis, 2008. **4**(1): p. 23-7.



89. Gomez-Salazar, M., et al., *Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant?* *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020. **8**(148).
90. Friedenstein, A., R. Chailakhyan, and U. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. *Cell proliferation*, 1987. **20**(3): p. 263-272.
91. Pommey, S. and J. Galipeau, *The use of mesenchymal stromal cells in oncology and cell therapy*. *Bulletin du Cancer*, 2006. **93**(9): p. 901-907.
92. Manfrini, M., et al., *Mesenchymal stem cells from patients to assay bone graft substitutes*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(6): p. 1229-37.
93. Fitzsimmons, R.E.B., et al., *Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. *Stem Cells Int*, 2018. **2018**: p. 8031718.
94. Rosenbaum, A.J., D.A. Grande, and J.S. Dines, *The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: a global assessment*. *Organogenesis*, 2008. **4**(1): p. 23-27.
95. Pisciotta, A., et al., *Stem cells isolated from human dental pulp and amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice*. *Stem Cell Res Ther*, 2015. **6**(1): p. 156.
96. Liu, J., et al., *Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells*. *Stem cells*, 2015. **33**(3): p. 627-638.
97. Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine*. *J Dent Res*, 2009. **88**(9): p. 792-806.
98. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
99. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(25): p. 13625-13630.
100. Wang, X., et al., *Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells*. *Arch Oral Biol*, 2012. **57**(9): p. 1231-40.
101. Botelho, J., et al., *Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine*. *Ann Med*, 2017. **49**(8): p. 644-651.
102. de Mendonça Costa, A., et al., *Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells*. *J Craniofac Surg*, 2008. **19**(1): p. 204-10.
103. Chamieh, F., et al., *Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38814.
104. Zheng, Y., et al., *Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine*. *J Dent Res*, 2009. **88**(3): p. 249-54.

105. d'Aquino, R., et al., *Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes*. Eur Cell Mater, 2009. **18**: p. 75-83.
106. Giuliani, A., et al., *Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(4): p. 316-24.
107. Roberts, S.J. and H.Z. Ke, *Anabolic Strategies to Augment Bone Fracture Healing*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(3): p. 289-298.
108. Delgado-Calle, J., A.Y. Sato, and T. Bellido, *Role and mechanism of action of sclerostin in bone*. Bone, 2017. **96**: p. 29-37.
109. Poole, K.E., et al., *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation*. Faseb j, 2005. **19**(13): p. 1842-4.
110. Lin, C., et al., *Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling*. J Bone Miner Res, 2009. **24**(10): p. 1651-61.
111. Li, X., et al., *Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19883-7.
112. Baron, R. and M. Kneissel, *WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 179-92.
113. Yorukoglu, A.C., et al., *A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 2374161.
114. La Noce, M., et al., *Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy*. J Dent, 2014. **42**(7): p. 761-8.
115. Tatullo, M., et al., *Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(11): p. 1205-16.
116. Kunimatsu, R., et al., *Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **501**(1): p. 193-198.
117. Le Douarin, N.M., G.W. Calloni, and E. Dupin, *The stem cells of the neural crest*. Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1013-9.
118. Quarto, N., et al., *Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1680-94.
119. Behnia, A., et al., *Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect*. World J Stem Cells, 2014. **6**(4): p. 505-10.
120. Ramamoorthi, M., et al., *Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells in Preclinical Studies: A Systematic Review Using Modified*

- ARRIVE and CONSORT Guidelines*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 378368.
121. Bose, S., et al., *Dry vs. wet: Properties and performance of collagen films. Part II. Cyclic and time-dependent behaviours*. J Mech Behav Biomed Mater, 2020. **112**: p. 104040.
  122. Ferreira, A.M., et al., *Collagen for bone tissue regeneration*. Acta Biomater, 2012. **8**(9): p. 3191-200.
  123. Ajallouei, F., et al., *Compressed collagen constructs with optimized mechanical properties and cell interactions for tissue engineering applications*. Int J Biol Macromol, 2018. **108**: p. 158-166.
  124. Griffanti, G. and S.N. Nazhat, *Dense fibrillar collagen-based hydrogels as functional osteoid-mimicking scaffolds*. International Materials Reviews, 2020. **65**(8): p. 502-521.
  125. Novais, A., et al., *Priming Dental Pulp Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Mineralization Within Tissue-Engineered Constructs Implanted in Craniofacial Bone Defects*. Stem Cells Transl Med, 2019. **8**(8): p. 844-857.
  126. Collignon, A.M., et al., *Mouse Wnt1-CRE-Rosa(Tomato) Dental Pulp Stem Cells Directly Contribute to the Calvarial Bone Regeneration Process*. Stem Cells, 2019. **37**(5): p. 701-711.
  127. Brown, R.A., et al., *Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano-and microstructures by plastic compression*. Advanced Functional Materials, 2005. **15**(11): p. 1762-1770.
  128. Rajan, N., et al., *Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2753-8.
  129. Pedraza, C.E., et al., *An in vitro assessment of a cell-containing collagenous extracellular matrix-like scaffold for bone tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(3): p. 781-93.
  130. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1468-86.
  131. Lafont, J., et al., *RGTA11, a new healing agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats*. Growth Factors, 1998. **16**(1): p. 23-38.
  132. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
  133. Guilbert, T., et al., *A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy*. Opt Express, 2010. **18**(25): p. 25794-807.
  134. Liu, M., et al., *Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss*. J Dent Res, 2018. **97**(9): p. 1031-1038.
  135. Albiol, L., et al., *Effects of Long-Term Sclerostin Deficiency on Trabecular Bone Mass and Adaption to Limb Loading Differ in Male and Female Mice*. Calcif Tissue Int, 2020. **106**(4): p. 415-430.

136. Stegen, S., et al., *Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2557.
137. Fabre, S., T. Funck-Brentano, and M. Cohen-Solal, *Anti-Sclerostin Antibodies in Osteoporosis and Other Bone Diseases*. J Clin Med, 2020. **9**(11).
138. Yee, C.S., et al., *Sclerostin antibody treatment improves fracture outcomes in a Type I diabetic mouse model*. Bone, 2016. **82**: p. 122-34.
139. Yao, W., et al., *Sclerostin-antibody treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis maintained bone mass and strength*. Osteoporos Int, 2016. **27**(1): p. 283-294.
140. Hu, B., et al., *Functional reconstruction of critical-sized load-bearing bone defects using a Sclerostin-targeting miR-210-3p-based construct to enhance osteogenic activity*. Acta Biomater, 2018. **76**: p. 275-282.
141. Roschger, A., et al., *Effect of sclerostin antibody treatment in a mouse model of severe osteogenesis imperfecta*. Bone, 2014. **66**: p. 182-8.
142. Pathak, J.L., N. Bravenboer, and J. Klein-Nulend, *The Osteocyte as the New Discovery of Therapeutic Options in Rare Bone Diseases*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 405.
143. Russow, G., et al., *Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
144. McGee-Lawrence, M.E., et al., *Sclerostin deficient mice rapidly heal bone defects by activating  $\beta$ -catenin and increasing intramembranous ossification*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 886-90.
145. Kang, K.S., et al., *Loss of mechanosensitive sclerostin may accelerate cranial bone growth and regeneration*. Journal of neurosurgery, 2018. **129**(4): p. 1085-1091.
146. Aurrekoetxea, M., et al., *Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 289.
147. Collignon, A.M., et al., *Early angiogenesis detected by PET imaging with (64)Cu-NODAGA-RGD is predictive of bone critical defect repair*. Acta Biomater, 2018. **82**: p. 111-121.
148. Santagati, F. and F.M. Rijli, *Cranial neural crest and the building of the vertebrate head*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(10): p. 806-18.
149. Oryan, A., et al., *Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: what is the evidence?* Cells Tissues Organs, 2017. **204**(2): p. 59-83.
150. Sharma, K., M.A. Mujawar, and A. Kaushik, *State-of-Art Functional Biomaterials for Tissue Engineering*. Frontiers in Materials, 2019. **6**(172).
151. Li, M., et al., *Sustained-release of sclerostin single-chain antibody fragments using poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for osteoporotic fracture repair*. J Biomed Mater Res A, 2019. **107**(8): p. 1832-1840.

152. Canalis, E., *MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Novel anabolic treatments for osteoporosis*. Eur J Endocrinol, 2018. **178**(2): p. R33-r44.
153. Iolascon, G., et al., *Pharmacological Therapy of Osteoporosis: What's New?* Clin Interv Aging, 2020. **15**: p. 485-491.
154. Saag, K.G., et al., *Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis*. N Engl J Med, 2017. **377**(15): p. 1417-1427.
155. Linda M. Ernst, E.D.R., Chrystalle Katte Carreon, Dale S. Huff *Color Atlas of Human Fetal and Neonatal Histology* 2019: Springer Nature Switzerland AG.