



جامعة محمد الخامس بالرباط  
Université Mohammed V de Rabat

**UNIVERSITE MOHAMMED V-RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET DE  
PHARMACIE RABAT**



**ANNEE : 2021**

**THESE N°:153**

**BIOTECHNOLOGIE, L'APPORT DE LA CELLULE  
SOUCHE DANS L'ORTHOPÉDIE.**

**THÈSE**

*Présentée et soutenue publiquement le : .....*

**PAR**

**Mr INHAD ZAKARIA**

**Né le 27/10/1995 à Tanger**

**Pour l'Obtention du diplôme de  
Docteur en Médecine**

**MOTS CLÉS: cellules souches - thérapie cellulaire – l'orthopédie.**

**Mme NAIMA EL HAFIDI**

Professeur de Pédiatrie

**PRESIDENTE**

**Mr AZEDDINE IBRAHIMI**

Professeur de biotechnologie

**RAPPORTEUR**

**Mme MOUNA AHMED**

Professeur de biotechnologie

**JUGE**

وقل كثر في علما

العلم كثر فلا تفتنى ذخائره والمراء ما زاد علما زاد بالرتب  
العلم كثر فلا تفتنى ذخائره والمراء ما زاد علما زاد بالرتب



**UNIVERSITE MOHAMMED V  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE  
RABAT**

**DOYENS HONORAIRES :**

1962 – 1969: Professeur Abdelmalek FARAJ  
1969 – 1974: Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981: Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989: Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003: Professeur AbdelmajidBELMAHI  
2003 - 2013: Professeur Najia HAJJAJ – HASSOUNI

**ADMINISTRATION :**

***Doyen***

**Professeur Mohamed ADNAOUI**

***Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et Estudiantines***

**Professeur Brahim LEKEHAL**

***Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération***

**Professeur Toufiq DAKKA**

***Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie***

**Professeur Younes RAHALI**

***Secrétaire Général***

**Mr. Mohamed KARRA**

***\* Enseignants Militaires***

## 1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

### PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

#### Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz

Médecine Interne – Clinique Royale

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi

Anesthésie -Réanimation

Pr. SETTAF Abdellatif

Pathologie Chirurgicale

#### Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed

Médecine Interne – Doyen de la FMPR

Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Neurologie

#### Janvier et Novembre 1990

Pr. KHARBACH Aïcha

Gynécologie -Obstétrique

Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

#### Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim

Anesthésie Réanimation- Doyen de FMPO

Pr. BAYAHIA Rabéa

Néphrologie

Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Chirurgie Générale

Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif

Chirurgie Générale

Pr. BENSOUHA Yahia

Pharmacie galénique

Pr. BERRAHO Amina

Ophtalmologie

Pr. BEZAD Rachid

Gynécologie Obstétrique

#### Méd.Chef Maternité des Orangers

Pr. CHERRAH Yahia

Pharmacologie

Pr. CHOKAIRI Omar

Histologie Embryologie

Pr. KHATTAB Mohamed

Pédiatrie

Pr. SOULAYMANI Rachida

Pharmacologie- Dir. du Centre National PV Rabat

Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique \_\_\_\_\_

#### Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed

Chirurgie Générale Doyen de FMPT

Pr. BENSOUHA Adil

Anesthésie Réanimation

Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza

Gastro-Entérologie

Pr. CHRAIBI Chafiq

Gynécologie Obstétrique

Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Neurochirurgie

Pr. FELLAT Rokaya

Cardiologie

Pr. JIDDANE Mohamed

Anatomie

Pr. TAGHY Ahmed

Chirurgie Générale

Pr. ZOUHDI Mimoun

Microbiologie

\* *Enseignants Militaires*

### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. ERROUGANI Abdelkader  
Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. EL MESNAOUI Abbes  
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

### **Décembre 1996**

Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan  
Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques

*Doyen de la FMPA*

Gynécologie Obstétrique  
Chirurgie Générale – *Directeur du CHIS*  
Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Gynécologie – Obstétrique  
Dermatologie

Urologie *Inspecteur du SSM*

Pédiatrie  
Traumatologie – Orthopédie  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Urologie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Néphrologie  
Cardiologie *Directeur HMI Mohammed V*

**\* Enseignants Militaires**

### Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BIROUK Nazha  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. TOUFIQ Jallal  
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

### Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI  
Pr. BOUGTAB  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. BENKIRANE Majid\*

### Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUAMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN DakhamaBadr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

### Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AJANA Fatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Gynécologie-Obstétrique  
Neurologie  
Cardiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Psychiatrie Directeur Hôp.Ar-razi Salé  
Gynécologie Obstétrique

Neurologie Doyen de la FMP Abulcassis  
Abdesslam Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Hématologie

Pneumo-phtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie Directeur Hôp. My Youssef  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne

Neurologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie - Directeur Hôp.Cheikh Zaid  
Urologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Pédiatrie

\* Enseignants Militaires

### Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BENABDELJLIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOUACHANE Thami  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSI Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Said  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

### Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOU Youssef \*  
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
Pr. BENZEKRI Laila  
Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
Pr. BERNOUSSI Zakiya

Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-Entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie - Directeur Hôp. Univ. Cheikh Khalifa  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie Générale Directeur Hôpital Ibn Sina  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
*V-D chargé Aff Acad. Est.*

Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie Dir.-Adj. HMI Mohammed V  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique

**\* Enseignants Militaires**

Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
Pr. CHKIRATE Bouchra  
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair  
Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
Pr. HAJJI Zakia  
Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
Pr. KRIOUILE Yamina  
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
Pr. OUJILAL Abdelilah  
Pr. RAISS Mohamed  
Pr. SIAH Samir \*  
Pr. THIMOU Amal  
Pr. ZENTAR Aziz\*

#### **Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
Pr. AMRANI Mariam  
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
Pr. BOULAADAS Malik  
Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
Pr. CHAGAR Belkacem\*  
Pr. CHERRADI Nadia  
Pr. EL FENNI Jamal\*  
Pr. EL HANCHI ZAKI  
Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
Pr. HACHI Hafid  
Pr. JABOUIRIK Fatima  
Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. MOUGHIL Said  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre \*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMI Fouad  
Pr. ZARZUR Jamila

#### **Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
Pr. ALLALI Fadoua  
Pr. AMAZOUZI Abdellah  
Pr. BAHIRI Rachid  
Pr. BARKAT Amina

Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Chirurgie Pédiatrique  
Dermatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Gynécologie Obstétrique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie Réanimation  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale

Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Radiologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Ophtalmologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Rhumatologie  
Ophtalmologie  
Rhumatologie *Directeur Hôp. Al Ayachi Salé*  
Pédiatrie

**\* Enseignants Militaires**

Pr. BENYASS Aatif  
Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. HAJJI Leila  
Pr. HESSISEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najia

**AVRIL 2006**

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*

Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

**Octobre 2007**

Pr. ABIDI Khalid  
Pr. ACHACHI Leila  
Pr. ACHOUR Abdessamad\*

Cardiologie  
Biophysique  
Cardiologie (*mise en disponibilité*)  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

Rhumatologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire.

**Directeur Hôpital Ibn Sina Marr.**

Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Médecine Interne  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale  
Pneumo phtisiologie  
Chirurgie générale

**\* Enseignants Militaires**

Pr. AIT HOUSSA Mahdi \*  
 Pr. AMHAJJI Larbi \*  
 Pr. AOUI Sarra  
 Pr. BAITE Abdelouahed \*  
 Pr. BALOUCH Lhousaine \*  
 Pr. BENZIANE Hamid \*  
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
 Pr. CHERKAOUI Naoual \*  
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader \*  
 Pr. EL BEKKALI Youssef \*  
 Pr. EL ABSI Mohamed  
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
 Pr. EL OMARI Fatima  
 Pr. GHARIB Noureddine  
 Pr. HADADI Khalid \*  
 Pr. ICHOU Mohamed \*  
 Pr. ISMAILI Nadia  
 Pr. KEBDANI Tayeb  
 Pr. LOUZI Lhousain \*  
 Pr. MADANI Naoufel  
 Pr. MAHI Mohamed \*  
 Pr. MARC Karima  
 Pr. MASRAR Azlarab  
 Pr. MRANI Saad \*  
 Pr. OUZZIF Ezzohra \*  
 Pr. RABHI Monsef \*  
 Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
 Pr. SEFFAR Myriame  
 Pr. SEKHSOKH Yessine \*  
 Pr. SIFAT Hassan \*  
 Pr. TABERKANET Mustafa \*  
 Pr. TACHFOUTI Samira  
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
 Pr. TANANE Mansour \*  
 Pr. TLIGUI Houssain  
 Pr. TOUATI Zakia

**Mars 2009**

Pr. ABOUZAHIR Ali \*  
 Pr. AGADR Aomar \*  
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim \*  
 Pr. AKHADDAR Ali \*

Chirurgie cardio vasculaire  
 Traumatologie orthopédie  
 Parasitologie  
 Anesthésie réanimation  
 Biochimie-chimie  
 Pharmacie clinique  
 Ophtalmologie  
 Pharmacie galénique  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie cardio-vasculaire  
 Chirurgie générale  
 Anesthésie réanimation  
 Psychiatrie  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Radiothérapie  
 Oncologie médicale  
 Dermatologie  
 Radiothérapie  
 Microbiologie  
 Réanimation médicale  
 Radiologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Hématologie biologique  
 Virologie  
 Biochimie-chimie  
 Médecine interne  
 Radiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Radiothérapie  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Ophtalmologie  
 Chirurgie générale  
 Traumatologie-orthopédie  
 Parasitologie  
 Cardiologie

Médecine interne  
 Pédiatrie  
 Chirurgie Générale  
 Neuro-chirurgie

**\* Enseignants Militaires**

Pr. ALLALI Nazik  
 Pr. AMINE Bouchra  
 Pr. ARKHA Yassir  
 Pr. BELYAMANI Lahcen \*  
 Pr. BJIJOU Younes  
 Pr. BOUHSAIN Sanae \*  
 Pr. BOUI Mohammed \*  
 Pr. BOUNAIM Ahmed \*  
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha \*  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik \*  
 Pr. DOGHMI Kamal \*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
 Pr. ENNIBI Khalid \*  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. HASSIKOU Hasna \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. KABIRI Meryem  
 Pr. KARBOUBI Lamya  
 Pr. LAMSAOURI Jamal \*  
 Pr. MARMADE Lahcen  
 Pr. MESKINI Toufik  
 Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
 Pr. MSSROURI Rahal  
 Pr. NASSAR Ittimade  
 Pr. OUKERRAJ Latifa  
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*

**Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
 Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
 Pr. BELAGUID Abdelaziz  
 Pr. CHADLI Mariama\*  
 Pr. CHEMSI Mohamed\*  
 Pr. DAMI Abdellah\*  
 Pr. DARBI Abdellatif\*  
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
 Pr. EL HAFIDI Naima  
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
 Pr. EL MAZOUZ Samir

Radiologie  
 Rhumatologie  
 Neuro-chirurgie *Directeur Hôp.des Spécialités*  
 Anesthésie Réanimation  
 Anatomie  
 Biochimie-chimie  
 Dermatologie  
 Chirurgie Générale  
 Traumatologie-orthopédie  
 Chirurgie Vasculaire Périphérique  
 Hématologie clinique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie  
 Médecine interne  
 Gynécologie obstétrique  
 Rhumatologie  
 Gastro-entérologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Chimie Thérapeutique  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Pédiatrie  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie Générale  
 Radiologie  
 Cardiologie  
 Pneumo-Phtisiologie

Anesthésie réanimation  
 Médecine Interne *Directeur ERSSM*  
 Physiologie  
 Microbiologie  
 Médecine Aéronautique  
 Biochimie- Chimie  
 Radiologie  
 Chirurgie Pédiatrique  
 Pédiatrie  
 Radiologie  
 Chirurgie Plastique et Réparatrice

**\* Enseignants Militaires**

Pr. EL SAYEGH Hachem  
Pr. ERRABIH Ikram  
Pr. LAMALMI Najat  
Pr. MOSADIK Ahlam  
Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. ZOUAIDIA Fouad

**Decembre 2010**

Pr. ZNATI Kaoutar

**Mai 2012**

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil \*  
Pr. BENCHEBBA Driss \*  
Pr. DRISSI Mohamed \*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL OUAZZANI Hanane \*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. RAISSOUNI Maha \*

**Février 2013**

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOR Mourad  
Pr. AWAB Almahti  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
Pr. BENSghir Mustapha \*  
Pr. BENYAHIA Mohammed \*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba  
Pr. CHAIB Ali \*  
Pr. DENDANE Tarek

Urologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Hématologie  
Anatomie Pathologique

Anatomie Pathologique

Chirurgie pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Traumatologie-orthopédie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie Pathologique  
Cardiologie

Pharmacologie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie  
Informatique Pharmaceutique  
Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chimie Analytique et Bromatologie  
Traumatologie orthopédie  
Anatomie  
Cardiologie  
Réanimation Médicale

**\* Enseignants Militaires**

Pr. DINI Nouzha *	Pédiatrie
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali	Anesthésie Réanimation
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa	Radiologie
Pr. ELFATEMI Nizare	Neuro-chirurgie
Pr. EL GUERROUJ Hasnae	Médecine Nucléaire
Pr. EL HARTI Jaouad	Chimie Thérapeutique
Pr. EL JAOUDI Rachid *	Toxicologie
Pr. EL KABABRI Maria	Pédiatrie
Pr. EL KHANNOUSSI Basma	Anatomie Pathologique
Pr. EL KHLOUFI Samir	Anatomie
Pr. EL KORAICHI Alae	Anesthésie Réanimation
Pr. EN-NOUALI Hassane *	Radiologie
Pr. ERRGUIG Laila	Physiologie
Pr. FIKRI Meryem	Radiologie
Pr. GHFIR Imade	Médecine Nucléaire
Pr. IMANE Zineb	Pédiatrie
Pr. IRAQI Hind	Endocrinologie et maladies métaboliques
Pr. KABBAJ Hakima	Microbiologie
Pr. KADIRI Mohamed *	Psychiatrie
Pr. LATIB Rachida	Radiologie
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra	Médecine Interne
Pr. MEDDAH Bouchra	Pharmacologie
Pr. MELHAOUI Adyl	Neuro-chirurgie
Pr. MRABTI Hind	Oncologie Médicale
Pr. NEJJARI Rachid	Pharmacognosie
Pr. OUBEJJA Houda	Chirurgie Pédiatrique
Pr. OUKABLI Mohamed *	Anatomie Pathologique
Pr. RAHALI Younes	Pharmacie Galénique <i>Vice-Doyen à la Pharmacie</i>
Pr. RATBI Ilham	Génétique
Pr. RAHMANI Mounia	Neurologie
Pr. REDA Karim *	Ophtalmologie
Pr. REGRAGUI Wafa	Neurologie
Pr. RKAIN Hanan	Physiologie
Pr. ROSTOM Samira	Rhumatologie
Pr. ROUAS Lamiaa	Anatomie Pathologique
Pr. ROUIBAA Fedoua *	Gastro-Entérologie
Pr SALIHOUN Mouna	Gastro-Entérologie
Pr. SAYAH Rochde	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. SEDDIK Hassan *	Gastro-Entérologie
Pr. ZERHOUNI Hicham	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ZINE Ali *	Traumatologie Orthopédie

**\* Enseignants Militaires**

### **AVRIL 2013**

Pr. EL KHATIB MOHAMED KARIM \*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

### **MARS 2014**

Pr. ACHIR Abdellah  
Pr. BENCHAKROUN Mohammed \*  
Pr. BOUCHIKH Mohammed  
Pr. EL KABBAJ Driss \*  
Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira \*  
Pr. HARDIZI Houyam  
Pr. HASSANI Amale\*  
Pr. HERRAK Laila  
Pr. JANANE Abdellah \*  
Pr. JEAIDI Anass\*  
Pr. KOUACH Jaouad\*  
Pr. LEMNOUER Abdelhay\*  
Pr. MAKRAM Sanaa \*  
Pr. OULAHYANE Rachid\*  
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar  
Pr. SEKKACH Youssef\*  
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Chirurgie Thoracique  
Traumatologie- Orthopédie  
Chirurgie Thoracique  
Néphrologie  
Biochimie-Chimie  
Histologie- Embryologie-Cytogénétique  
Pédiatrie  
Pneumologie  
Urologie  
Hématologie Biologique  
Génécologie-Obstétrique  
Microbiologie  
Pharmacologie  
Chirurgie Pédiatrique  
CCV  
Médecine Interne  
Génécologie-Obstétrique

### **DECEMBRE 2014**

Pr. ABILKACEM Rachid\*  
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila  
Pr. BEKKALI Hicham \*  
Pr. BENAZZOU Salma  
Pr. BOUABDELLAH Mounya  
Pr. BOUCHRIK Mourad\*  
Pr. DERRAJI Soufiane\*  
Pr. DOBLALI Taoufik  
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali  
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim\*  
Pr. EL MARJANY Mohammed\*  
Pr. FEJJAL Nawfal  
Pr. JAHIDI Mohamed\*  
Pr. LAKHAL Zouhair\*  
Pr. OUDGHIRI NEZHA  
Pr. RAMI Mohamed  
Pr. SABIR Maria  
Pr. SBAI IDRISSE Karim\*

Pédiatrie  
Médecine Légale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Maxillo-Faciale  
Biochimie-Chimie  
Parasitologie  
Pharmacie Clinique  
Microbiologie  
Anatomie  
Anesthésie-Réanimation  
Radiothérapie  
Chirurgie Réparatrice et Plastique  
O.R.L  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Psychiatrie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

**\* Enseignants Militaires**

### **AOUT 2015**

Pr. MEZIANE Meryem  
Pr. TAHIRI Latifa

Dermatologie  
Rhumatologie

### **PROFESSEURS AGREGES :**

### **JANVIER 2016**

Pr. BENKABBOU Amine  
Pr. EL ASRI Fouad\*  
Pr. ERRAMI Noureddine\*  
Pr. NITASSI Sophia

Chirurgie Générale  
Ophtalmologie  
O.R.L  
O.R.L

### **JUIN 2017**

Pr. ABBI Rachid\*  
Pr. ASFALOU Ilyasse\*  
Pr. BOUAITI El Arbi\*  
Pr. BOUTAYEB Saber  
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim  
Pr. HAFIDI Jawad  
Pr. MAJBAR Mohammed Anas  
Pr. OURAINI Saloua\*  
Pr. RAZINE Rachid  
Pr. SOUADKA Amine  
Pr. ZRARA Abdelhamid\*

Microbiologie  
Cardiologie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.  
Oncologie Médicale  
Oncologie Médicale  
Anatomie  
Chirurgie générale  
O.R.L  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.  
Chirurgie générale  
Immunologie

### **Mai 2018**

Pr. AMMOURI Wafa  
Pr. BENTALHA Aziza  
Pr. EL AHMADI Brahim  
Pr. EL HARRECH Youness\*\*  
Pr. EL KACEMI Hanan  
Pr. EL MAJJAOUI Sanaa  
Pr. FATIHI Jamal\*  
Pr. GHANNAM Abdel ilah  
Pr. JROUNDI Imane  
Pr. MOATASSIM BILLAH Nabil  
Pr. TADILI Sidi Jawad  
Pr. TANZ Rachid\*

Médecine interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie –Réanimation  
urologie  
Radiothérapie  
Radiothérapie  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Médecine préventive, santé publique et Hyg  
Radiologie  
Anesthésie Réanimation  
Oncologie Médicale

### **NOVEMBRE 2018**

Pr. AMELLAL Mina  
Pr. SOULY Karim  
Pr. TAHRI Rajae

Anatomie  
Microbiologie  
Histologie-Embryologie-Cytogénétique

**\* Enseignants Militaires**

## **NOVEMBRE 2019**

Pr. AATIF Taoufiq \*  
Pr. ACHBOUK Abdelhafid \*  
Pr. ANDALOUSSI SAGHIR Khalid \*  
Pr. BABA HABIB Moulay Abdellah \*  
Pr. BASSIR RIDA ALLAH  
Pr. BOUATTAR TARIK  
Pr. BOUFETTAL MONSEF  
Pr. BOUCHENTOUF Sidi Mohammed \*  
Pr. BOUZELMAT Hicham \*  
Pr. BOUKHRIS Jalal \*  
Pr. CHAFRY Bouchaib \*  
Pr. CHAHDI Hafsa \*  
Pr. CHERIF EL ASRI Abad \*  
Pr. DAMIRI Amal \*  
Pr. DOGHMI Nawfal \*  
Pr. ELALAOUI Sidi-Yassir  
Pr. EL ANNAZ Hicham \*  
Pr. EL HASSANI Moulay EL Mehdi \*  
Pr. EL HJOUJI Aabderrahman \*  
Pr. EL KAOUI Hakim \*  
Pr. EL WALI Abderrahman \*  
Pr. EN-NAFAA Issam \*  
Pr. HAMAMA Jalal \*  
Pr. HEMMAOUI Bouchaib \*  
Pr. HJIRA Naoufal \*  
Pr. JIRA Mohamed \*  
Pr. JNIENE Asmaa  
Pr. LARAQUI Hicham \*  
Pr. MAHFOUD Tarik \*  
Pr. MEZIANE Mohammed \*  
Pr. MOUTAKI ALLAH Younes \*  
Pr. MOUZARI Yassine \*  
Pr. NAOUI Hafida \*  
Pr. OBTEL Majdouline  
Pr. OURRAI Abdelhakim \*  
Pr. SAOUAB Rachida \*  
Pr. SBITTI Yassir \*  
Pr. ZADDOUG Omar \*  
Pr. ZIDOUH Saad \*

Néphrologie  
Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Radiothérapie  
Gynécologie-obstétrique  
Anatomie  
Néphrologie  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Traumatologie-orthopédie  
Traumatologie-orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Neurochirurgie  
Anatomie Pathologique  
Anesthésie-réanimation  
Pharmacie Galénique  
Virologie  
Gynécologie-obstétrique  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-réanimation  
Radiologie  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
O.R.L  
Dermatologie  
Médecine Interne  
Physiologie  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Anesthésie-réanimation  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Ophtalmologie  
Parasitologie-Mycologie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.  
Pédiatrie  
Radiologie  
Oncologie Médicale  
Traumatologie Orthopédie  
Anesthésie-réanimation

**\* Enseignants Militaires**

## **2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUES PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie-chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr .BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. RIDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

### **PROFESSEURS HABILITES**

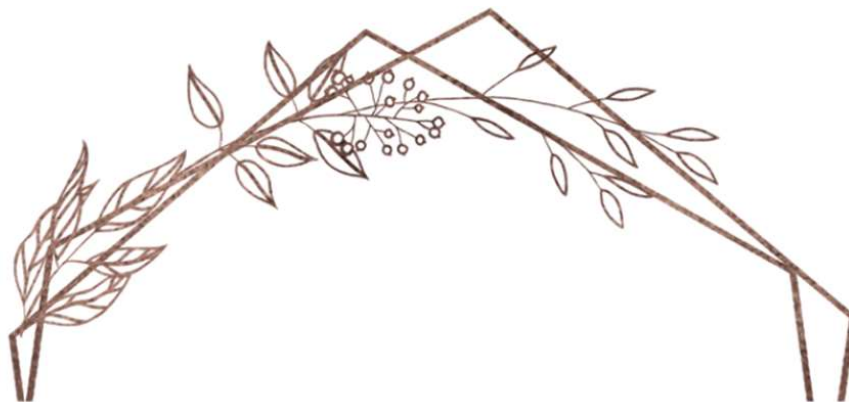
Pr BENZID Hanane	Chimie
Pr. CHAHED OUAZZANI LallaChadia	Biochimie-chimie
Pr DOUKKALI Anass	Chimie Analytique
Pr. EL JASTIMI Jamila	Chimie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr LYAHYAI Jaber	Génétique
Pr OUADGHIRI Mouna	Microbiologie et Biologie
Pr RAMLI Youssef	Chimie
Pr SERRAGUI Samira	Pharmacologie
Pr TAZI Ahnini	Génétique
Pr. YAGOUBI Maamar	Eau, Environnement

*Mise à jour le 05/03/2021*

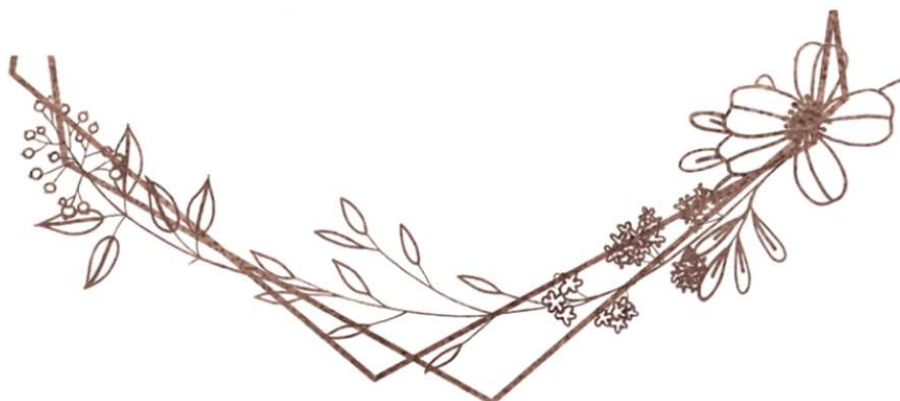
***KHALED Abdellah***

***Chef du Service des Ressources Humaines***

***FMPR***



## DEDICACES



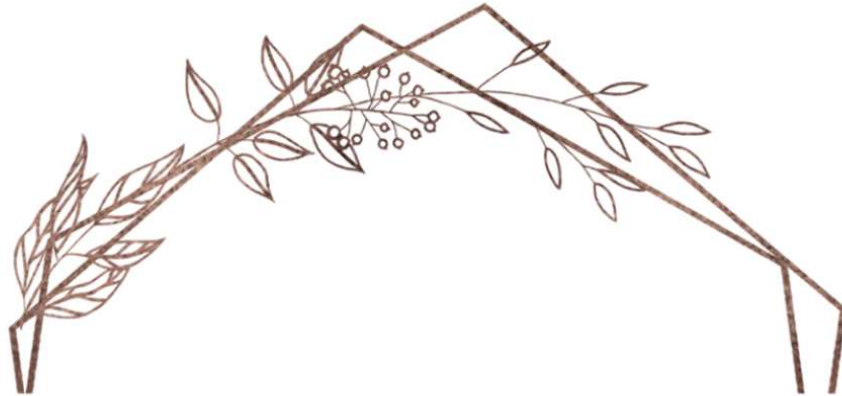
*Je dédie cette thèse à...*

*À*

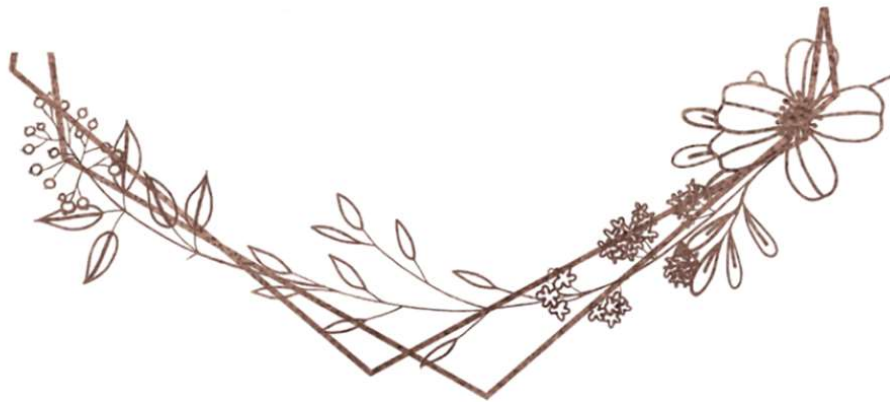
*Tous ceux ou celles qui me sont chers.*

*Tous mes enseignants tout au long de mes études.*

*Tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.*



# REMERCIEMENTS



-Je dédie cette thèse :

*À notre maître et juge de thèse  
Madame NAÏMA EL HAFIDI  
Professeur de Pédiatrie*

*Vous nous faites l'honneur de présider ce jury et de juger notre travail.  
Je tiens à exprimer ma gratitude pour votre contribution à la recherche  
et au temps que vous consacrez à la formation des étudiants.  
Veuillez trouver cher professeur l'expression de ma profonde et  
respectueuse reconnaissance.*

*À notre maître et rapporteur de thèse*  
*Monsieur le professeur AZEDDINE IBRAHIMI*  
*Directeur Du Laboratoire de Biotechnologie RABAT*

*A mon Directeur de Thèse, Vous avez accepté de me soutenir et de m'accompagner tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse. Vous m'avez fourni d'excellents conseils dans le monde de la recherche.*

*Malgré vos obligations professionnelles, vous avez toujours eu temps pour moi et notre projet de recherche.*

*Votre expérience et vos valeurs cristallines m'ont beaucoup aidé et ont rendu mon travail facile. Cela a été un plaisir de travailler avec vous.*

*Recevez ma sincère gratitude et mes profonds respects.*

*À notre maître et juge de thèse  
Madame MOUNA AHMED  
Professeur de biotechnologie*

*Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience au jugement de ce travail en siégeant dans mon jury de thèse.*

*Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération et mon admiration pour vos qualités d'enseignement.*

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: image montrant le système endomembranaire d'une cellule.....	8
Figure 2: Le microscope optique .....	15
Figure 3: comparaison tubules rénaux images prises avec microscope photonique ordinaire a gauche et microscope a contraste de phase a droite. ....	15
Figure 4 : microscopie électronique a balayage .....	15
Figure 5: microscopie électronique a transmission .....	16
Figure 6: Principe général de la cytométrie en flux .....	18
Figure 7: la courbe de Hayflick ,nombre limité de divisions cellulaires.....	23
Figure 8 : boites ou flasks.....	24
Figure 9: culture grâce au microscope inversé.....	24
Figure 10: Division asymétrique des cellules souches .....	27
Figure 11 : destinées des cellules souches .....	28
Figure 12 : régulation des cellules souches par les cellules stromales de la niche .....	30
Figure 13 : types de cellules souches en fonction du stade de developpement ..	32
Figure 14 : stade blastocyste du développement embryonnaire .....	33
Figure 15: Thérapie cellulaire de lésions de brûlure cutanée radio induite (35)	55
Figure 16: forages multiples au niveau d'un condyle femoral .....	60
Figure 17: différentes étapes de la technique des micro-fractures.....	61
Figure 18: micro forages .....	62
Figure 19 : injection a la seringue de la matrice de collagene I et III .....	63
Figure 20 : mosaicoplasty avec site de prélèvement des carottes osteochondrales .....	64
Figure 21: carottes osteochondrales prelevees sur zone saine du cartilage;a gauche.....	64
Figure 22: zone greffée avec carottes osteochondrales ;a droite .....	64
Figure 23: étapes transplantaion autologue dans le chondrocyte.....	67
Figure 24: utilisation d'une matrice a la place du lambeau du périoste.....	67
Figure 25: analyse macroscopique des condyles fémoraux.....	78
Figure 26: analyse histologique des condyles fémoraux .....	79

Figure 27: Principes de l'ingénierie tissulaire.....	81
Figure 28: analyse macroscopique des différents groupes de genoux .....	85
Figure 29: microforages du condyle fémoral .....	92
Figure 30: injection de la matrice contenant les CSM .....	92
Figure 31: visualisation par arthroscopie de la régénération du cartilage chez un patient de 48 ans présentant une arthrose de stade IV.....	93
Figure 32: Arthroscanner du genou avant et après opération par micro forages et greffe de cellules souches.....	94
Figure 33: classification d'Arlet et Ficat .....	102
Figure 34: Trocart de Hauzeur en place pour l'injection de moelle .....	103
Figure 35: prélèvement de la moelle par aspiration au niveau des crêtes iliaques antérieures.....	105
Figure 36: patiente traitée par greffe de moelle ,diminution de la douleur au fil du temps.....	107
Tableau I: Les principales applications en thérapie cellulaire. ....	54

## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION :1

#### I -La cytologie :4

1- Historique :4

2- Définition :4

3- types cellulaires :5

#### **Échanges de substances**8

#### II -Découverte du microscope :9

1- Historique9

1- Généralités :10

3- La microscopie :10

3.1- Le microscope optique11

3.2- Le microscope électronique :12

4. Les méthodes de fractionnement subcellulaire :14

4.1- L'homogénéisation :14

4.2- L'ultracentrifugation différentielle14

4.3- La Centrifugation par gradient préformé15

4.4-la cytométrie en flux :16

4.5- microscope confocal :19

#### III- L'arrivée de la culture cellulaire :21

1- Origine des cellules21

2- Historique de la culture cellulaire22

3- Cellules souches25

3.1-Historique :25

3.2- Classification des cellules souches :33

3.2.1- Les cellules souches embryonnaires (CSE)33

#### IV-Thérapies cellulaires existantes :46

1-Greffe de cellules souches hématopoïétiques	:46
2- Greffe de cellules de la peau	:46
3-Holoclar ®, le premier médicament de thérapie cellulaire	:46
4-Les essais cliniques en cours	:48
V-L'APPORT de la thérapie cellulaire dans L'ORTHOPEDIE	:59
1-L arthrose	:59
1.1- Cartilage articulaire normal et arthrosique	<b>:Erreur ! Signet non défini.</b>
1.2- Procédures conventionnelles de réparation du cartilage	62
1.2.1--Technique des micro-fractures	:63
1.2.2- Greffe autologue ostéocondrale et mosaïcplasty	:66
1.2.3- Cellules souches et arthrose	:71
1.3- Quelles cellules souches ?	71
1.3.1-Les sources de CSM utilisables	:72
1.3.2-Propriétés des CSM pour traiter l'arthrose	:73
1.3.3- L'ingénierie tissulaire : outil indispensable pour traiter l'arthrose ?	76
1.3.4- Thérapies cellulaires et/ou ingénierie tissulaire à l'essai dans l'arthrose	:77
1.3.5- Discussion	:84
2- Ostéonécrose de la tête fémorale	89
2.1- Qu'est ce que c'est ?	89
2.2- Quelles sont les causes ?	89
2.3- Symptôme (signes cliniques)	91
2.4- Diagnostic / classification	91
2.5- Traitement médical	92
2.6- Traitement chirurgical, suites post opératoire et les complications	:94
2.7- apport thérapie cellulaire dans l ONA	<b>:Erreur ! Signet non défini.</b>
VI-Aspects éthiques, juridiques et religieux de la recherche sur les cellules souches humaines	:104
1-Définition	:104
2- contexte éthique	:106

2-1- Il est important de rappeler les principes éthiques fondamentaux :106

2.1.1- Le contexte éthique par conséquent se pose différemment selon le stade de prélèvement des cellules souches ou les principes cités peuvent être altérés dans un stade plus que l'autre :107

2.1.2- Le contexte juridique109

2.1.3- Contexte religieux110

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :117

## **INTRODUCTION :**

Au XVII<sup>e</sup> siècle, les naturalistes se trouvèrent mis en possession d'un merveilleux instrument, le microscope. Grâce au microscope se succédèrent les découvertes les plus passionnantes comme les plus inattendues, se révélèrent en foule des phénomènes qu'auparavant on avait dû penser à jamais impénétrables. Cette période si glorieuse pour l'esprit humain, il est à peine besoin de le dire, avait été admirablement préparée par les études des savants d'une époque antérieure : avec leurs yeux seuls, les observateurs avaient déjà fait beaucoup de découvertes. La pensée de recourir pour l'observation à l'emploi de verres grossissants ne pouvait en vérité se produire avant qu'une somme considérable de connaissances fût acquise. Les études microscopiques avaient eu d'immenses résultats pour la biologie cellulaire et ainsi pour la science en général. La biologie cellulaire (anciennement appelée cytologie) est une discipline scientifique qui étudie l'unité fondamentale de tout être vivant, dotée d'un potentiel de reproduction, la cellule, du point de vue structural et fonctionnel, et les utilise pour des applications en biotechnologie : la clé de l'innovation thérapeutique dans le domaine de la santé.

L'être humain est capable de régénérer partiellement ses os, sa peau ou encore une partie majoritaire de son foie endommagé. On a vu repousser des bouts de doigts coupés chez plusieurs individus, pourvu que l'amputation ne dépasse pas la base de l'ongle« Avec la découverte des cellules souches il y a quelques années, nous avons compris qu'il existe chez les êtres humains, comme chez tous les animaux, un système naturel de reformation de presque tous nos tissus détruits » Ce système naturel de réparation interne de l'organisme a évidemment des limites et sa capacité de régénération diminue au cours de la vie : « On peut

comparer une blessure avec une infection, Si nous avons attrapé un petit rhume, notre système immunitaire est capable de réagir seul. Mais lorsque la maladie est plus sérieuse, il faut prendre des médicaments pour se soigner. » c'est La thérapie cellulaire, c'est l'ouverture sur un tout nouveau monde et une nouvelle façon de penser. Nous identifions, maîtrisons, cultivons, "dressons" et développons des cellules avec des fonctions très spécifiques telles celles de combattre la leucémie et les autres cancers, et de réparer des organes endommagés. C'est la médecine du XXI<sup>e</sup> siècle, une médecine qui prend avantage de mécanismes physiologiques et naturels afin de traiter les maladies .À travers les milliards d'années d'évolution, les cellules ont acquis la capacité de se spécialiser pour réaliser des tâches incroyablement complexes. En sélectionnant et modifiant donc ces êtres vivants que sont les cellules, nous pourrions guérir les maladies.

Les troubles musculo-squelettiques touchent des millions de personnes dans le monde et coûtent des milliards de dollars par an en soins de santé, selon les données publiées par l'Organisation mondiale de la santé. Contrairement aux maladies d'autres organes vitaux qui entraînent des affections menaçant le pronostic vital, telles que l'insuffisance cardiaque, la plupart des troubles musculo-squelettiques entraînent des douleurs et une immobilité chez les patients, ce qui affecte principalement leur qualité de vie et conduit souvent à des affections médicales supplémentaires. À ce jour, les troubles musculo-squelettiques ont entraîné des problèmes de santé et des charges économiques, qui devraient être encore plus importants au cours des prochaines décennies avec le vieillissement de la population mondiale. Les options de traitement actuelles pour les troubles musculo-squelettiques, telles que l'administration de médicaments et l'intervention chirurgicale visant à soulager la douleur associée à la maladie et à restaurer les fonctions des tissus affectés, fournissent des solutions temporelles

dont les résultats thérapeutiques restent à améliorer. D' où l'intérêt de tirer parti du développement de technologies en médecine régénérative. L'objectif de la médecine régénérative est de réparer de manière fonctionnelle les tissus et les organes à l'aide de techniques basées sur les cellules, évitant ainsi le recours à des thérapies de substitution artificielles qui ont une durée de vie limitée et nécessitant une seconde opération plus compliquée que la première. Dans ce domaine, les cellules souches offrent un potentiel considérable en tant que méthode pour stimuler la réparation par une délivrance systémique / locale ou pour développer de nouveaux systèmes d'organes grâce à des technologies d'ingénierie tissulaire.

L'utilisation de cellules souches (SC) en chirurgie orthopédique pourrait potentiellement transformer le domaine de l'orthopédie d'un domaine dominé par le remplacement et la reconstruction chirurgicale à un domaine de la bio régénération et de la prévention, On parle de biotechnologies et de thérapies cellulaires qui rendront peut-être vétustes les seringues et les pilules. On aurait tort de penser ce futur bien éloigné. Déjà, des milliers d'athlètes ont profité de thérapies cellulaires cartilagineuses visant à reconstruire le cartilage à l'aide de facteurs de croissance et de polymères.

## **I -LA CYTOLOGIE :**

### **1- Historique :**

c est l'étude des cellules individuelles du point de vue structural , fonctionnel et les utilise pour des applications en biotechnologie.

A distinguer de l'histologie, qui étudie les tissus biologiques du point de vue morphologique .

### **2- Définition :**

Il s'agit de l'étude structurale et fonctionnelle des cellules, soient elles normales ou pathologiques . Elle s'intéresse à l'écosystème cellulaire, c'est-à-dire à l'équilibre auto régulé et dynamique des fonctions cellulaires, dans un contexte perturbé ou normal. Le champ de la biologie cellulaire englobe une multitude de réactions chimiques coordonnées et de mécanismes fins de régulation entre des millions de constituants micro et nanoscopiques. Ces constituants assurent d'une façon durable l'architecture et le fonctionnement de la cellule(2).

Après les techniques d'étude cellulaire, l'observation se fait surtout au microscope optique et plus rarement au microscope électronique . On note les étapes principales d'étude cellulaires : culture, frottis ou biopsie, étalement ou apposition sur une lame, coloration puis observation .

La cellule est la plus petite unité vivante de tous les organismes. C'est la pierre angulaire des êtres vivants. C'est un système délimité et autonome au sein de tous les organismes. Son nom est dérivé du latin cellula ("petite chambre"). Une cellule contient différents organites cellulaires et d'autres composants tels que des informations génétiques (ADN) ou des protéines et des lipides. Les êtres vivants peuvent être divisés en procaryotes et eucaryotes. Leurs cellules respectives sont appelées procytes et eucytes. La plupart des procaryotes

tels que les archées ou les bactéries sont unicellulaires, ils ne sont donc constitués que d'une seule cellule. La plupart des eucaryotes (animaux, plantes, champignons) sont multicellulaires. Alors, quels sont les différents types cellulaires et quelle est leur structure?

En général, tous les types de cellules diffèrent par leur structure et leurs fonctions. Cependant, certaines fonctions telles que le métabolisme ou la synthèse des protéines peuvent être trouvées dans la plupart des cellules.

### **3- types cellulaires :**

\*Les cellules procaryotes : La cellule des procaryotes (= procyte) est caractérisée par le fait qu'elle ne possède pas de noyau cellulaire. Comparé aux cellules des eucaryotes (= eucyte), leur intérieur est relativement simple. La plupart des procaryotes sont des organismes unicellulaires, c'est-à-dire des êtres vivants constitués d'une seule cellule. Les cellules multicellulaires ou multicellulaires (principalement des eucaryotes), en revanche, se composent de plusieurs cellules.

Les procytes ne mesurent que quelques micromètres (1 à 2  $\mu\text{m}$ ). Leur génome entier est exposé dans le cytoplasme et se compose souvent d'une seule molécule d'ADN appelée chromosome bactérien et plasmides .

La plupart des procytes contiennent des parois cellulaires relativement rigides faites de peptidoglycane pour se protéger contre les influences environnementales ou les organismes hostiles . Dans certains cas, les procytes peuvent même avoir plusieurs membranes sous les parois cellulaires.

Les procytes contiennent également des ribosomes 70S. Ceux-ci sont nettement plus petits que les ribosomes (80S) des eucytes.

\*Les cellules eucaryotes : La cellule eucaryote ou eucyte possède un véritable noyau cellulaire. Leur structure est caractérisée par une

compartimentation. Par cela, on peut comprendre la division de la cellule en différents types d'espaces (= organites cellulaires ).

Un eucyte peut avoir une taille de 10 à 100  $\mu\text{m}$ . Son ADN est organisé sous forme de chromosomes dans le noyau.

### **\*De quoi sont composées les cellules ?**

Ci-dessous, nous avons répertorié les composants cellulaires et les organites cellulaires les plus importants. A l'exception des plastes et de la vacuole, ceux-ci se retrouvent dans tous les eucytes. Vous pouvez également trouver les ribosomes dans les procaryotes.

Noyau cellulaire avec nucléole : contient la plupart des informations génétiques sous forme de chromosomes et contrôle des processus métaboliques importants tels que la division cellulaire.

Réticulum endoplasmique (ER): se compose de plusieurs cavités et peut être divisé en ER lisse (sans ribosomes) et ER rugueux (avec ribosomes). Fondamentalement, l'ER est responsable de la transmission des signaux chimiques et des substances.

Ribosomes : Petites particules ovales constituées de protéines et d'ARNr. Leur tâche principale est la traduction, c'est-à-dire la lecture d'informations (ARNm) et la formation ultérieure de protéines.

Appareil de Golgi : se compose de plusieurs cavités et est capable de traiter les protéines, de les convertir et de les lier dans des vésicules.

Mitochondries : sont entourées d'une double membrane et forment le vecteur d'énergie universel ATP.

Vésicules ( par ex. Lysosome ou peroxisome ): petites vésicules rondes responsables du transport de nombreuses substances.

Plastes (par exemple, chloroplastes) : Les plastes ne peuvent être trouvés que dans les cellules végétales. Ces organites cellulaires ont émergé de cellules vivantes de manière endosymbiotique (théorie de l'endosymbionte).

Vacuole : Grande cavité dans les cellules végétales qui génère la pression cellulaire interne (turgescence).

-Matériel génétique :

Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un organisme. Il contient à la fois des séquences codantes et des séquences non codantes. Chez la majorité des organismes, le génome correspond à l'ADN présent dans les cellules.

Les cellules possèdent des chromosomes qui portent l'information génétique des êtres vivants .

#### **\* Classification des organismes selon le nombre de cellules :**

On peut classer un organisme comme unicellulaire ou multicellulaire selon le nombre de cellules que contient son corps :

- Organismes unicellulaires:

C'est un organisme formé par une seule cellule comme son nom l'indique. Les bactéries et les protozoaires en font partie (vivent dans des milieux aquatiques)

- Organismes multicellulaires :

Les plantes, les animaux vertébrés et invertébrés sont des êtres vivants multicellulaires. Ce sont les organismes formés par plusieurs cellules. Au sein d'un organisme pluricellulaire, on note une multitude de cellules avec des spécialisations différentes s'entraînant pour remplir la fonction de l'unité la plus supérieure dite tissu .

## **La cellule et son environnement :**

La cellule n'est pas un système fermé sans relations avec le milieu environnant : bien au contraire elle rejette ou puise du milieu extracellulaire des ions et des molécules, contracte des relations avec ses voisines et reçoit et amplifie des signaux chimiques qui modulent son fonctionnement.

La membrane plasmique assure le contrôle de la relation cellule et le milieu dans lequel elle vit.

### **Échanges de substances**

---

La membrane plasmique est perméable de façon sélective à certains ions et à certaines molécules qui sont transportés de l'extérieur de la cellule vers le cytosol ou dans le sens contraire. Les transports d'ions maintiennent le pH et la composition ionique dans d'étroites limites afin que le milieu intracellulaire soit le plus favorable aux activités enzymatiques. Les transports de molécules permettent l'importation de matériaux de construction et de combustibles ou le rejet de déchets. Ces transports mettent en jeu des constituants de la membrane, en particulier des protéines ; leur sens dépend des gradients de concentration existant entre le cytosol et le milieu extracellulaire, il dépend également pour certains d'entre eux de l'activité énergétique de la cellule. Quand un transport se fait dans le sens du gradient, c'est-à-dire du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré, il s'agit d'un transport passif ; quand le transport se fait dans un sens opposé au gradient, on parle de transport actif et dans ce cas la cellule dépense de l'énergie (fig. 1).

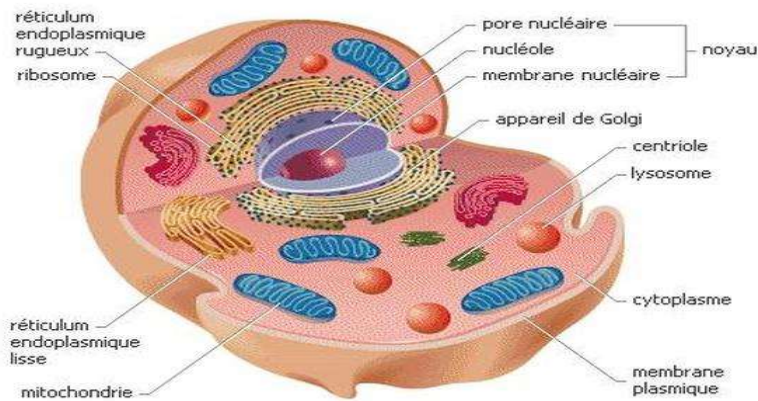


Figure 1: image montrant le système endomembranaire d'une cellule (2)

## II -DECOUVERTE DU MICROSCOPE :

### 1- Historique

Avant la période de la Renaissance, il était difficile d'imaginer l'existence d'organismes vivants trop petits pour être vus à l'œil nu, ou de croire qu'ils pouvaient porter atteinte à des hôtes de grande taille, tout comme il était difficile d'imaginer que les êtres vivants puissent être composés de cellules. De manière générale, l'existence de microorganismes a été niée jusqu'en 1677 lorsqu'ils furent vus et décrits par Antoni van Leeuwenhoek (1632 - 1723), un marchand de draps à Delft (Pays-Bas), qui n'avait aucune formation scientifique mais une grande patience et une grande curiosité. Il réussit à obtenir de forts grossissements (X 300) grâce à un microscope simple composé d'une seule petite lentille presque sphérique. Dans ses lettres publiées par The Royal Society of London, il décrivait un tout nouveau monde, auparavant invisible, comprenant des « animalcules » (reconnus maintenant comme bactéries et protozoaires) dont la mobilité montrait qu'ils étaient vivants.

D'autre part, la cellule fut découverte par l'anglais Robert Hooke (1635-1703) en 1665. Il observa des fines tranches de liège à l'aide d'un simple verre

grossissant et remarqua ainsi sa structure en petites. Il nomma ces cases *cellula*, car elles lui faisaient penser à des cellules de moines. Le terme, à la base latin, donna *cell* en anglais et *cellule* en français. On peut noter que les cellules qu'observa Robert Hooke étaient des cellules mortes et vidées de leur contenu.

La biologie cellulaire était née avec l'invention du premier microscope optique (photonique) par Antoni van Leeuwenhoek.

L'étude des microorganismes (dont les bactéries) ne devint réellement accessible qu'avec le développement d'un microscope optique composé (multientilles) efficace vers les années 1825.

## **2- Généralités :**

L'observation des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles, et nécessite un certain nombre de techniques pour les mettre en évidence.

Ces méthodes :

Permettent l'observation de l'organisation morphologique des cellules.

Etudient la structure de cellules mortes ou vivantes.

## **3- La microscopie :**

-Il existe deux types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes dits « optiques » qui vont utiliser un faisceau lumineux, et les microscopes électroniques qui vont utiliser un faisceau d'électrons. Que ce soit pour la microscopie optique ou électronique, les structures à étudier nécessite une préparation.

La préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

1. La fixation : consiste à plonger le tissu à étudier dans un fixateur, qui tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation. Exemples de fixateurs : le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, le tétroxyde d'osmium

2. La déshydratation permet l'élimination de l'eau : L'eau est retirée au cours de passage dans des bains d'alcools successifs.

3. L'inclusion : l'échantillon est inclus dans un matériau tendre et résistant comme de la résine, ou de la paraffine, qui permet une solidification de l'échantillon.

4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des microtomes.

5. La coloration permet de renforcer le contraste des cellules et de leurs constituants. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence, les colorants utilisés peuvent être naturels ou synthétiques.

6. Le montage : les coupes sont étalées et collées sur lame de verre.

### *3.1- Le microscope optique*

Les microscopes optiques (à lumière transmise ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. L'échantillon est éclairé en lumière transmise, et est examiné à travers un système optique qui comprend :

Un objectif : qui donne une image grossie de la structure étudiée.

Un oculaire : qui permet l'examen de l'image.

Le pouvoir séparateur ou de résolution : Est la capacité d'une lentille ou d'un microscope à permettre la vision de 2 points extrêmement rapprochés comme 2 points distincts. L'image de l'échantillon est agrandie jusqu'à 1000 fois, avec un pouvoir séparateur de 1/10 de micromètres.

Le microscope à fluorescence : est un microscope optique qui porte deux filtres interposés entre l'échantillon coloré par des molécules fluorescentes, app fluorochromes :

Le premier filtre ne laisse passer que la lumière qui excite le fluorochrome.

Le deuxième filtre ne laisse passer que la lumière émise par le fluorochrome.

Les fluorochromes absorbent une lumière spécifique, et émettent une lumière différente. Ex : la Fluorescéine et la Rhodamine.

Dans ce type de microscope les structures à étudier apparaissent très colorées sur un fond noir. Permet de détecter:

Les substances spontanément fluorescentes: vitamine A.

Des structures qui fixent des colorants.

Il permet de voir des macromolécules que l'on n'aurait pas vues au microscope optique simple.

Intérêts :

-Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires.

- Détection, localisation, quantification de protéines cellulaires comme les hormones , les protéines du cytosquelette.

Le microscope à contraste de phase : il est basé sur le fait que l'onde lumineuse qui traverse les structures est retardée et change de phase par rapport à l'onde qui arrive directement à l'observateur.

Ce type de microscope permet l'observation de structures vivantes, non fixées et non colorées, en absence de coloration ces structures sont peu ou pas visibles. Les structures observées apparaissent en relief.

### *3.2- Le microscope électronique :*

Va nous permettre à l'intérieur de la cellule d'étudier des objets extrêmement petits, jusqu'à l'échelle d'une macromolécule.

Le microscope électronique va nécessiter une préparation spéciale des cellules qui est différente de celle de la microscopie optique .Il donne des photos en noir et blanc.

Le microscope électronique à transmission (MET) :

Utilise un rayonnement électronique possède un pouvoir séparateur 40 000 fois supérieur à celui du microscope optique et deux millions de fois plus que l'œil humain, et qui est théoriquement de 2nm.

Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de l'échantillon et donc la mort des cellules et du fait du faible pouvoir pénétrant des électrons les échantillons doivent être sous forme de coupes ultra fines ( $< 0,1\mu\text{m}$ ) après inclusion dans une résine.

L'objet fixé est bombardé d'électrons, ces derniers permettent d'obtenir une image agrandie, qui se formera sur un écran fluorescent.

Technique de coloration négative :

Certaines structures échappent à la microscopie électronique, la coloration négative permet de les mettre en évidence. L'échantillon biologique est placé sur un film et on attend que les sels de métaux lourds se déposent autour de l'échantillon, qui est coincé dans une pellicule de colorant imperméable aux électrons. Il apparaît en clair sur un fond sombre.

Le microscope électronique à balayage (MEB) : consiste à balayer un échantillon par un faisceau d'électrons, la surface est préalablement recouverte d'un film de platine obtenu par ombrage métallique.

L'ombrage métallique de l'échantillon à étudier consiste à vaporiser sous vide une très fine couche de métal lourd, qui recouvre l'échantillon d'une fine pellicule. L'ombrage métallique permet d'accentuer les reliefs.

Le microscope électronique à balayage donne des images tridimensionnelles de l'échantillon, et permet d'étudier les surfaces cellulaires, les organites et même à l'intérieur des membranes.

#### **4. Les méthodes de fractionnement subcellulaire :**

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

##### *4.1- L'homogénéisation :*

Consiste à provoquer l'éclatement de la cellule, et la rupture de la membrane plasmique, en mettant la cellule dans un homogénéisateur. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées microsomes.

##### *4.2- L'ultracentrifugation différentielle*

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. L'homogénat est placé dans une centrifugeuse ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

A 600g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.

A 15 000g, pendant 5 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.

A 100 000g (ultracentrifugation), pendant 60 minutes on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.

A 300 000g, pendant 2 heures on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

#### 4.3- La Centrifugation par gradient préformé

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au-dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

La vitesse de sédimentation dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le coefficient de sédimentation en unité Svedberg (S).

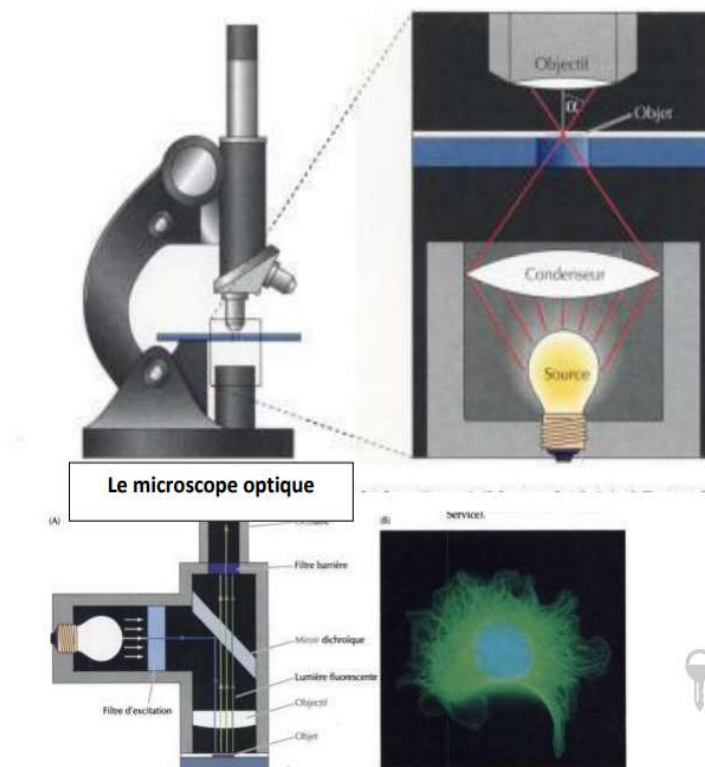
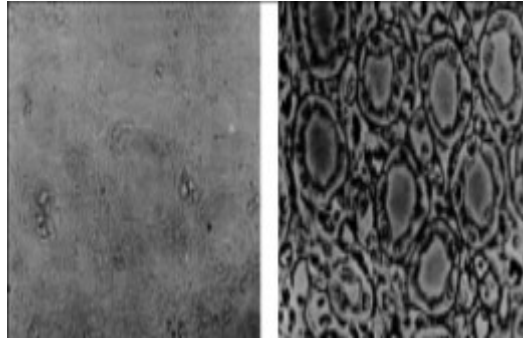
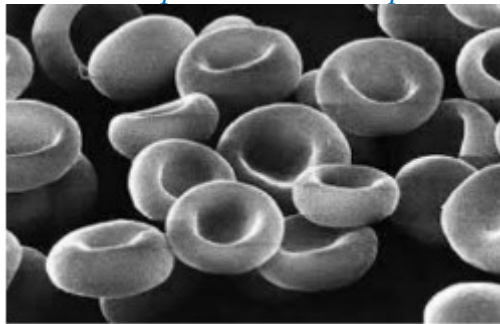


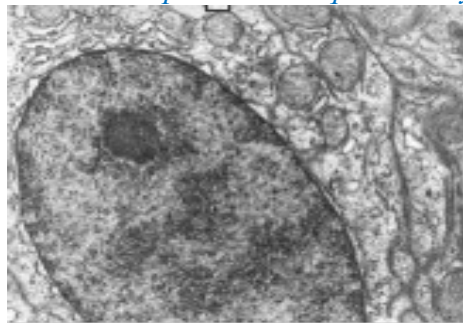
Figure 2: Le microscope optique (3)



*Figure 3: comparaison tubules rénaux images prises avec microscope photonique ordinaire a gauche et microscope a contraste de phase a droite.(3)*



*Figure 4 : microscopie électronique a balayage (3)*



*Figure 5: microscopie électronique a transmission (3)*

#### *4.4-la cytométrie en flux :*

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse (i.e., plusieurs milliers d'événements par seconde), de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien. L'interaction de ces éléments avec la lumière émise par une ou plusieurs sources lumineuses (lasers en général) permet de caractériser les cellules selon différents

critères tels que la taille ou la granularité, détectés grâce à la diffusion de la lumière, ou l'expression de molécules de surface (souvent nommées CD pour cluster of differentiation) généralement révélées par un composé fluorescent couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre le CD d'intérêt. Il est également possible de détecter, après perméabilisation, des molécules intracellulaires. Ainsi, la CMF permet de mesurer individuellement (i.e., pour une cellule donnée) et simultanément plusieurs paramètres sur chaque cellule au sein d'une population hétérogène. Les éléments cellulaires doivent être en suspension pour être analysés par CMF (sang, liquide de ponction...). L'analyse de tissus cellulaires est possible, ceux-ci doivent alors être préalablement dissociés pour être mis secondairement en suspension. Pour l'analyse d'un échantillon de sang total par exemple, les globules rouges doivent être dans un premier temps lysés à l'aide d'un tampon de lyse. Les cellules sont centrifugées une première fois puis incubées avec l'anticorps d'intérêt à 4°C à l'abri de la lumière pendant une durée de 15-30 minutes. Un tampon spécifique est ajouté pour arrêter la réaction et la suspension cellulaire est centrifugée. Deux à trois lavages sont ensuite effectués avant l'analyse. Pour un marquage de surface, la durée d'expérimentation est en général d'environ 1h.

Un cytomètre de flux comporte plusieurs systèmes :

- un système fluidique pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine liquide sous pression (liquide de gaine) qui aura pour effet d'aligner et espacer les cellules en vue de l'analyse ;
- un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) ;

- un système électronique pour convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts). Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur ;

- un système informatique pour visualiser ces signaux. Le principe général est schématisé sur la Figure 1. La longueur d'onde d'un laser permet d'exciter 4 à 5 fluorochromes qui auront des spectres d'émission différents. En général, les cytomètres disposent de trois lasers ce qui offre, en plus de l'information sur la taille et la granularité, la possibilité d'obtenir simultanément une dizaine de paramètres pour une cellule donnée.

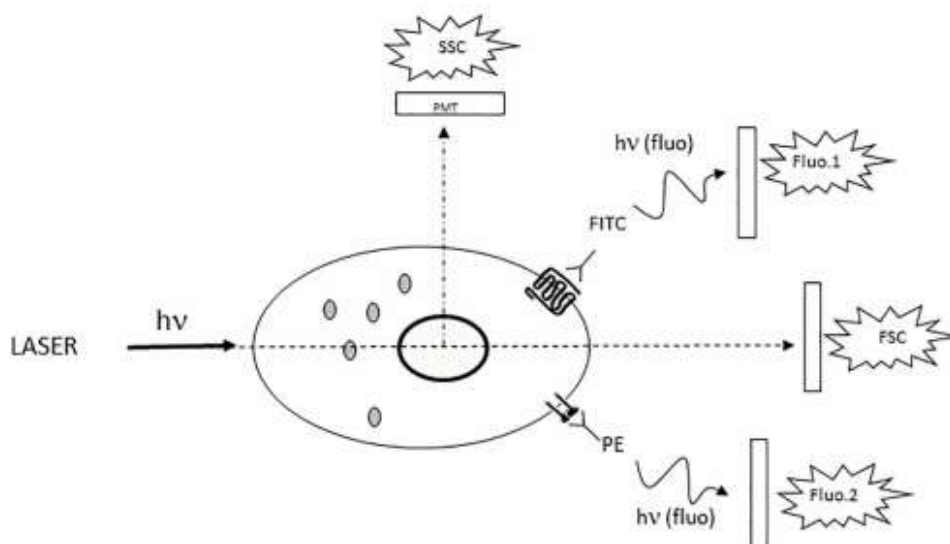


Figure 6: Principe général de la cytométrie en flux (3)

Les cellules en suspension dans un flux liquidien passent une à une dans un faisceau laser. La diffusion physique de la lumière émise par la source lumineuse est dépendante de la taille et de la granularité cellulaire (contenu en granule, structure plus ou moins segmentée du noyau). La lumière du laser va également

exciter des fluorochromes préalablement couplés à des anticorps monoclonaux capables de reconnaître et fixer certaines protéines. Sachant que les fluorochromes réémettent la lumière à différentes longueurs d'onde (loi de Stoke), un même laser peut activer jusqu'à cinq fluorochromes qui donneront cinq informations différentes. Ici, un laser à 488 nm active la fluorescéine (FITC, émission à 520 nm), couplée à un anticorps identifiant un récepteur membranaire, et la phycoérythrine (PE, émission à 580 nm) couplée à un anticorps identifiant une intégrine. Un système de filtre optique et de photomultiplicateur va permettre de collecter la lumière propre à chaque fluorochrome et de la quantifier. Il sera alors possible d'évaluer si une molécule est présente à la surface de telle ou telle cellule et également de donner l'intensité de son expression. En cas d'absence de la molécule, aucun anticorps monoclonal ne se fixe et il n'y a donc pas de signal fluorescent correspondant (voir Fig. 5, avant stimulation, pas de détection de TNF).  $h\nu$  représente l'énergie du photon (en Joules) où  $h$  est la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon considéré. PMT : photomultiplicateur .

#### *4.5- microscope confocal :*

Il existe aujourd'hui deux types de systèmes confocaux :

La microscopie confocale est de plus en plus utilisée dans le monde de la recherche biomédicale. Grâce à sa très faible profondeur de champs (environ 400 nm) cette technique permet de sectionner un échantillon en tranche optique de très bonne qualité sans traitement ultérieur.

Un microscope confocal est un microscope photonique, composé :

- de sources de lumière : différents lasers (L.A.S.E.R. = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) émettant à différentes longueurs d'ondes (1 laser = 1 Longueur d'onde).

- d'un trajet optique qui comprend des pinholes réglables (petits trous), des miroirs pour balayer le faisceau du laser sur l'échantillon, des objectifs et des oculaires.

- d'un ou plusieurs capteurs (photomultiplicateurs).

\* Le système confocal multiphoton utilise des lumières d'excitation dans l'infrarouge. Dans ce cas, seul le point de focalisation du faisceau laser est exciteur (densité de photon suffisante pour coupler l'énergie d'excitation). Ce système est considéré comme une évolution technologique importante pour trois raisons majeures :

- o Il ne nécessite pas d'iris confocal.

- o L'utilisation d'une lumière d'excitation à une longueur d'onde élevée (>900nm) assure une plus grande pénétration à l'intérieur de l'échantillon (jusqu'à 500µm au lieu de 150µm) offrant la possibilité de travailler sur des échantillons plus épais.

- o L'excitation des fluorophores étant limitée au point de focalisation du faisceau laser, le risque de photoblanchiment est réduit.

\*Le système confocal simple photon utilise une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Ainsi, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau laser. L'élément clé de ce microscope confocal est alors représenté par une fenêtre (ou iris confocal) placée devant le photodétecteur qui élimine la fluorescence provenant des régions non focales.

## 2) Fonctionnement :

Comme pour la microscopie de fluorescence classique, il faut avec le microscope confocal, marquer les échantillons à étudier avec des fluorochromes.

Les fluorochromes sont alors excités par le laser qui convient. Pour cela, le faisceau du rayon laser est balayé sur l'ensemble de l'échantillon grâce à un jeu de miroirs (scanner x/y). L'émission des fluorochromes, résultant de l'excitation, est captée par le photomultiplicateur (détecteur) et l'image est reconstituée point par point sur l'écran. De plus, grâce à la présence du pinhole (petit trou) devant le détecteur, seule la fluorescence provenant du plan focal est captée. La fluorescence hors focus est bloquée. Le microscope confocal permet donc de n'obtenir que l'image du plan focal améliorant ainsi considérablement la résolution en Z.

### 3) Images obtenues :

Le microscope confocal permet d'obtenir des images de fluorescence des marqueurs présents dans l'échantillon étudié. Les images ne sont composées que de la fluorescence émise au plan focal. Les images apparaissent donc nettes sans traitement.

## III- L'ARRIVEE DE LA CULTURE CELLULAIRE :

La **culture cellulaire** est un ensemble de techniques de biologie utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex-vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation in vitro.

### 1- Origine des cellules mises en culture :

- des micro-organismes libres (bactéries ou levures)
- des cellules « saines » prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie...), on parle alors de « culture primaire ». Ces cellules ne peuvent habituellement pas

être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick).

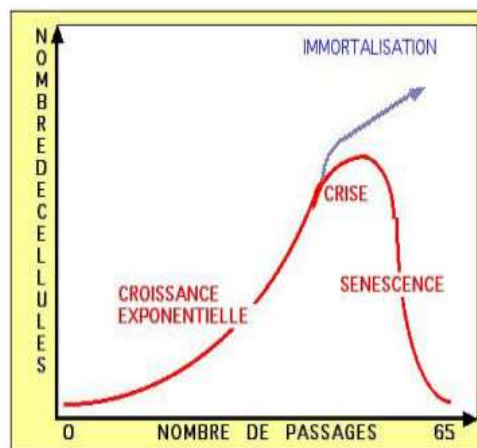
- des cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'« immortalité en culture »). Ce sont des lignées cellulaires. Les lignées sont soit des cellules cancéreuses, soit des cellules en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues « immortelles » artificiellement, soit des cellules souches.
- Des tranches d'organes (d'épaisseur optimisée selon le tissu)

## **2- Historique de la culture cellulaire**

Les scientifiques tentent de cultiver les cellules en laboratoire depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, mais sans succès car les échantillons meurent systématiquement. En 1912, Alexis Carrel, chirurgien français, réussit à mettre en culture les cellules d'un cœur de poulet, qui continuait à battre. La communauté scientifique de l'époque pensait que son expérience était une des plus importantes de l'époque, et les magazines affirmaient qu'elle mènerait à l'immortalité de la cellule, mais Carrel était un eugéniste et un mystique. Chaque année il célébrait l'« anniversaire » des cellules, mais on finit par apprendre que les cellules d'origine n'avaient pas survécu très longtemps, et aucun scientifique n'avait réussi à reproduire son expérience. En fait Carrel réintroduisait de nouvelles cellules chaque fois qu'il les « nourrissait » avec un jus d'embryon.

La véritable avancée se produisit en 1951 lorsque les cellules d'Henrietta Lacks, connues sous le nom de cellules HeLa, prélevées lors de son opération du cancer et cultivées par le biologiste George Gay, se révélèrent « immortelles » en se reproduisant à l'infini. Elles sont toujours utilisées en laboratoire de nos jours.

La détermination des exigences pour la mise au point de milieu et celle des conditions de cultures cellulaires suppose une bonne connaissance des conditions qui prévalent dans le milieu intérieur. Lorsque les cellules mises en culture proviennent de cellules "saines" prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie,...), on parle alors de "culture primaire". Ces cellules ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick).



*Figure 7: la courbe de Hayflick ,nombre limité de divisions cellulaires (4)*

La limite de Hayflick : Leonard Hayflick avait observé que des cellules en division (mitose) dans une culture cellulaire ne se divisaient que 50 fois avant de mourir. Quand des cellules approchaient cette limite, elles montraient des signes de sénescence. Cette limite varie en fonction du type cellulaire, et plus encore en fonction du type de l'organisme. La limite pour l'homme se situe aux environs de 52. Cette limite a été reliée au raccourcissement des télomères. Les cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'immortalité en culture) sont des "lignées cellulaires". Les lignées sont soit des cellules cancéreuses (telles les cellules HeLa à développement très rapide, de Henrietta Lacks), soit des cellules

en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues "immortelles" artificiellement.

- Composition de base du milieu de culture

Sels minéraux, Hormones, Acide aminés, Sources d'énergie (glucose), Vitamines Facteur de croissance Étapes de la culture cellulaire :

1- On décongèle une ou plusieurs tubes (à cryostat) de cellules. Ce tube contient des cellules dans un milieu de culture adapté + un agent protecteur (qui permet d'éviter une trop grande mortalité lors de la congélation. Le DMSO par exemple, qui est d'autre part toxique pour les cellules vivantes).

2- l'agent protecteur est éliminé par centrifugation Après la décongélation .

puis le milieu de culture adapté frais est rajouté. Certaines cellules sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes), d'autres sur des plastiques traités leur offrant des capacités d'adhérence. Ces supports peuvent prendre la forme de boîtes de différents formats ou

"flasks".



*Figure 8 : boites ou flasks (4)*

3- Enfin, on remet les cellules à l'incubateur pour les cultiver. Ainsi, les cellules sont généralement cultivées en incubateurs, à une température de 37°C et dans une atmosphère très humide à teneur en CO<sub>2</sub> contrôlée, souvent 5%.



*Figure 9: culture grâce au microscope inversé .(4)*

4- Comptage des cellules de Malassez Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles.

### **3- Cellules souches**

#### *3.1-Historique :*

De nos jours les essais cliniques utilisant des cellules souches se multiplient d'une manière impressionnante sachant que la découverte de ces cellules ne date pas de très loin . C'est en 1981 qu'on a découvert les cellules souches par le scientifique britannique Martin Evans , non seulement il a réussi à identifier les cellules souches d'une souris ,mais il était aussi le premier à les isoler et à les mettre en culture .

en 1986 le fameux Martin Evans, accompagné de Mario Capecchi et Oliver Smithies, ont réussi à produire à partir des cellules souches embryonnaires des souris vivantes. Des années plus tard, en 2007 il était temps pour ces 3 savants de recevoir un prix Nobel, ils ont découvert des gènes spécifiques à cibler sur les cellules souches embryonnaires de souris (3).

en 1998, l'avancée scientifique a connu un événement important : James Thompson et son équipe isolèrent des cellules souches dotées de capacités de différenciation et de propriétés d'auto-renouvellement, à partir d'embryons humains résultant de fécondation in vitro. Les recherches scientifiques ont ensuite été brisées par les réglementations très strictes pénalisant l'utilisation des embryons humains pour ces fins de recherche sur les cellules souches.

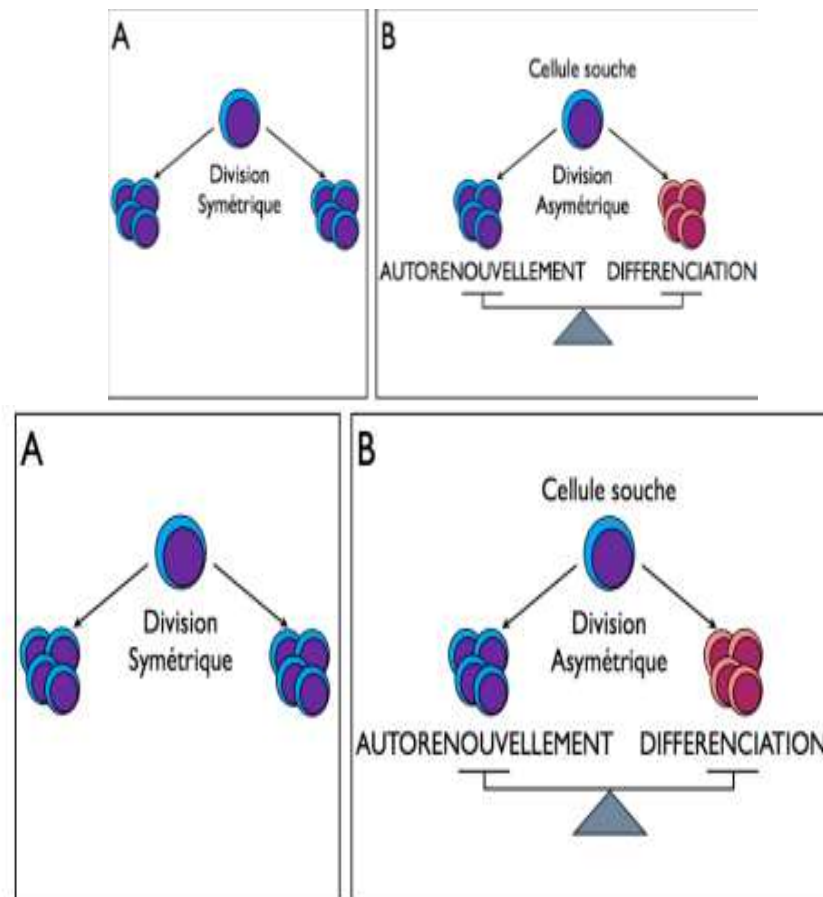
en 2012 le japonais Shinya Yamanaka a obtenu le prix Nobel de médecine, il a réussi à reprogrammer une cellule déjà différenciée en cellule souche pluripotente. Ainsi fut la découverte des « cellules pluripotentes induites ou iPS (4). Ces cellules peuvent se différencier vers n'importe quelle lignée cellulaire du corps. Néanmoins, les scientifiques tentent toujours de maîtriser et surtout diriger le processus de reprogrammation cellulaire.

Une cellule souche est dotée de la capacité d'auto-renouvellement, de division asymétrique, et de différenciation vers différentes lignées cellulaires.

- DIVISION ASYMETRIQUE :

normalement au cours de la prolifération cellulaire, la cellule se divisera d'une manière symétrique donnant ainsi deux cellules «filles» identiques à la cellule mère initiale. A partir de la cellule mère on aura une cellule qui lui est identique en tous points, et une autre avec des propriétés différentes de celles de la cellule souche mère et dont le destin sera différent [5]. Cette division asymétrique va assurer donc deux phénomènes distincts: en donnant naissance à une cellule

soche identique ,c est l'auto-renouvellement et le second en donnant naissance a une cellule fille différente ,c'est la différenciation . (Figure 10).



*Figure 10: Division asymétrique des cellules souches (4)*

A,division symétrique . B,division asymétrique .

- AUTO-RENOUVELLEMENT :

L auto-renouvellement c est La capacité de s'auto-renouveler est une propriété importante des cellules souches que seules celles-ci possèdent et permet au nombre de cellules d'augmenter en réponse à un stimulus. Ceci est important pour maintenir le pool de cellules souches constant et ainsi garantir un approvisionnement à vie en cellules souches. Ces cellules souches sont

nécessaires à la formation de nouvelles cellules qui remplacent les anciennes cellules ou sont capables de régénérer des défauts tissulaires .

- Séquence :

L'auto-renouvellement des cellules souches représente une forme particulière de prolifération dans laquelle au moins une cellule souche est recréée.

Cette division cellulaire peut avoir lieu symétriquement ou asymétriquement, selon les besoins:

- symétrique: lorsque les cellules se divisent, 2 cellules souches identiques sont créées.
- asymétrique: lors de la division, une cellule souche et une autre cellule différenciée apparaissent avec un taux de prolifération accru, mais une capacité réduite à s'auto-renouveler

La division dans le cadre de l'auto-renouvellement n'a lieu qu'en réponse à un stimulus [5-8]. (Figure 11). de croissance, la plupart du temps la cellule souche est dans un état de repos . Cela garantit que la formation de nouvelles cellules n'a lieu que lorsqu'elles sont réellement nécessaires (4,5). Le nombre de cellules est maintenu constant grâce à une régulation stricte de l'équilibre entre la phase de repos et la division cellulaire.

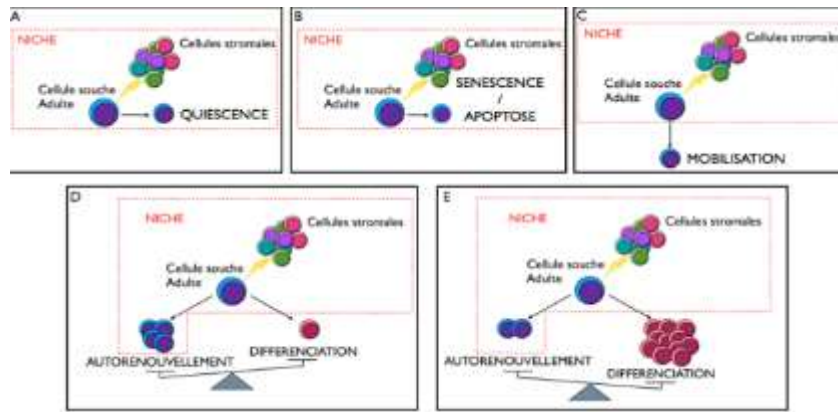


Figure 11 : destinées des cellules souches (8)

Le milieu de culture des cellules souches pluripotentes in vitro est composé de facteurs solubles qui maintiennent les cellules souches dans un état de différenciation, les agents les plus importants sont le basic Fibroblast Growth Factor, l'Insulin-like Growth Factor entre autres cités dans la figure [4, 10-12]. l'activation de kinases spécifiques (PI3K, JAK, MAPK) pour IGF, bFGF et LIF. Ces kinases régulent l'expression des gènes de pluripotence en activant Oct-4, Sox-2 et NANOG, les plus importants facteurs de transcriptions [13]. par contre quand il s'agit de la voie de BMP, son activation va inhiber l'expression des gènes de pluripotence favorisant ainsi la différenciation des cellules souches [14]. la régulation de la différenciation des cellules souches pluripotentes et multipotentes chez les CSH [15] est faite principalement selon les voies de Wnt/ $\beta$ caténine, Sonic Hedgehog entre autres.

la mobilisation des cellules souches dans notre organisme [9] (Figure 12) est assurée grâce à l'expression par ces dernières de molécules d'adhésion (LFA-1, VLA-4) et pour les cellules stromales (ICAM-1/2 et VCAM-1). Lors de la greffe de moelle osseuse après injection systémique de cellules souches, la moelle

osseuse du receveur sera colonisée par les CSH du donneur grâce au phénomène de homing, chaque cellule souche présente dans la circulation va rejoindre sa niche par un phénomène de “homing”, mobilité qui est toujours spécifique .

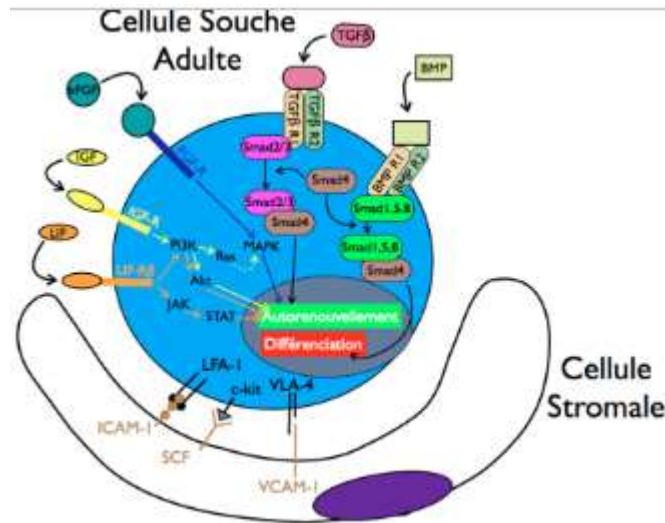


Figure 12 : les cellules stromales de la niche (12)

- Le rôle de l'auto-renouvellement dans le cancer :

Des cellules souches dites tumorales ont été identifiées dans un grand nombre de tumeurs . Ces cellules sont responsables du développement d'une tumeur. Leur capacité d'auto-renouvellement, qu'elles ont en commun avec les cellules souches normales, joue ici un rôle déterminant: les cellules souches tumorales peuvent donc se diviser pratiquement sans limite et générer des cellules tumorales supplémentaires.

Contrairement aux cellules souches normales, l'auto-renouvellement des cellules souches tumorales n'est pas régulé, mais plutôt indépendant des stimuli de croissance. La mobilisation des cellules cancéreuses hors leur niche semble être l'élément déclencheur de la dissémination métastatique. Le nombre de cellules n'est donc pas maintenu constant, mais les cellules tumorales se développent fortement - une tumeur se développe(16) .

- Prenons comme exemple les cellules souches cancéreuses qui semblent être présentes surtout dans les tumeurs avec un micro environnement hypoxique ,on peut appliquer la notion de niche a ces tumeurs ,et la mobilisation des cellules souches cancéreuses hors leur niche semble être l élément déclenchant des métastases tumorales [16] . la définition d une cellule souche englobe la capacité de cette cellule non seulement a s auto-renouveler mais aussi a se différencier en cellules d une multitude de tissus ,cette définition suscite la curiosité ,les espoirs mais aussi l inquiétude des scientifiques et aussi du grand public .

- DIFFERENCIATION :

Chaque cellule souche est dotée d un pouvoir de donner une ou plusieurs lignées cellulaires avec des caractéristiques différentes de la cellule mère , c est le pouvoir de différenciation. Bienque cette propriété est commune a toutes les cellules souches, le pouvoir de différenciation diffère d'une cellule a autre ,permettant ainsi une classification des cellules souches existant chez l embryon et l homme adulte . Les cellules de la morula sont dites “totipotentes” car chaque cellule de la morula est capable de produire un embryon avec ses annexes : un organisme entier[17]. les cellules de la morula ne sont pas multiples,leur existence est précoce aussi que transitoire lors du développement de l'embryon. Au 5eme jour d la gestation , ces cellules vont se différencier en des cellules avec un pouvoir de différenciation plus étroit dites “pluripotentes”communément appelées cellules souches embryonnaires ou cellules ES[18] et localisées dans la masse cellulaire interne du blastocyste . Les Es ont déjà perdu la capacité de donner naissance à un embryon en plus de ses annexes embryonnaires.

On note aussi l'existence des cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS)[19], ce sont des cellules générées artificiellement à partir de cellules adultes

Les cellules souches dites “multipotentes” peuvent être isolées plus tardivement , avec un pouvoir de différenciation encore plus étroit, limité a un petit nombre de tissus[20].

Les cellules souches de la peau sont dites “oligopotentes” ,de différenciation limitée aux cellules appartenant à un tissu donné [21]

Enfin, il existe des cellules souches qui ne peuvent produire qu’un seul type de cellule, ce sont les cellules “unipotentes” , les cellules souches épidermiques ne pouvant se différencier qu’en kératinocytes[22]. (Figure 13)

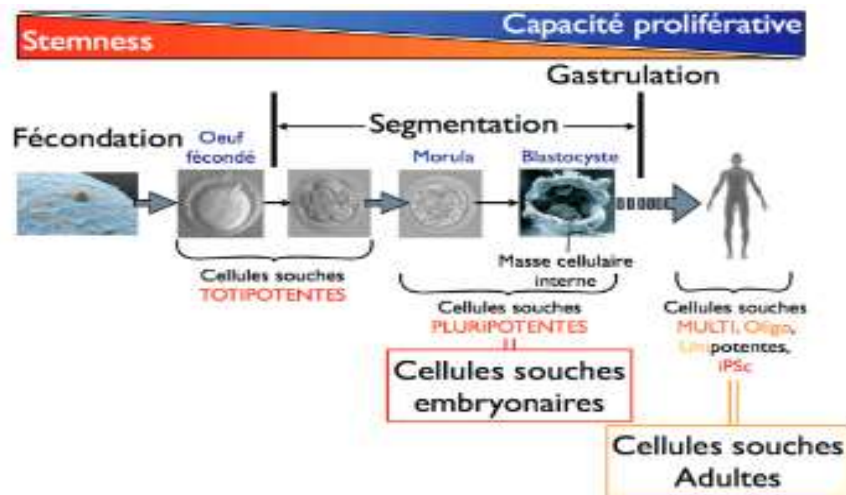


Figure 13 :les différents types de cellules souches selon le stade de développement (18)

Les cellules souches peuvent être classifiées sous forme d une pyramide, dont le sommet est occupé par les cellules souches totipotentes, qui sont peu nombreuses, avec le potentiel de différenciation le plus élevé, mais avec une faible capacité d auto renouvellement et de prolifération. la base de la pyramide est occupée par les types cellulaires qui peuvent proliférer plus rapidement et qui sont plus nombreux mais au dépends d un potentiel thérapeutique plus étroit ( pouvoir de différenciation plus limité).

### 3.2- Classification des cellules souches :

Comme discuté avant ,la classification de cellules souches en pyramide en fonction de leur capacité de différenciation n est pas la seule classification possible.

#### 3.2.1- Les cellules souches embryonnaires (CSE)

Ce sont des cellules pluripotentes .elles ont la capacité de s auto renouveler d une façon illimitée tout en maintenant leur pouvoir de se différencier en tous types cellulaires d un organisme ,ces cellules sont issues d un stade très précoce du développement embryonnaire , c est le stade blastocyste ; survient entre le 5eme et 7 eme jour . . On note deux zones au niveau du blastocyste (cf figure 14)

–trophoblaste qui donnera naissance par la suite au placenta .

–masse cellulaire interne contenant 10 à 20 cellules souches embryonnaires

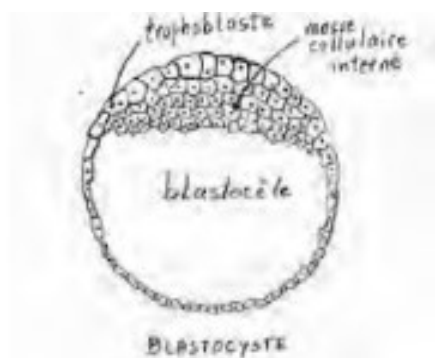


Figure 14 : stade blastocyste du développement embryonnaire (19)

Les biologistes étudient les facteurs physiques et/ou chimiques au niveau de l embryon qui régulent la différenciation des CSE afin de créer dans les expérimentations, dans les boites de Petri des conditions similaires permettant la différenciation des cellules souches embryonnaires vers le type cellulaire ils

désirent étudier . On comprends aujourd'hui que ces signaux sont des sécrétions chimiques produites par les cellules environnantes a cause des contraintes mécaniques causées par les mouvements embryonnaires au cours de son développement . Une fois ces cellules souches embryonnaires sont prélevées ,avec les problèmes éthiques qu engendre ce prélèvement ,vu que le prélèvement des cellules du blastocyste engendre d une vie humaine potentielle ; elles seront placées en culture dans des milieux spécifiques contenant des facteurs de croissance ou d inhibition influençant ainsi la différenciation cellulaire , Usuellement, on effectue les prélèvements sur des embryons surnuméraires qui sont le résultat d une FIV et d une congélation dans le contexte d'un projet parental abandonné.

De nos jours on dispose de plus de 200 lignées de cellules souches embryonnaires humaines ,plus de 200 génomes alors disponibles pour la communauté internationale de chercheurs.

### *3.2.1.1- Les cellules souches fœtales :*

Contrairement aux cellules souches embryonnaires, qui sont pluripotentes et peuvent se différencier vers toutes les cellules du corps, les cellules souches fœtales sont principalement «uniquement» multipotentes. Cela signifie que les tissus sont déjà parfaitement spécifiés car l'embryon ou le fœtus est déjà développé au moment du prélèvement cellulaire . Les cellules souches fœtales sont plus viables et dotées d une capacité de prolifération supérieure a celle des cellules souches adultes qui se trouvent dans le corps humain après la naissance.

Dans le cas des cellules souches embryonnaires un embryon est consciemment créé dans un tube à essai et détruit très tôt afin d'obtenir les cellules souches. Les cellules souches fœtales, en revanche, sont obtenues à partir d'embryons ou de fœtus âgés d'environ cinq à douze semaines.

- Les cellules du sang de cordon :

Les médecins doivent aviser les futurs parents afin qu'ils ne se reprochent pas de ne pas avoir stocké de sang de cordon ombilical; Il existe plus de 400 000 greffes de sang de cordon allogénique cryoconservé disponibles dans le monde, qui peuvent être demandées auprès des registres centraux de donneurs de cellules souches de sang de cordon. À ce jour, plus de 20 000 patients ont été transplantés avec des dons allogéniques de sang de cordon ombilical, et le nombre de patients transplantés est en augmentation dans le monde. le sang du de cordon ombilical présente de nombreux avantages: il est disponible beaucoup plus rapidement que la moelle osseuse - en cas d'urgence, les greffes peuvent être effectuées dans les deux jours ouvrables. En raison de l'immaturation immunologique des cellules, il est mieux toléré, mais tout aussi sûr et efficace. Dans certaines conditions, le sang du cordon ombilical peut être transplanté avec un très bon succès même s'il ne convient pas à cent pour cent au receveur, ce qui élargit considérablement le groupe de patients éligibles à la transplantation. Les autres avantages décisifs du sang de cordon ombilical sont l'extraction sûre et sans danger sur le plan éthique ainsi que la moindre contamination par des agents pathogènes. Chez l'adulte, le petit nombre de cellules serait un inconvénient s'il ne pouvait pas être compensé par l'utilisation de doubles transplantations. les deux plus anciennes sources de cellules souches hématopoïétiques : la moelle osseuse ou au niveau du sang périphérique.

L'utilisation des CSH issus du sang de cordon ne date pas d'hier , cela fait plus que 25 ans qu'on utilisait ces cellules dans le traitement des hémopathies bénignes ou malignes et dans les troubles métaboliques et immunitaires en pédiatrie (23). Le prélèvement s'effectue avec l'accord de la mère et il est sans

aucun danger ni pour la mère ni le nouveau né , une fois les cellules sont obtenues ,elles devront répondre aux critères de qualité pour être conservés: sérologie normale de la mère ,richesse cellulaire suffisante entre autres ) ensuite elles seront phénotypées HLA pour définir le phénotype de compatibilité tissulaire ,ces prélèvements sont pilotés par l'équipe de biomédecine .

- Les cellules de la paroi du cordon ombilical :

Récemment les scientifiques ont pu isoler des cellules souches avec des propriétés similaires a celles des cellules souches mésenchymateuses CSM, ce sont les cellules de la gelée de Wharton,ce sont des cellules souches présentes dans le tissu protégeant les vaisseaux ombilicaux , un tissu élastique et résistant dit tissu de Wharton en référence a celui qui l a décrit pour la première fois en 1656(25)Thomas Wharton .

Les cellules de la paroi du cordon ombilical sont prélevées après consentement de l mère,sans contraintes éthiques .Le geste de ponction est identique a celui des cellules du cordon ombilical. Après l isolement des CSM du cordon elles seront cryoconservées pour une possible future rée-utilisation . L'isolement des Cellules souches mésenchymateuses à partir de prélèvement de MO reste la méthode de recours(25)les cellules de Warthon représentent plusieurs avantages comme la capacité de se différencier vers une multitude de types cellulaires sous l'influence de facteurs de croissance (25) : adipocytes, chondrocytes . Sans oublier la grande capacité d'auto renouvellement et la moindre immunogénicité qui permettra beaucoup plus d'injections allogéniques et abondantes en cellules souches en comparaison aux sources actuelles de CSM .

### *3.2.1.2. Les cellules souches adultes :*

Notre corps est soumis à des processus de restructuration et de renouvellement constants. Pour contrôler le nombre de cellules dans le corps, pour

éliminer les cellules dégénérées ou trop anciennes et pour sélectionner les cellules immunitaires, la mort contrôlée des propres cellules de l'organisme est nécessaire. Afin de remplacer ces cellules, mais aussi pour la régénération des tissus lésés sous forme de cicatrisation, le corps dispose d'un réservoir de cellules souches adultes. Ceux-ci sont responsables de la production de nouvelles cellules spécialisées. Contrairement aux cellules souches embryonnaires, les cellules adultes n'ont qu'un potentiel limité d'auto-renouvellement et de différenciation et produisent des tissus ou des types de cellules spécifiques de manière ciblée. Par exemple, les cellules souches cutanées ne font que renouveler la peau et les cellules souches neurales ne donnent naissance qu'à des cellules du système nerveux. C'est pourquoi de tels réservoirs de cellules souches sont présents dans la plupart des tissus et organes .

Même si les cellules souches adultes ne sont pas aussi polyvalentes que la source, leurs précurseurs embryonnaires, elles font quand même des choses étonnantes. Les cellules souches de la peau, par exemple, remplacent en permanence les cellules exfoliantes de l'épiderme et renouvellent complètement la peau une fois toutes les quatre semaines environ. Ce potentiel de renouvellement les rend très intéressants.

Les cellules souches adultes sont inoffensives d'un point de vue éthique et, idéalement, peuvent même être obtenues directement auprès du patient.

Les cellules souches de la moelle osseuse comme modèle  
Dans le cas des maladies de la moelle osseuse, l'utilisation thérapeutique des cellules souches adultes est déjà standard. Depuis de nombreuses années, les greffes de cellules souches autogènes sont utilisées pour traiter le myélome multiple, un cancer hématogène de la moelle osseuse. Cette application laisse espérer des options thérapeutiques pour de nombreuses autres maladies, en

particulier les maladies dégénératives. La recherche est de plus en plus orientée dans ce sens.

la recherche sur les cellules souches concerne actuellement les cellules souches tumorales également, un sujet qui est encore en partie controversé dans les cercles de spécialistes. Les scientifiques ont constaté que les cellules cancéreuses ont également le potentiel de s'auto-renouveler et de se différencier. Bien qu'elles ne représentent qu'une petite proportion de toutes les cellules cancéreuses, on pense qu'elles sont responsables de la croissance tumorale et des métastases, ainsi que de la résistance à certaines thérapies.

\* Les cellules souches hématopoïétiques :

Afin de maintenir le nombre de cellules sanguines en équilibre homéostatique, une prolifération robuste et permanente de  $> 10^{11}$  érythrocytes, granulocytes et plaquettes par jour est nécessaire. De plus, dans les situations stressantes telles que les infections ou les saignements, l'organe hématopoïétique devra réagir rapidement en produisant le type cellulaire requis. La régulation de l'hématopoïèse est assurée par un système complexe de cellules souches somatiques dont la fonction est strictement contrôlée par des facteurs cellulaires et humoraux.

Si les cellules souches hématopoïétiques sont endommagées et perdent leur fonction (par exemple en raison d'un accident nucléaire), une personne ne peut survivre que deux à quatre semaines sans autre traitement. L'utilisation clinique des cellules souches hématopoïétiques peut sauver des dizaines de milliers de vies par an. Un petit groupe de cellules souches, comprenant seulement quelques 100 à 1 000 cellules, produit des milliards de cellules sanguines par jour. Comment ces cellules souches peuvent accomplir cet exploit, comment elles peuvent persister dans le corps pendant des décennies malgré la production constante

d'autres cellules et comment elles peuvent être utilisées de manière optimale dans les soins de santé sont des questions importantes dans la recherche médicale.

Les cellules matures du sang ont des durées de vie très différentes, qui peuvent inclure sept heures pour les neutrophiles, quelques mois pour les érythrocytes, ou plusieurs années pour les lymphocytes «mémoire». En revanche, la population de cellules souches constitue une source centrale et permanente pour toutes les cellules sanguines et immunitaires. Chaque cellule souche peut prendre trois directions très différentes lorsqu'elle se divise: elle peut à nouveau former deux nouvelles cellules souches, elle peut former deux cellules en cours de maturation et se différencier davantage ou elle peut devenir une nouvelle cellule souche et une cellule en cours de maturation. Les deux premières possibilités de division cellulaire sont le résultat d'une division cellulaire symétrique, tandis que dans ce dernier cas, il y a une division cellulaire asymétrique, qui conduit à des types de cellules différents dans les deux cellules filles. La proportion relative et le rapport entre les trois types de division cellulaire changent au cours du développement et sont également déterminés par les exigences résultant des influences environnementales respectives.

De nos jours Les cellules souches peuvent être isolées au moyen d'une leucaphérèse, une ponction de la moelle osseuse associée à un effort chirurgical majeur n'est plus nécessaire . Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) est le plérixafor, une substance macrocyclique pour bloquer CXCR4, utilisée en clinique pour mobiliser les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse pour la transplantation. La connaissance croissante des mécanismes moléculaires impliqués dans l'implantation et l'émergence des cellules souches vers et hors de la moelle osseuse élargira nos possibilités d'isolement des cellules souches.

Plusieurs facteurs sont considérés pour choisir le type de prélèvement le plus adéquat, L âge du patient par exemple, le protocole de préparation à la greffe entre autres. Dans l'aplasie médullaire, on utilisera le prélèvement de moelle osseuse car le micro-environnement est indispensable à la greffe .Par contre c est le prélèvement sanguin qui sera préféré Pour les maladies qui nécessitent une grande quantité de Cellules Souches Hématopoeitiques(28).

- Les cellules souches mésenchymateuses :

Les CSM sont les cellules souches du tissu conjonctif qui peuvent se différencier en adipocytes, myocytes, chondroblastes, ostéoblastes et cellules stromales de la moelle osseuse. Ils poussent de manière adhérente et forment des colonies ressemblant à des fibroblastes.

Les cellules souches mésenchymateuses se trouvent principalement dans la moelle osseuse, mais dans une certaine mesure, elles se trouvent également dans le sang, dans le tissu adipeux, dans les muscles squelettiques, dans les disques intervertébraux, dans le placenta et dans le tissu conjonctif de la peau(29).

Les cellules souches mésenchymateuses montrent une expression positive de CD105 , CD73 et CD90, mais une expression négative pour le CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alpha ou CD19 et HLA-DR .

Les cellules souches mésenchymateuses sont hétérogènes et peuvent se développer dans différents tissus avec différents microenvironnement. L'environnement influe sur leur capacité à se différencier. Les MSC isolées à partir de tissu adipeux nécessitent non seulement du TGF- $\beta$  mais également de la BMP-6 pour la différenciation chondrogénique. En revanche, les MSC isolées de la moelle osseuse peuvent être stimulées jusqu'à la différenciation chondrogénique avec le TGF- $\beta$  seul. Ils peuvent également se différencier en cellules neuronales, épithéliales ou endothéliales. Jusqu'à présent, aucun

marqueur de surface spécifique n'a été identifié pour les MSC, car ils perdent certains de leurs marqueurs de surface dans différents micro-environnements, mais produisent à la place d'autres marqueurs non spécifiques - mais ils conservent toujours leur multipotence.

En tant que cellules souches, les cellules souches mésenchymateuses sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent encore se différencier en un grand nombre de cellules . De cette manière, ils peuvent compenser la perte de cellules et ainsi remplacer les anciennes cellules défectueuses ou les cellules qui ont été perdues à la suite d'un traumatisme. De plus, ils ont des propriétés immunomodulatrices.

Dans la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses sont une partie importante de la niche de la moelle osseuse: elles sécrètent ici de nombreuses protéines comme :fibronectine, le collagène, la laminine et les protéoglycanes; qui sont importantes pour la fonction des cellules souches hématopoïétiques à partir desquelles les cellules du sang peuvent être générés .

Les études se poursuivent également pour enquêter sur les rapports selon lesquels les CSM aident à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les tissus endommagés. Cela pourrait avoir des implications importantes pour le traitement des lésions tissulaires dues aux crises cardiaques et à d'autres maladies. Les scientifiques étudient également actuellement la capacité du MSC à réduire l'inflammation, à ralentir la progression des maladies auto-immunes et à prévenir le rejet de greffe.

### *3.2.1.3- Autres types de cellules souches adultes :*

D'après le professeur Henry Joyeux (31). nous présenterons ,mis a part des cellules souches hématopoïétiques et des cellules mésenchymateuses, des cellules

souches multipotentes ou unipotentes soient elles qui peuvent régénérer l'organe dont elles sont issues.

les cellules souches de la peau :

Les scientifiques se sont arrivés à identifier une multitude de types (32) :

- Les cellules souches épidermiques .
- Les cellules souches pileux .
- Les cellules souches de mélanocytes .

Les cellules souches intestinales : sont très prometteuses, l'utilisation de ces cellules permettrait de traiter les pathologies inflammatoires intestinales .Ce sont des cellules multipotentes , donnent naissance à quatre principales lignées cellulaires : les entérocytes , les cellules entéro-endocrines , cellules de Gobelet et les cellules de Paneth .

Le cœur , lors d'un infarctus ,les cellules hypoxiques laissent une cicatrice noirâtre indiquant leur mort . Dorénavant on a reconnu que les cellules souches de myocarde reproduisent les myocytes,les cellules musculaires lisses les vaisseaux et les cellules endothéliales du cœur (33)ainsi on déduit que le cœur est capable d'auto-renouvellement et non pas un organe incapable de se régénérer.

Le cerveau ,de la même manière pour le cœur ,on pensait qu'il est incapable de se renouveler , Non seulement nous isolons aujourd'hui des cellules souches dans le système nerveux mais aussi il est possible de stimuler les cellules souches du système nerveux et de les transplanter .les cellules souches neurales permettent d'obtenir après différenciation: les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Ces découvertes nourrissent les espoirs de redonner vie aux zones de cerveau endommagées après une ischémie, ou suite à une maladie neurodégénérative (Parkinson) entre autres .

#### *3.2.1.4- Les cellules souches pluripotentes induites ou IPS :*

Un organisme adulte se compose principalement de cellules dites somatiques. Contrairement aux cellules souches embryonnaires (voir ci-dessus), les cellules somatiques ne sont pas pluripotentes mais se spécialisent dans l'exécution de certaines fonctions dans le tissu respectif (comme les cellules musculaires ou les cellules nerveuses). On a longtemps supposé que cette spécialisation d'une cellule était irréversible.

En 2006, Lorsque le Japonais Shinya Yamanaka a présenté sa découverte au monde professionnel , ils ont été étonné. Jusque-là, le dogme était que les cellules tissulaires adultes étaient déterminées par leur destin - une régression vers les cellules souches était considérée comme impensable. cependant, cela a été réfuté par la «reprogrammation» des cellules somatiques (34). En introduisant seulement quatre facteurs de transcription (ce sont des protéines qui influencent l'activité des gènes dans une cellule), les cellules du tissu conjonctif de la peau de la souris pourraient être restaurées à un état pluripotent. Elles ont retrouvé la capacité d'évoluer vers n'importe quel type de cellule. Par conséquent, ces cellules sont appelées cellules souches pluripotentes induites (iPS). Les réalisations de Yamanaka ont été immédiatement reconnues: en 2012, six ans seulement après sa découverte, il a reçu le prix Nobel de médecine.

Production simple mais longue

Lors de ses premières tentatives, Yamanaka a utilisé un virus modifié pour transporter les quatre gènes - également connus sous le nom de facteurs Yamanaka - dans les cellules tissulaires. Cependant, ce virus pouvait provoquer des cancers et souvent produisait des tumeurs lors des premières expériences sur les animaux. Aujourd'hui, les chercheurs ont de nombreuses autres façons de créer des cellules iPS - le risque de cancer est maintenant considérablement réduit(35).

Les problèmes pratiques demeurent: la génération de cellules iPS est techniquement simple, mais prend beaucoup de temps. Habituellement, seulement environ 1 cellule tissulaire sur 100 est convertie en cellule iPS, et souvent il y en a encore moins. Cela peut donc prendre des mois pour que les cellules se développent et soient disponibles en nombre suffisant pour les expériences. Les cellules iPS ont également le grand avantage que - contrairement aux cellules embryonnaires - elles ne déclenchent aucune controverse éthique. La recherche est donc liée à moins d'exigences et les sources de financement sont plus facilement accessibles.

En médecine, les cellules iPS sont désormais considérées comme un substitut à part entière des cellules souches embryonnaires. On considère maintenant que les préoccupations initiales selon lesquelles la reprogrammation causerait de graves dommages au génome ont été dissipées. Les médecins veulent maintenant utiliser la capacité des cellules iPS à se transformer en chaque cellule du corps pour régénérer les organes malades.

En septembre 2014, les médecins ont opéré une femme âgée qui souffrait d'une forme de cécité liée à l'âge. Ils ont traité un œil avec des cellules rétiniennes cultivées à partir de cellules iPS en laboratoire. La greffe a stoppé la progression de la maladie et n'a eu pratiquement aucun effet secondaire - la voie a été dégagée pour d'autres expériences. Il existe actuellement une vingtaine d'études dans le monde avec des cellules iPS qui traitent des maladies telles que la maladie de Parkinson, l'insuffisance cardiaque et la paraplégie.

Un grand avantage des thérapies cellulaires iPS est que les patients peuvent être traités avec leurs propres cellules souches. Un rejet par le corps ou la transmission de maladies sont quasiment impossibles. Mais la production complexe des cellules iPS entraîne également des coûts et des retards élevés.

D'autres approches utilisent donc des cellules iPS de donneurs sains, qui peuvent être produites et stockées à l'avance.

#### *3.2.1.5- Les niches des cellules souches :*

Dans les sciences de la vie et la médecine, une niche de cellules souches est une zone au sein d'un organisme multicellulaire dans laquelle des cellules souches sont présentes.

Les cellules voisines, qui présentent certaines molécules de surface telles que les intégrines, les cadhérines et les caténines aux cellules souches ou libèrent des molécules signal dans le milieu environnant, jouent un rôle particulièrement important dans la formation d'une niche.

Ces molécules signal assurent un auto-renouvellement régulé, ce qui contribue à la survie des cellules souches dans la niche.

Le développement des forces adhésives signifie que la cellule souche et la cellule stromale de soutien sont étroitement liées l'une à l'autre, de sorte que la cellule souche reste dans la niche de la cellule souche et est donc toujours proche des molécules signal essentielles à sa survie.

L'étroite relation spatiale entre la cellule souche et la cellule de support peut conduire à une polarisation de la cellule souche et donc à une division cellulaire asymétrique: cela conduit au développement d'une cellule souche permanente et d'une cellule précurseur, cette dernière présentant un taux de division. Les produits de division des cellules progénitrices peuvent enfin se différencier davantage. R. Schofield a été le premier à articuler l'idée d'une niche de cellules souches éventuellement existante à la fin des années 1970(36) .

## **IV-THERAPIES CELLULAIRES EXISTANTES :**

### **1-Greffe de cellules souches hématopoïétiques :**

c est une remise a zéro du système sanguin et immunitaire,une sorte de transfusion ;c est une greffe au cours du quelle on remplace les cellules malades par les cellules saines.

### **2- Greffe de cellules de la peau :**

Très souvent on reçoit aux urgences des patients avec une surface brûlée dépassant 70% du corps, l'autogreffe de peau n'est plus possible dans ce cas, la thérapie cellulaire est une sauve vie des grands brûlés. Vu que ce traitement est très coûteux, il est réservé aux brûlures étendues. On prélève donc des CS Cutanées ,après culture on obtient des feuillets épidermiques qui peut s etaler sue une surface totale jusqu'à 2000 fois la surface prélevée .

Cette technique a plusieurs inconvénients ou plutôt des points qu'on espère pouvoir régler un jour ,la longue durée de culture et le risque infectieux presque inévitable :la culture des cellules souches pour créer des feuillets épidermique est de trois semaines(37) .Ce n'est pas encore un traitement parfait car on arrive toujours pas a recréer un tissu cutané complet ,seul l'épiderme qui peut être remplacé par cette thérapie.

### **3-Holoclar ®, le premier médicament de thérapie cellulaire :**

Holoclar est la première thérapie par cellules souches en Europe. Devenir Aveugle lentement - ce sort menace les personnes dont les yeux sont gravement brûlés. Cependant, si une partie de l'œil reste indemne, une entreprise

italienne peut aider. À partir d'un petit échantillon, elle cultive des cellules souches qui régénèrent les tissus et restaurent la vision.

L'application est arrivée sur le marché en 2015 sous le nom d'Holoclar . Des chercheurs italiens avaient déjà investi quinze ans de travail dans le développement, expérimentant une odyssée à travers différents instituts de recherche. En 2008, Graziella Pellegrini et Michele de Luca, les personnes derrière Holoclar, ont fondé la société Holostem à Modène. C'est le seul endroit qui est approuvé pour la fabrication de la préparation de cellules souches. Cependant, Holoclar n'est destiné qu'à un petit nombre de personnes. Deux conditions préalables doivent être remplies: des brûlures sévères et des brûlures chimiques de l'œil ont conduit à la perte des cellules souches dites limbiques, nécessaires à la régénération de la cornée. Et un œil - ou du moins une petite partie de celui-ci - doit encore être intact. Cette forme d '«insuffisance des cellules souches limbiques» est plutôt rare, elle touche à peine plus d'un millier . Cependant, les perspectives de guérison sont bonnes. Les données de 112 patients ont montré qu'après un an, environ trois procédures sur quatre étaient couronnées de succès. La vue s'est améliorée, la douleur et les réactions inflammatoires ont considérablement diminué. Et l'amélioration a duré longtemps - jusqu'à 10 ans pourraient être clairement prouvés.

Les cellules souches limbiques constituent la base, La procédure suit un schéma simple. Les médecins pratiquent une biopsie d'environ 1 à 2 mm<sup>2</sup> du limbe, la frontière entre la cornée et le tissu conjonctif au bord de la pupille. La biopsie est envoyée à Holostem, qui l'utilise pour purifier les cellules souches limbiques, les multiplier et les appliquer sur une membrane d'environ 2 cm de diamètre. Cette membrane est renvoyée au médecin traitant puis implantée dans la partie endommagée de l'œil.

Pour la plupart, Holoclar se compose de cellules cornéennes normales qui renouvellent rapidement le tissu détruit. Cependant, la faible proportion de cellules souches limbiques, qui se situe généralement autour de 3,5%, est déterminante pour l'effet à long terme. Les cellules souches limbiques s'accumulent sur le bord de la cornée et assurent son renouvellement régulier. Sans cela, le tissu conjonctif envahirait la cornée et obscurcirait à nouveau la vision en quelques mois.

Il y a jusqu'à présent peu d'informations publiques sur le nombre de patients traités à ce jour. Entre 2017 et 2018, cinq patients ont été traités dans une clinique ophtalmologique de Cologne, dont quatre ont retrouvé une partie satisfaisante de leur vue. Le coût du traitement avec Holoclar était de 120 000 euros par patient.

#### **4-Les essais cliniques en cours :**

- A partir de cellules souches embryonnaires :

Diverses pathologies pourront bénéficier des capacités des cellules souches embryonnaires.

Les études les plus avancées et les plus prometteuses concernent les domaines de l'ophtalmologie, la cardiologie et le diabète de type 1.

**En cardiologie**, La thérapie régénérative représente une avancée très prometteuse dans le traitement des maladies cardiovasculaires auparavant considérées comme irréversibles. Les lésions du muscle cardiaque entraînent une nécrose et une rupture myocardique, ce qui implique des mécanismes d'adaptation (remodelage et dilatation) et une perte progressive de la fonction cardiaque . Pendant longtemps, ce processus a été considéré comme définitif, on pensait que les cellules du cœur humain étaient au stade post-mitotique et ne pouvaient plus se régénérer. La découverte de cellules souches cardiaques (SC) dans le cœur, qui peuvent se différencier en diverses lignées cellulaires cardiaques , ainsi que la

capacité des cellules souches de la moelle osseuse à se développer en cellules musculaires cardiaques , ont conduit au fait qu'on perçoit aujourd'hui le cœur comme un organe capable de s'auto-régénérer. Cependant, le taux de régénération annuel des cardiomyocytes diminue avec l'âge et <50% des cellules musculaires cardiaques se renouvellent au cours de la vie humaine normale . De plus, contrairement à certaines espèces animales, qui peuvent régénérer jusqu'à 20% du myocarde endommagé , le cœur humain n'est pas en mesure de compenser complètement la perte massive de cellules, qui peut aller jusqu'à un milliard de cardiomyocytes . les thérapies contre les maladies cardiovasculaires disponibles aujourd'hui peuvent remédier totalement ou au moins partiellement au problème fondamental de la perte ultime des cellules musculaires cardiaques. Au cours de la dernière décennie, les résultats de la recherche fondamentale ont été rapidement traduits en essais cliniques portant sur l'innocuité et l'efficacité de la SC dans les maladies cardiovasculaires.

Bien que ce soient les SC avec la plus grande régénération, la principale source de SC est la moelle osseuse en raison de la diversité des cellules d'origine présentes et de la facilité avec laquelle elle peut être obtenue. À l'heure actuelle, les CM de la moelle osseuse sont les SC les mieux étudiés en recherche clinique sur la thérapie cardiaque régénérative. Diverses voies d'application de la SC en thérapie cellulaire ont été étudiées en cardiologie. Le i.v. L'injection a été largement étudiée sur des modèles animaux, mais seulement dans quelques études chez l'homme. Un facteur limitant est le fait que seul rel. quelques SC atteignent la zone endommagée et une grande partie reste dans la microcirculation périphérique. L'injection intracoronarienne (i.c.) est le plus souvent utilisée dans les études cliniques, en particulier après un infarctus de myocarde. Dans cette voie d'application, une migration directe du SC dans les zones myocardiques

vascularisées est possible, ce qui garantit un environnement favorable à la survie de ces cellules (homing). Cependant, la SC doit quitter le système vasculaire et migrer dans les zones myocardiques ischémiques, ce qui comporte un risque potentiel d'obstruction de la microcirculation coronaire. Par injection trans péricardique (chirurgicale ouverte ou mini-invasive) ou transendocardique (percutanée à l'aide d'un système de navigation, NOGA®, qui permet une cartographie électromécanique du myocarde) dans le myocarde (im), la SC peut être injecté directement dans le tissu cicatriciel ou dans le tissu myocardique. La mobilisation pharmacologique des cellules souches de la moelle dans le sang périphérique par injection de cytokines comme le G-CSF, facteur de croissance hématopoïétique, est une autre alternative intéressante en raison de son caractère non invasif et de son excellent profil de sécurité, même si le bénéfice de cette méthode est toujours controversé.

Le mécanisme d'action de la SC dans la régénération myocardique fait toujours l'objet de discussions. La théorie originale d'une transdifférenciation directe du SC dans les cardiomyocytes (cardiomyogenèse) et les vaisseaux sanguins (néoangiogenèse) est de plus en plus remise en question au profit d'autres mécanismes d'action potentiels. Des études ont montré que la SC peut sécréter une large gamme de cytokines, des protéines qui agissent localement sur les cellules cardiaques voisines (facteurs paracrines) et régulent des processus cellulaires complexes. L'état actuel des connaissances est que dans le traitement de l'infarctus de myocarde par SC, les mécanismes paracrines sont principalement responsables de la cicatrisation du myocarde (réduction des lésions ischémiques et reperfusion, alors que la différenciation trans cellulaire (myogenèse et angiogenèse) joue le rôle principal dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Le pronostic des patients atteints d'infarctus de myocarde s'est considérablement

amélioré ces dernières années avec le développement de la thérapie de reperfusion et en particulier de l'angioplastie coronarienne . La mortalité des patients qui développent un dysfonctionnement ventriculaire gauche après infarctus est encore élevée (13% après 1 an), principalement parce que le cœur humain est incapable d'accéder pleinement à la zone nécrotique du myocarde pour se régénérer . La capacité de la cellule souche à se différencier dans les cardiomyocytes et l'amélioration de la FEVG observée sur des modèles animaux ont ouvert la voie à une recherche clinique intensive chez l'homme . Jusqu'à présent, aucune étude n'a pu reproduire clairement les succès prometteurs des expérimentations animales en ce qui concerne l'amélioration de la LVEF, l'expansion de l'AMI et le flux sanguin vers le myocarde chez l'homme . Les méta-analyses confirment la sécurité de l'application et l'efficacité de la thérapie cellulaire, elles montrent une amélioration significative, quoique modeste, de la FEVG (+ 3%) par rapport à la thérapie conventionnelle . Dans la plus grande étude randomisée, l'injection de BMC a montré une amélioration significative de la FE globale (+ 5%) et régionale du VG après 4 mois par rapport au placebo, avec un effet significativement plus prononcé chez les patients présentant une insuffisance cardiaque gauche .

### **En ophtalmologie :**

Un épithélium pigmentaire rétinien (RPE) fonctionnel est une exigence de base pour le maintien de la rétine neurale externe et de la choriocapillaire. Les modifications physiopathologiques, mais aussi liées à l'âge, du RPE peuvent avoir de nombreuses conséquences sur les structures environnantes, par exemple pour la membrane de Bruch (BM), la choriocapillaire, les photorécepteurs ou la matrice extracellulaire. En conséquence, ceux-ci contribuent à la pathogenèse de multiples déficiences visuelles, y compris la dégénérescence maculaire liée à l'âge

(DMLA). C'est la cause la plus courante de cécité dans les pays industrialisés. Environ 8,7% de la population mondiale en souffre. Les médicaments actuellement disponibles ne peuvent que ralentir la DMLA, pas la guérir. Une thérapie à vie avec des coûts élevés et de gros efforts est nécessaire pour le patient.

### **Pourquoi les thérapies standard existantes sont-elles inadéquates?**

La seule thérapie qui s'est avérée jusqu'à présent pour guérir définitivement la DMLA est l'extraction de la membrane sous-rétinienne avec remplacement autologue de la couche de cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes (RPE). Les méthodes précédentes (translocation maculaire, patch choroïdien de fracture RPE), cependant, montrent un taux de complications inacceptable et n'ont donc pas pris de l'ampleur.

La technique de transplantation d'EPR sous-rétinienne promet un caractère nettement moins invasif. Des expériences ont montré qu'une transplantation sous-rétinienne de cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes (cellules RPE) améliore considérablement les fonctions de la rétine. Les premières études à long terme sur des patients atteints de DMLA, dans lesquelles des cellules RPE autologues ont été isolées des zones périphériques, concentrées ex vivo et réinjectées en sous-rétinien sous la macula, montrent également l'innocuité et une amélioration de l'acuité visuelle. Cependant, cette approche est limitée par:

- Faible polarité des cellules sédimentées
- Aucune formation de pelouse de cellules confluentes
- Une greffe autologue chez des patients atteints de DMLA maintient la disposition génétique de la DMLA. En pratique, les patients présentant des plaques choroïdiennes présentent de nouvelles zones d'atrophie aréolaire

L'objectif de ce projet est d'établir une nouvelle méthode de transplantation de cellules souches pluripotentes induites confluentes (iPS) sur une matrice porteuse. A cet effet, les lignées cellulaires iPS sont d'abord caractérisées et amenées à confluence. Ils sont ensuite redifférenciés en cellules RPE et cultivés sur une matrice porteuse jusqu'à ce qu'ils soient confluent. Le patch iPS-RPE caractérisé est transplanté sous la rétine. L'objectif du réseau de recherche européen est d'établir des lignées cellulaires spécialement caractérisées et, à l'aide d'une nouvelle méthode, des lignées de cellules souches cryoconservées dans une cryobanque. Un patch iPS-RPE individualisé est envoyé à la clinique de transplantation dans une chaîne du froid sans soudure, de sorte que la greffe puisse être décongelée directement avant l'opération et transplantée nativement sans aucune perte de fonction. A cet effet, une nouvelle technique chirurgicale endoscopique pour la transplantation mini-invasive de ces patches iPS-RPE est en cours de développement.

### **En diabétologie :**

Les cellules souches adultes sont inoffensives sur le plan éthique et surmontent le problème du rejet allogénique lorsqu'elles sont utilisées de manière autologue. Contrairement aux cellules souches embryonnaires, qui ne sont pas encore disponibles pour une utilisation chez l'homme en raison de leur tumorigénicité et de leurs limites éthiques et légales, les premières études cliniques avec des cellules de moelle osseuse adultes chez des patients diabétiques sont déjà couronnées de succès.

Deux études récemment publiées montrent que la thérapie avec les propres cellules souches du corps - via un mécanisme encore inexpliqué - conduit à une augmentation de la synthèse de l'insuline et réduit ainsi considérablement le besoin d'insuline administrée par des médicaments.

La réduction des cellules  $\beta$  productrices d'insuline dans le pancréas endogène est causalement impliquée dans l'étiologie de la maladie à la fois dans le diabète de type 1 et de type 2. Alors que le diabète de type 2 est caractérisé par la combinaison d'une résistance périphérique à l'insuline et d'un trouble de la sécrétion d'insuline, le diabète de type 1 est caractérisé par une carence absolue en insuline due à la destruction auto-immune des cellules  $\beta$ .

Malgré les préparations modernes d'insuline à action courte et longue, l'ajustement optimal de la glycémie est généralement insuffisant, c'est pourquoi de nombreux patients diabétiques souffrent de complications tardives telles que neuropathie, rétinopathie, insuffisance rénale ou coronaropathie. En conséquence, les chercheurs recherchent actuellement des moyens de remplacer ou de régénérer les cellules  $\beta$  manquantes.

Outre la transplantation de l'ensemble du pancréas ou notamment des cellules des îlots, la transplantation des propres cellules souches de la moelle osseuse de l'organisme dans le pancréas est particulièrement prometteuse.

- Diminution du besoin d'insuline après un traitement avec ses propres cellules souches :

Les résultats d'études cliniques récemment publiés montrent que les besoins en insuline des patients diabétiques peuvent être considérablement réduits et, dans certains cas, même complètement arrêtés par un traitement avec des cellules souches adultes. Voltarelli et coll. dans un petit groupe de jeunes patients atteints de diabète de type 1 que l'association de l'immunosuppression et de l'administration de cellules souches hématopoïétiques a entraîné une indépendance insulinique prolongée chez 14 des 15 patients traités:

La thérapie a permis à un patient de se passer complètement d'insuline pendant 35 mois et quatre autres patients n'ont pas nécessité d'injection d'insuline

pendant au moins 21 mois. Parmi les autres patients, sept sont restés insulino-indépendants pendant six mois et les deux autres entre un et cinq mois (Voltarelli, 2007).

Le groupe de travail de Chen a étudié l'effet des cellules souches de moelle osseuse autologues adultes sur un total de 33 diabétiques de type 1 et de type 2. Ils ont observé que 78,8 pour cent des patients avaient besoin de 25 à 100 pour cent moins d'insuline qu'auparavant dans les trois mois. Trois des 15 diabétiques de type 1 et cinq des 18 diabétiques de type 2 sont devenus 100% insulino-indépendants. L'effet thérapeutique des cellules souches était déjà évident le septième jour après la réinjection et a duré pendant les trois mois entiers .

- Mécanisme d'action des cellules souches adultes :

La manière dont les cellules souches de la moelle osseuse obtiennent cet effet positif sur le métabolisme du glucose n'a pas encore été définitivement élucidée. Voltarelli et coll. a montré que la concentration plasmatique de C-peptide - un marqueur de la propre synthèse d'insuline du corps - augmentait de manière significative en six mois à la suite de la thérapie.

Le niveau constamment élevé même après 12 ou 24 mois suggère un effet durable de la thérapie par cellules souches. Chen et coll. décrit une augmentation significative des niveaux de peptide C en trois mois. Cependant, on ne sait toujours pas si les cellules souches injectées atteignent cet effet par transdifférenciation en cellules  $\beta$  productrices d'insuline ou si elles stimulent la régénération des cellules  $\beta$  encore présentes.

Des études animales ont montré que les cellules souches adultes s'intègrent réellement dans le tissu pour fonctionner, par exemple, des cellules bêta pour différencier ou remplacer les cellules endothéliales endommagées . Cependant, ce

processus semble se dérouler dans une bien moindre mesure qu'on ne le supposait auparavant (environ 1 pour cent).

Aujourd'hui, les scientifiques ont tendance à supposer que les cellules souches ne remplacent pas principalement les cellules défectueuses, mais stimulent plutôt la régénération des cellules encore présentes dans les organes. Les cellules souches de la moelle osseuse semblent déclencher des processus anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et proangiogéniques via la sécrétion paracrine de facteurs de croissance, entre autres, qui influencent positivement la propre capacité de régénération du corps.

*Tableau I: Les principales applications en thérapie cellulaire. [89]*

Cellules du muscle cardiaque (cardiomyocytes)	Infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque, consolidation du muscle cardiaque (cardiomyoplastie) dans des malformations cardiaques.
Cellules produisant de l'insuline (Ilots de Langerhans)	Diabète
Cellules du cartilage (chondrocytes)	Arthrite, arthrose
Cellules sanguines	Cancer, immunodéficiences, leucémie, maladie sanguine génétique
Cellules du foie (hépatocytes)	Hépatite aiguë ou chronique, cirrhose, cancer du foie
Cellules de la peau	Brûlures, cicatrisation des blessures
Cellules osseuses	Pertes osseuses (tumeurs, métastases), fractures, Ostéoporose
Cellules de la rétine	Dégénérescence maculaire liée à l'âge, cécités Héréditaires
Cellules des muscles squelettiques	Dystrophie musculaire, amyotrophies, pertes musculaires de diverses causes ...



*Figure 15: Thérapie cellulaire de lésions de brûlure cutanée radio induite (35)*

A ; lésion nécrotique de la face postérieure du bras .

B ; exérèse tissus nécrotiques musculo-cutanés .

C;injection locale de cellules souches médullaires autologues associée a une autogreffe d épiderme .

D;évolution favorable de la lésion au dixième mois.

## **V-L'APPORT DE LA THERAPIE CELLULAIRE DANS L'ORTHOPEDIE :**

### **1-L arthrose :**

#### **Épidémiologie :**

L'arthrose est la maladie articulaire la plus courante chez les adultes dans le monde, bien que les données sur la prévalence soient incohérentes. Après plusieurs enquêtes représentatives sur l'état de santé de la population adulte en plusieurs pays par entre 2003 et 2010, la prévalence à vie de l'arthrose chez les femmes était de 25% et chez les hommes d'environ 17%.

Dans une revue de 2011 de Pereira et al. les données de 72 articles scientifiques concernant la prévalence de l'arthrose de la main, du genou et de la hanche ont été analysées entre janvier 1995 et février 2011. Il en est résulté la prévalence la plus élevée d'arthrose de la main (43,3%), suivie du genou (23,9%) et de la hanche (10,9%). Les femmes atteintes d'arthrose du genou étaient plus nombreuses que les hommes (27,3% vs 21,0%). Il n'y avait pas de différences significatives entre les sexes dans la prévalence de l'arthrose de la main et de la hanche.

Les différences de prévalence résultent également des critères utilisés pour définir l'arthrose. Sur le plan radiologique, il existe une prévalence à vie basée sur l'ensemble du système musculo-squelettique de près de 100%. Cependant, en l'absence de clinique, les diagnostics radiologiques ne sont pas effectués.

La prévalence de l'arthrose du genou basée sur des critères radiologiques selon Kellgren et Lawrence chez les 70-74 ans est de 40%. Si le diagnostic est posé sur la base de la clinique, il n'est que de 10%.

#### **Étiologies :**

L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage articulaire, caractérisée par une perte de tissu cartilagineux et une nouvelle formation osseuse marginale et centrale (ostéophytes). L'arthrose étant incurable, elle progresse de plus en plus. En fin de compte, cela conduit à de graves déformations osseuses au stade final, appelées arthrose déformante. Étiologiquement, il s'agit d'un événement multifactoriel, dans lequel à la fois des facteurs généraux tels que l'âge, le sexe, l'obésité et la génétique ainsi que des facteurs mécaniques défavorables tels que les traumatismes et le stress intense Jouent rôle.

Une distinction est faite entre l'arthrose primaire (idiopathique) et secondaire. Contrairement à l'arthrose primaire, l'arthrose secondaire peut être attribuée à une cause spécifique ,Il peut s'agir de déformations osseuses telles qu'un traumatisme ou Des désalignements dus à une croissance maligne dans la petite enfance ainsi que des maladies systémiques telles que les maladies rhumatismales, l'arthropathie de la goutte, la chondrocalcinose, ou les infections articulaires peuvent en être la cause.

Physiopathologie :

La plupart des articulations du corps humain sont recouvertes de cartilage hyalin. Celui-ci se compose de 95% de matrice extracellulaire et de 5% de chondrocytes producteurs de matrice. La matrice est formée de collagène, de protéoglycanes et d'eau. Le protéoglycane le plus courant est l'aggrecane, qui a une énorme capacité de rétention d'eau. Ceci est responsable de la résistance axiale et de l'élasticité du cartilage sain. Lorsque les molécules d'agrégats se lient à l'acide hyaluronique, un complexe protéoglycane est créé, qui est intégré dans un maillage tridimensionnel de collagène principalement de type II.

Les modifications physiopathologiques du cartilage articulaire hyalin n'ont pas encore été pleinement explorées. On suppose que plusieurs facteurs

endogènes et exogènes conduisent à une perturbation du métabolisme des chondrocytes et finalement à une destruction irréversible de la matrice cartilagineuse. Dans le passé, l'hypothèse principale était un déséquilibre entre la charge et la résilience du cartilage, aujourd'hui des modèles biochimiques pour le développement de l'arthrose sont également discutés. Dans le métabolisme du cartilage, il existe un équilibre sensible entre les processus métaboliques anaboliques et cataboliques. Les facteurs anabolisants comprennent les facteurs de croissance de type insuline IGF-I et IGF-II. En revanche, les cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1) et les facteurs de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) ont un effet catabolique. S'il y a un déséquilibre en faveur des processus cataboliques, le maillage du collagène et des protéoglycanes est rompu et le cartilage perd sa résistance .

On suppose actuellement qu'une libération accrue d'interleukine conduit à une perturbation de l'équilibre . Les processus cataboliques accrus qui en résultent entraînent des fissures dans le réseau de fibres, ce qui maintient la cascade inflammatoire. Les chondrocytes ne peuvent pas contrer les dommages au cartilage malgré la synthèse accrue à court terme de collagène et de protéoglycanes. De plus, les chondrocytes perdent leur matrice péricellulaire au cours de la dégénérescence, cela se traduit en fin de compte, par une dégénérescence progressive et avec elle la perte de fonction du tissu cartilagineux

La gonarthrose (arthrose de l'articulation du genou) est l'une des maladies les plus répandues , Outre les facteurs de risque généralement applicables à l'arthrose, l'obésité est un facteur de risque important, en particulier pour la gonarthrose. Les plus courantes sont l'arthrose secondaire, dans laquelle le cartilage articulaire est détruit en raison de lésions préexistantes de l'articulation du genou. Les causes courantes sont la dysplasie de la rotule, les désalignements axiaux (genu varum et

genu valgum), les lésions post-traumatiques des articulations et du cartilage, les lésions méniscales

### *1.2- Procédures conventionnelles de réparation du cartilage*

Les différents concepts thérapeutiques de l'arthrose du genou sont constamment évalués et de nouvelles recommandations sont formulées sur la base des découvertes scientifiques. Les recommandations de la Ligue européenne du rhumatisme, qui ont été mises à jour pour la dernière fois en 2003, constituent un bon point de départ. Ils envisagent un concept multimodal de médicaments conservateurs et non médicamenteux ainsi que des modalités de traitement invasives. Le traitement individuel de chaque patient est important.

La thérapie conservatrice consiste en des mesures non médicamenteuses et médicamenteuses. Les deux piliers thérapeutiques ont un effet complémentaire et visent à soulager les symptômes, à maintenir la fonctionnalité et à retarder . Les mesures non médicamenteuses comprennent l'éducation du patient, l'activité physique pour réduire l'obésité, la physiothérapie pour renforcer les muscles, la physiothérapie (par exemple, la cryothérapie, l'électrothérapie) ainsi que les mesures orthopédiques telles que l'augmentation du talon de la chaussure, les talons tampons, etc. Le paracétamol est le premier choix médicamenteux, qui peut également être administré sur une période de temps plus longue. En cas d'inefficacité, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) peuvent également être utilisés.

Si une douleur intense persiste malgré ces médicaments, des analgésiques opioïdes sont utilisés. Cependant, en raison du potentiel de dépendance, de l'effet d'accoutumance et des effets secondaires, ces médicaments ne doivent être utilisés qu'avec une indication bien définie.

L'injection intra-articulaire de corticostéroïdes à action prolongée est indiquée également . Cependant, en raison du caractère immunosuppresseur local de ces substances, le risque d'infection articulaire doit être pris en compte. En cas de données faibles, il existe également un grand nombre d'autres approches thérapeutiques, qui, cependant, ne sont généralement pas couvertes par l'assurance maladie, par exemple l'injection avec des préparations d'acide hyaluronique, la prise de chondroprotecteurs, etc.

#### *1.2.1--Technique des micro-fractures :*

Dans cette technique , les lésions cartilagineuses sont d'abord disséquées, puis l'os sous-chondral est perforé afin que les cellules souches mésenchymateuses avec les facteurs de croissance ,déjà présentes dans la moelle osseuse puissent y pénétrer. Le chirurgien effectue des forages qui seront suivies de saignements osseux amenant les cellules qui s'en chargeront de la réparation cartilagineuse .



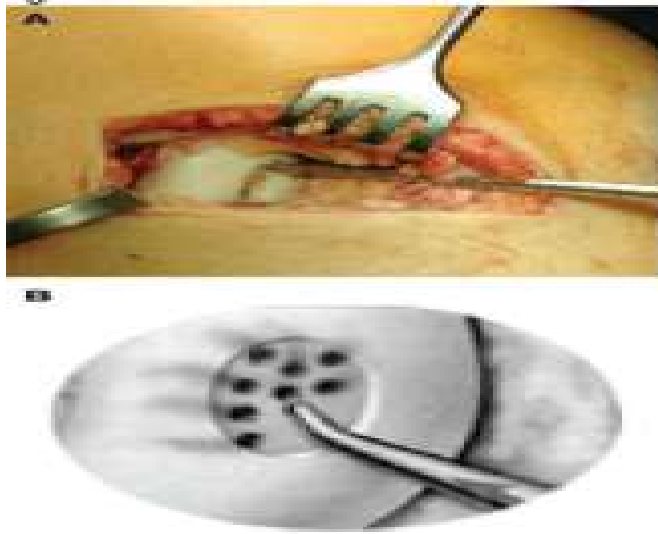
*Figure 16: forages multiples au niveau d'un condyle femoral (36)*



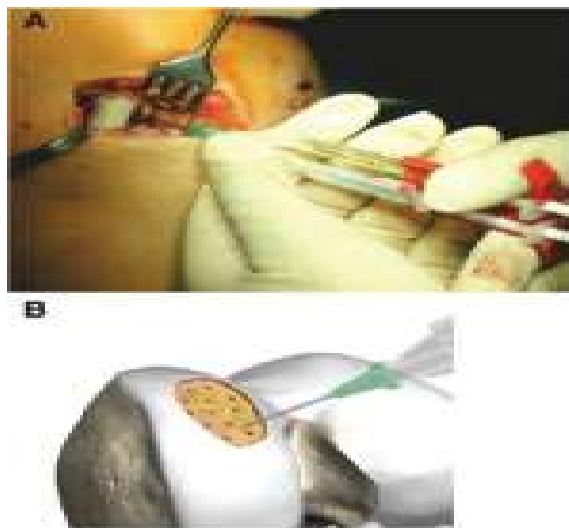
*Figure 17: différentes étapes de la technique des micro-fractures (37)*

La technique de micro fractures bien qu'elle soit d'un faible coût et peu invasive, elle présente un grand défaut : le nouveau tissu est un fibro-cartilage avec des caractéristiques fonctionnelles et biomécaniques inférieures au véritable cartilage hyalin (38).

L'efficacité du traitement est surtout identifiée chez les sujets jeunes (39) mais les résultats disparaissent d'une manière remarquable au long cours (40). La technique a d'autres limites comme la taille de la lésion cartilagineuse qui ne doit pas dépasser 4cm<sup>2</sup> en général pour que les résultats obtenus soient significatifs. Une nouvelle technique de multiforages a été développée pour améliorer la technique de microfractures. Dans cette technique on injecte au niveau des forages une matrice fixée grâce à une colle de fibrine et faite de collagène de type I et III dite AMIC (autologus Matrix-Induced Chondrogenesis), ce type de matrice stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse en chondrocytes. Le tissu fibrocartilagineux obtenu est doté d'une meilleure résistance et durabilité (41). De plus cette technique s'applique sur des lésions d'une taille inférieure (42).



*Figure 18: micro forages (40)*



*Figure 19 : injection a la seringue de la matrice de collagène I et III (41)*

De la même manière que la technique de micro-forage, de bons résultats sont obtenus après l'opération. Il faudra davantage de recul et des études plus nombreuses pour affirmer que les bénéfices observés persistent plus longtemps mais les résultats actuels tendent à confirmer ce résultat. Cependant, les limites concernant l'étendue des lésions ou bien l'âge du patient sont encore présentes.

### *1.2.2- Greffe autologue ostéochondrale et mosaïcplasty :*

Cette technique est apparue après celle des micro-fractures. Elle a été mise au point et développée par L.HANGODY et a commencé à être utilisée en Europe à partir de 1995 (43).

La technique est expliquée à travers les figures ci dessous.



*Figure 20 : mosaicplasty avec site de prélèvement des carottes osteochondrales (43)*



*Figure 21: carottes osteochondrales prélevées sur zone saine du cartilage; a gauche (43)*



*Figure 22: zone greffée avec carottes osteochondrales ; a droite (44)*

Un des intérêts de la mosaïcplasty est l'intégration de la partie spongieuse de la carotte ostéochondrale qui fusionnera avec le lit spongieux de la zone receveuse. De plus la zone cartilagineuse de la greffe fusionnera elle aussi avec le cartilage hyalin adjacent par l'intermédiaire d'un fibro-cartilage qui se formera entre les différentes carottes à partir du sous sol sous-chondral avivé.

L'opération peut se faire par arthroscopie (si la lésion fait moins de 2cm de diamètre) ou par arthrotomie et peut permettre de traiter des lésions cartilagineuses sur diverses articulations telles que celle de la cheville, genou ou hanche.

Une étude menée par **Svend Ulstein** a Comparé les résultats fonctionnels et radiologiques à long terme après la technique de microfractures par rapport à la mosaïcplasty pour le traitement des lésions ostéochondrales du genou.

Vingt-cinq patients (âge moyen 32,3 ans, ET 7,7) présentant une lésion chondrale de pleine épaisseur (International Cartilage Repair Society grade 3 ou 4) de la surface articulée du fémur ont été randomisés pour une mosaïcplasty .À un suivi

médian de 9,8 ans (intervalle de 4,9 à 11,4), les patients ont été évalués à l'aide du score de Lysholm (n = 25), du score de lésion du genou et de l'arthrose (KOOS, n = 25), de la mesure isocinétique du quadriceps et de la mesure de la force des ischio-jambiers. (n = 22) et radiographies debout (n = 23) (44).

Score de Lysholm : Le critère de jugement principal était le score de Lysholm [45], qui est un questionnaire à 8 items (boiterie, soutien, verrouillage, instabilité, douleur, gonflement, montée d'escalier et accroupissement). Le score total est la somme de chaque réponse aux 8 items, d'un score possible de 100 (100 = aucun symptôme ou handicap) Le score de Lysholm est validé pour les patients présentant des lésions cartilagineuses, d'âge et sexe spécifique. Des données de référence fondées ont été établies. Lors du suivi, le questionnaire de Lysholm a été rempli par les patients avant l'examen.

The Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) : Le KOOS est un outil d'évaluation composé de 42 questions réparties entre 5 sous-échelles notées séparément, Chaque score de sous-échelle est converti en une échelle de 0 à 100 (la meilleure). Le KOOS est considéré comme un questionnaire valide, fiable et réactif pour les patients présentant des lésions chondrales du genou. Des données de référence basées sur l'âge et le sexe de la population du KOOS ont été établies.

Radiographies : Des radiographies ont été réalisées patients debout avec les genoux semi-fléchis. L'évaluation et le classement des radiographies anonymisées ont été effectués selon les critères originaux de Kellgren et Lawrence de l'arthrose du genou (0 normal à 4 sévère). Le classement a été effectué par trois des auteurs (SU, AÅ et SL) par consensus.

Résultats

Il n'y avait pas de différences significatives dans le score de Lysholm, le KOOS, la force musculaire isocinétique ou radiographique entre les patients traités par Microfractures et les patients traités par mosaïcplasty. Le score de Lysholm moyen au suivi était de 69,7 pour le groupe MF et de 62,6 pour le groupe mosaïcoplastie.

- Transplantation de chondrocytes autologues :

les chondrocytes sont obtenus à partir de tissu cartilagineux sain du receveur, ils sont multipliés invitro et seront réinjectés après une période définie , au niveau de la perte de substance .On utilise de préférence une membrane dans laquelle les cellules cartilagineuses différenciées obtenues sont intégrées pour assurer l'étanchéité . En raison du degré élevé de différenciation des cellules cartilagineuses, de très bons résultats sont obtenus avec cette méthode. Les inconvénients de ce procédé sont la procédure en deux étapes et surtout les coûts très élevés.

Cette opération se déroule en ces étapes :

- sous arthroscopie on Prélève du cartilage sain
- mise en culture cellulaire dans un laboratoire spécialisé
- implantation de 12 millions cellules dans une matrice pour réimplantation ultérieure au niveau du site lésionnel Après trois semaines de cultures .

Les figures qui suivent résumant ces étapes .



Figure 23: étapes transplantation autologue dans le chondrocyte (46)

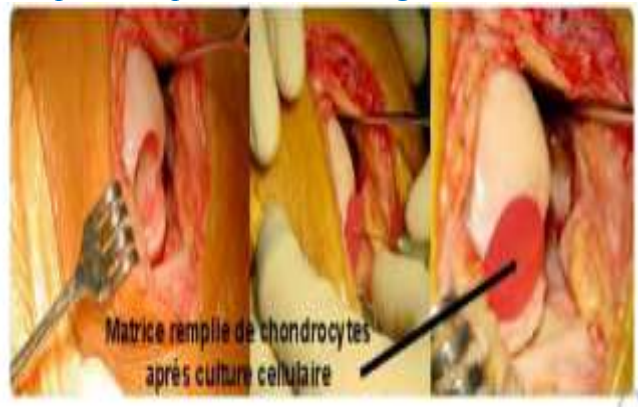


Figure 24: utilisation d'une matrice a la place du lambeau du périoste(47)

la technique de Zhang et coll (47) qui concerne 15 patients d'âge entre 14 et 60 ans, dont 20 genoux présentant des lésions de cartilage de stades avancés ont été opérés ; cette procédure étudie l'implantation de chondrocytes autologues au niveau de lésions cartilagineuses du genou, la matrice utilisée est l'AMIC (Autologous Matrix Induced Chondrogenesis), les matrices les plus utilisées sont à base de l'acide hyaluronique (48)

L'opération a réussi pour 14 patients sur 15 patients. Pour le seul cas où on a échoué, il s'agissait d'un homme de 57 ans présentant des lésions d'arthrose sur les 2 genoux.

La procédure a permis une nette réduction de douleurs et a optimisé les fonctionnalités articulaires ; l'histologie du tissu néoformé ont montré qu'il s'agissait bien de cartilage hyalin et non pas de fibrocartilage .Deplus la radiologie montrait que le tissu occupait l os sous chondral en totalité.

CHONDROCELECT® ,c'est le premier médicament basé sur la technique d'implantation de chondrocytes autologues qui a été approuvé par l'Agence européenne des médicaments et a également obtenu une autorisation de mise sur le marché en octobre 2009. L indication principale de ce médicament est la réparation des lésions cartilagineuses localisées et symptomatiques de grade III ou IV (48) .

### *1.2.3- Cellules souches et arthrose :*

#### *1.3- Quelles cellules souches ?*

Grâce à des décennies de recherche et d'études cliniques sur les cellules souches, nous savons maintenant que les cellules souches ont un énorme effet anti-inflammatoire.

La douleur causée par l'arthrose n'est généralement pas causée par l'usure des articulations, mais plutôt par des processus inflammatoires qui provoquent cette usure. L'injection de cellules souches dans la zone touchée du corps réduit le processus inflammatoire, ce qui entraîne une diminution rapide de la douleur et de l'inconfort.

La thérapie par cellules souches pour les maladies arthrosiques de notre système musculo-squelettique est une lueur d'espoir médicale non seulement en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, mais aussi en raison de son effet régénérateur.

Cheng et coll (49) dans le modèle d'essai sur les cellules souches embryonnaires ont forcé à l'aide de facteurs de différenciation une lignée de cellules souches embryonnaires humaines à entamer une différenciation en chondrocytes. Un très petit nombre de cellules est resté pluripotent. On a réimplanté les cellules progénitrices de chondrocytes dans les zones lésionnelles cartilagineuses des rats immunodéprimés. La comparaison a été faite avec l'injection de fibrine. Sur 12 semaines le tissu obtenu au niveau des lésions est composé majoritairement de collagène de type II et de GAG. Il s'agit donc d'un véritable cartilage hyalin. On conclut alors que les CSE peuvent se différencier en chondrocytes qui se différencieront de leur tour vers un cartilage hyalin.

Pour les cellules IPS, ne posant pas de problèmes d'éthique. Uto et coll ont réussi à régénérer du cartilage hyalin chez un grand nombre de souris (50) mais la différenciation cellulaire était à l'origine de tumeurs (51). D'où la nécessité de réguler et maîtriser la différenciation des CSE pour être sûr qu'ils sont inoffensifs à 100%.

### *1.3.1-Les sources de CSM utilisables :*

De nos jours, trois types de cellules souches mésenchymateuses sont utilisées :

- les CSM de la MO .
- les CSM du tissu adipeux .
- les CSM des tissus fœtaux (gelée de Wharton) .

Les CSM issues de la moelle osseuse ( les plus utilisées dans les essais cliniques sur les défauts cartilagineux liés à l'arthrose) à côté des cellules stromales retrouvées dans le tissu adipeux possèdent bien la capacité de différenciation en chondrocytes d'où la grande utilité dans le traitement de l'arthrose. Au niveau de la moelle osseuse les CSM ne représentent que environ

que 0,001 à 0,01% des cellules, on note la présence de nombreuses autres cellules dont les cellules souches hématopoïétiques. La durée de vie in vitro des CSM mais ils se multiplient en nombre suffisant de cellules grâce à leur adhérence au support plastique (52).

Les cellules souches stromales sont des cellules multipotentes, ces cellules ont la particularité d'être abondantes et d'accès facile au prélèvement. Une liposuction sous anesthésie locale permettra de récolter une quantité suffisante de tissu graisseux pour l'isolation des Cellules Souches Mésoenchymateuses. Chez les souris on réussit aujourd'hui grâce à des agents pharmacologiques (53) de faire migrer les cellules souches du tissu adipeux vers la circulation lymphatique, une fois cette technique est confirmée chez l'homme le recours à cette technique serait de plus en plus de routine (54).

Enfin la troisième source utilisable de CSM sont les cellules de la gelée de Wharton. Le prélèvement de ces cellules, dotés d'un immense potentiel prolifératif, obtient un nombre de cellules souches supérieures que celui de la moelle osseuse, sans oublier qu'il est moins onéreux et plus facile.

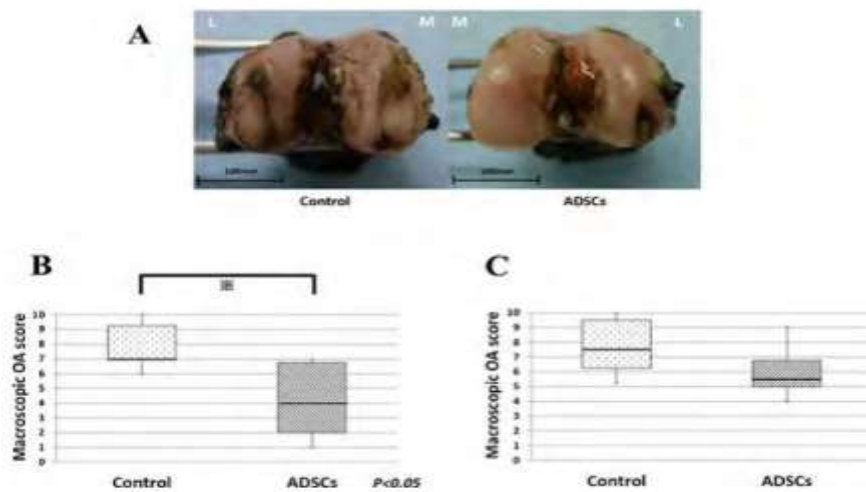
Les différents essais cliniques en cours sur l'utilisation des cellules souches dans l'arthrose démontrent que les cellules issues de la moelle osseuse sont largement majoritaires. Cette constatation semble surprenante vu les avantages des sources comme le tissu adipeux ou la gelée de Wharton.

### *1.3.2-Propriétés des CSM pour traiter l'arthrose :*

\* La chondrogénèse : la capacité de différenciation en chondrocytes, La chondrogénèse comporte deux grandes phases : une phase de condensation des CSM et une phase de différenciation chondrocytaire(55).

Dans l'étude de Kuroda et coll (56) on avait mis en évidence une propriété intéressante des Cellules souches mésenchymateuses , c'est l'action anti inflammatoire et paracrine dans la maladie de l'arthrose .

On avait induit une arthrose bilatérale dans les genoux des lapin par section du ligament croisé antérieur. 4 semaines après, des Cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ADSC) ont été injectées dans le genou gauche, alors que le genou droit a reçu Une différence significative pour le score macroscopique d'arthrose est présente entre les genoux contrôles et les genoux ADSC. Ainsi qu' une nette amélioration a été remarquée dans les genoux ayant reçu l injection de cellules souches ; Ceci est visible sur la figure ci après.



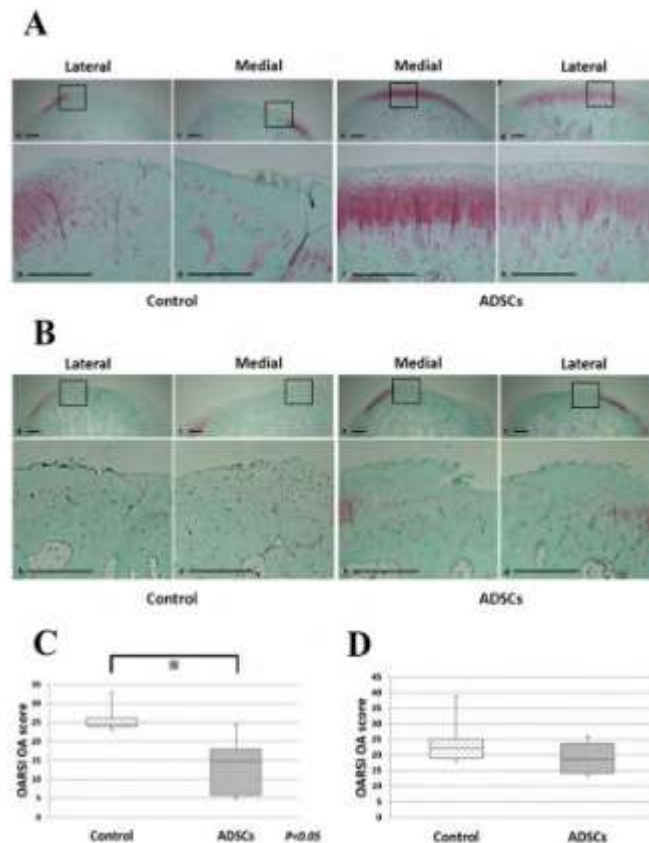


Figure 26: analyse histologique des condyles fémoraux (57)

Le marquage des cellules ADSC montrent leur présence au niveau de la zone subintimale de la synoviale 4 semaines après l'injection et leur disparition complète au bout de 8 semaines. Les analyses immuno-histochimiques ont montré que la métalloprotéinase matricielle (MMP 13), responsable de la dégradation du cartilage, était beaucoup moins présente et active chez les lapins ADSC.

Nous concluons de cette étude :

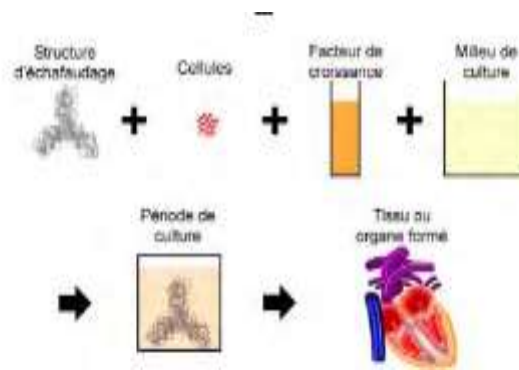
– l'injection de Cellules souches mésenchymateuses a inhibé grâce à l'effet paracrine la dégénération du cartilage mais cet effet disparaît après 2 mois de 1

injection. D ou la nécessité d injections répétées pour garantir la durabilité de de l effet en gardant les cellules souches viables .

### *1.3.3- L'ingénierie tissulaire : outil indispensable pour traiter l'arthrose ?*

L'ingénierie tissulaire est la science de développement des substituts biologiques afin de restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus.

Pour cultiver des cellules souches mésenchymateuses et les pousser a se différencier en chondrocytes un véritable ensemble se composant de 3 structures ( cellules ,facteurs de croissance et milieu de culture ) doit être sous disposition ;Ceci est schématisé dans la figure suivante.



*Figure 27: Principes de l'ingénierie tissulaire (57)*

Les scientifiques font appel à l'ingénierie tissulaire dans l'arthrose soit pour générer in vitro en totalité un tissu cartilagineux fonctionnel et l'implanter a la lésion soit pour greffer la structure au site lésionnel a un stade immature ou elle achèvera sa croissance. Pour cela les chercheurs ont développé les échafaudages : milieu ou les cellules souches mésenchymateuses vont croitre et se différencier pour perdurer une fois l'ensemble est implanté chez le receveur ; l'échafaudage est fait de biomatériaux comme acide hyaluronique ,fibrine ,collagène ainsi que

des polymères artificiels comme le dacron ou téflon (57). Le biomatériau utilisé doit être d'une structure tridimensionnelle idéale au site de l'implantation et bien évidemment doit pouvoir maintenir son intégrité pour longtemps une fois placé dans le site lésionnel du patient. L'échafaudage prends les formes de hydrogel, de masse poreuse, de mousse..

Dans une étude récente, Sheykhhasan et coll ont montré que le choix du facteur de croissance n'est pas le seul facteur déterminant dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses pour cela ils ont comparé 3 échafaudages avec le même facteur de croissance TGF mais avec différents biomatériaux pour trouver lequel d'entre eux était le plus efficace sur la régénération du cartilage. Les biomatériaux étaient à base d'alginate, à base de fibrine, et à base d'acide glycolique L-lactique. Au bout de 14 jours, la technique de la RT-PCR a été utilisée ; La recherche avait conclué que c'est dans l'échafaudage à base de fibrine que les CSM ont proliféré et se sont différenciés le plus en chondrocytes. Le choix d'une structure adaptée est à ne jamais négliger pour maximiser la différenciation des cellules souches.

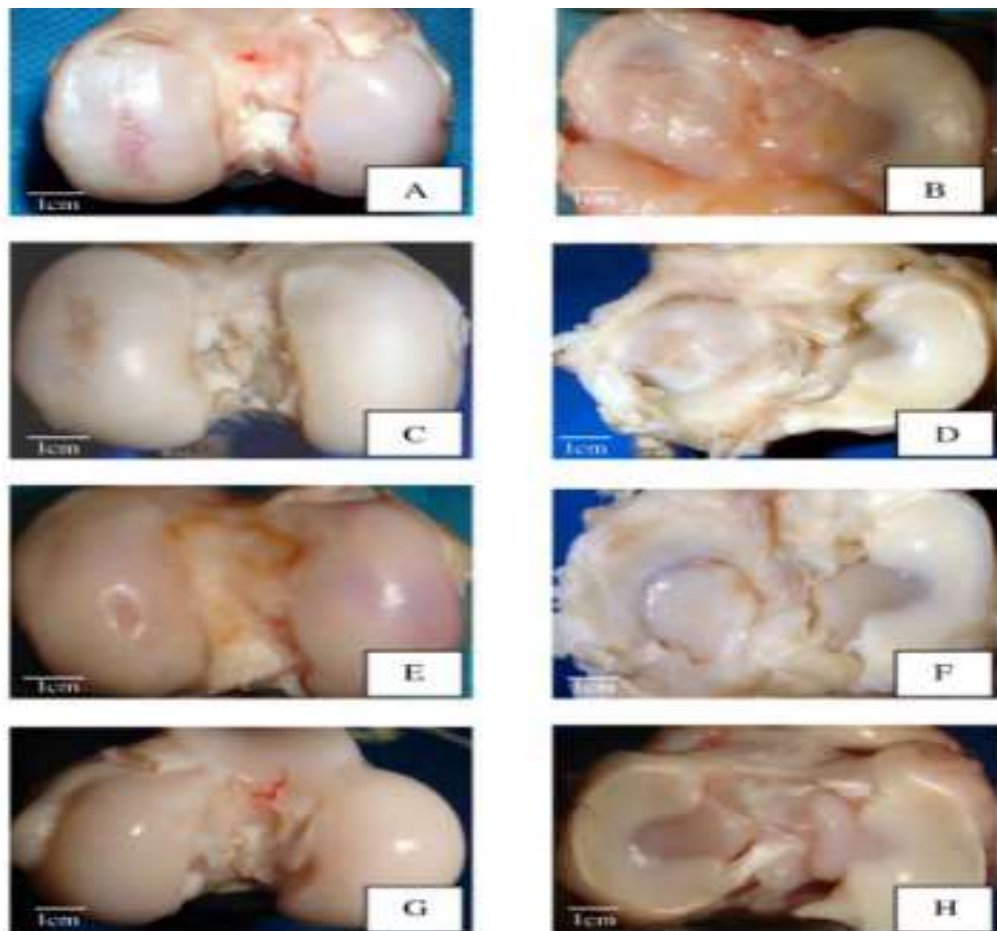
#### *1.3.4- Thérapies cellulaires et/ou ingénierie tissulaire à l'essai dans l'arthrose :*

En 2003 Murphy et coll ont étudié sur un modèle de chèvres qui ont subi une arthrose induite, les effets d'injection de cellules souches mésenchymateuses dans les genoux de chèvre chaque injection contenant 9 millions de CSM autologues. Le groupe de comparaison, a reçu une solution diluée d'acide hyaluronique. Les genoux traités par CSM ont montré une régénération significative et amélioration des symptômes par contre aucune amélioration Dans le groupe contrôle.

Dans un autre essai en 2012, Al Faqeh et coll ont induit l'arthrose chez un mouton. Ils ont utilisé dans un premier groupes des CSM différenciés en

chondrocytes et dans un deuxième des CSM prédifférenciées . Le 3eme groupe n a reçu que du sérum .

Les images G et H représentent les articulations normales (sans excision du ménisque et du ligament). En A et B les genoux du 3ème groupe. Les genoux C et D du groupe 3 et enfin en E et F les genoux du groupe 2.



*Figure 28: analyse macroscopique des différents groupes de genoux (58)*

Résultats : aucune différence entre groupe 1 et 2 une nette amélioration a été remarquée ,par contre aucune amélioration pour les genoux qui n ont reçu que du serum.

En essai clinique. L'efficacité de l'injection intra-articulaire de cellules souches mésenchymateuses allogéniques d'origine adipeuse dans le genou a été

vérifiée dans des modèles animaux atteints d'arthrose, mais pas chez les patients. Néanmoins, la plupart de ces études se concentrent sur les méthodes traditionnelles, y compris les évaluations cliniques, radiographiques, arthroscopiques et histologiques, qui sont insensibles aux altérations tissulaires ultra-structurelles et ne peuvent détecter que des changements morphologiques importants survenus sur de longues périodes.

L'Imagerie par résonance magnétique (IRM), avec son excellent contraste des tissus mous et sa capacité à acquérir des données morphologiques et biochimiques est l'examen de référence, selon Guermazi et al. Pour l'évaluation de la dégénérescence du cartilage dans l'arthrose et la détection de la différence de composition et de structure du cartilage après les traitements. Aurelio et coll. ont utilisé la cartographie T2 pour évaluer la qualité du cartilage articulaire sur des patients atteints de gonarthrose avec un traitement allogénique MSC. Chris et coll. ont évalué la taille, la profondeur du défaut cartilagineux et l'intensité du signal du cartilage régénéré avec une imagerie par résonance magnétique à haute résolution pour des patients traités par injection intra-articulaire de CSM. Et Felix et al. Ont prédit une arthroplastie du genou avec des mesures quantitatives par IRM du cartilage. Cependant, la plupart de ces études ont tenté de détecter des changements compliqués dans la composition et la structure du cartilage uniquement par une ou deux mesures IRM qui étaient spécifiques aux changements dans le cartilage. Compte tenu des limites des spécificités des différents paramètres IRM, des méthodes d'IRM multimodales ont été utilisées pour prédire la structure compositionnelle du cartilage. Les données multiparamétriques utilisant différentes séquences IRM peuvent fournir des informations détaillées sur les processus sous-jacents de la réparation du cartilage et peuvent apporter une spécificité supplémentaire.

Pour différencier les alternances de composition cartilagineuse, nous avons mené une étude IRM avec plusieurs séquences de composition dans un essai clinique de phase I / IIa pour évaluer l'efficacité de l'injection intra-articulaire de cellules souches mésenchymateuses allogéniques chez des patients atteints de gonarthrose. Le but de cette étude était de déterminer la capacité des techniques d'IRM multi-composition à évaluer le potentiel de réparation du cartilage avec des les cellules souches allogéniques d'origine adipeuses chez les patients atteints de gonarthrose.

Analyse semi-quantitative incluant l'IRM de l'organe entier

Deux radiologues ont utilisé les systèmes de score IRM de l'organe entier (WORMS) pour semi-quantifier la gravité des lésions cartilagineuses sur des images en T2 sagittales et en T1, à deux dimensions. Deux radiologues ignorant l'histoire de la maladie du patient ont dessiné manuellement des régions d'intérêt (ROI) de tout le cartilage sur les images 3D. Les régions d'intérêt ont été tirées sur toutes les coupes où le cartilage était visible, y compris le condyle fémoral médial (MF), le condyle latéral (LF), l'intercondyle fémoral (T), le tibia médial (MT), le tibia latéral (LT) et la rotule (P).

Résultats cliniques

Par rapport au temps de base, les patients de tous les groupes de dose ont démontré une réduction significative de la douleur clinique (environ 40%) du score WOMAC ( $42,94 \pm 16,42$  vs  $25 \pm 14,26$ ,  $p = 0,001$ ) et une amélioration (environ 20%) de la qualité de vie dans le score SF-36 ( $89,83 \pm 12,19$  vs  $72 \pm 12,69$ ,  $p < 0,001$ )

Comme le montrent les figures, il y avait une amélioration clinique dans tous les groupes de dose avec le traitement des haMPC allogéniques, en particulier après la troisième semaine (deuxième injection), et une tendance à être plate après

24 semaines. Notamment, les tendances de la notation clinique des trois groupes étaient similaires les unes aux autres, et le résultat de comparaisons multiples a également vérifié qu'aucune différence significative n'était entre les trois groupes de WOMAC ( $F = 0,322$ ,  $P = 0,729$ ) entre trois groupes, ni comme SF-36 ( $F = 0,239$ ,  $P = 0,790$ )

## Discussion

Nous avons utilisé des techniques d'IRM multimodales, associées à des résultats cliniques, pour évaluer le potentiel de réparation du cartilage avec des haMPC allogéniques chez les patients atteints de gonarthrose. Dans notre étude, des différences significatives ont été observées dans les mesures quantitatives chez les patients de trois groupes de dose, y compris les valeurs T1rho, T2, T2star, R2star et ADC, suggérant un possible changement de composition du cartilage avec ce traitement innovant. Une réduction significative des scores WOMAC et SF-36 a montré que les symptômes pouvaient être atténués dans une certaine mesure avec le traitement des haMPC allogéniques.

En outre, nous nous sommes également concentrés sur les sensibilités des mappages multi-paramétriques pour détecter les changements de composition ou de structure du cartilage et nous avons constaté que la cartographie T1rho était plus sensible pour faire la différence entre trois groupes de dose. Comme nous le savons, le cartilage articulaire est constitué d'environ 70 à 80% de liquide et de 20 à 30% de matrice extracellulaire solide (ECM). L'ECM est principalement composé de protéoglycane (PG), de glycosaminoglycane (GAG) et de collagène de type II qui fournit un environnement à mouvement restreint pour les molécules d'eau. Les altérations histologiques et biochimiques de l'ECM cartilagineux impliquent une perturbation du réseau de collagène, une diminution de la teneur en PG ou en GAG et une augmentation de la perméabilité à l'eau. Des études ont

montré que les MSC / MPC étaient capables de restaurer la dégénérescence de l'ECM par la capacité de régénération et de différenciation, ce qui a contribué à la réparation du cartilage articulaire endommagé par la greffe, la production de matrice cartilagineuse et de la réduction de l'inflammation locale . Wen et coll. ont démontré que les haMPC pouvaient empêcher la sécrétion de l'enzyme dégradée par le collagène de type II, appelée MMP-13, et à son tour, sauver la dégradation du collagène de type II . Des études d'IRM ont rapporté que la diminution du contenu des composants ECM conduirait à une augmentation de T1rho, et de plus, Tsushima et al. ont démontré la relation linéaire entre eux . Des études de relaxation T2 in vitro ont montré qu'une augmentation T2 du cartilage est associée à une augmentation de la teneur en eau et à une diminution de la teneur en collagène , et également ont montré une relation étroite entre T2 et l'architecture du collagène . Dans notre étude, une réduction significative de T1rho de trois groupes de dose pourrait indiquer une augmentation de la teneur en composants ECM et un soulagement de la dégénérescence du cartilage.

## Conclusion

En résumé, des séquences d'IRM multi-composition pourraient évaluer la stimulation de la réparation du cartilage avec des CSHMP allogéniques chez les patients atteints de gonarthrose en fournissant des informations supplémentaires sur les altérations de la composition du cartilage articulaire, ce qui pourrait être un outil efficace pour démontrer l'efficacité de ce nouveau médicament et guider la prise de décision clinique dans le traitement de suivi.



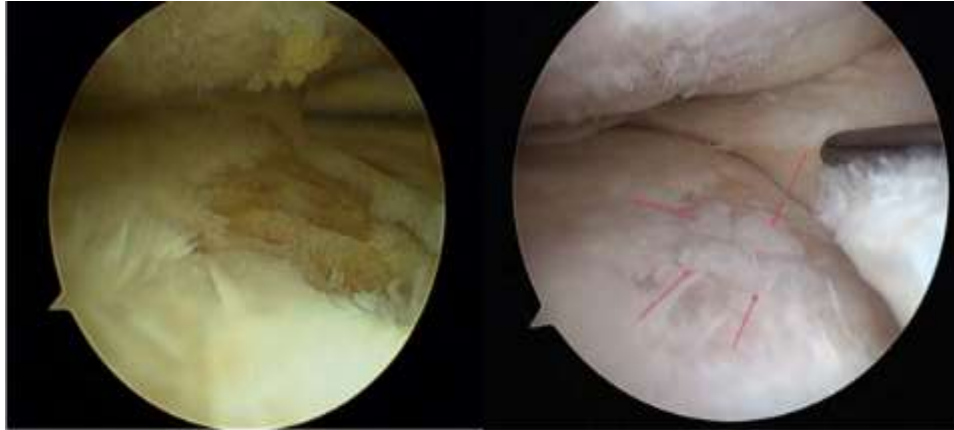
*Figure 29: microforages du condyle fémoral .*



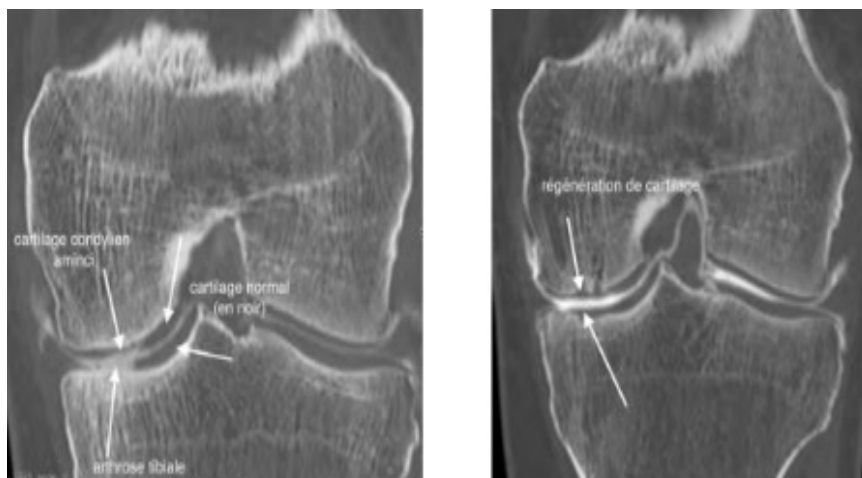
*Figure 30: injection de la matrice contenant les CSM .*

Le Dr Assor dans son essai clinique qui a concerné 45 patients au cours duquel il a injecté une matrice contenant les CSM entre 2011 et 2014 , a publié des résultats en faveur d'une nette amélioration de l'arthrose du genou sur le point fonctionnel et aussi une diminution significative de la douleur. Les patients ont pu reprendre leurs activités journalières de base et aussi professionnelles.

L'essai continue en phase II de confirmation d'efficacité et inclura 350 patients . Les images suivantes montrent la repousse du cartilage :



*Figure 31: visualisation par arthroscopie de la régénération du cartilage chez un patient de 48 ans présentant une arthrose de stade IV (55)*



*Figure 32: Arthroscanner du genou avant et après opération par micro forages et greffe de cellules souches(56)*

### *1.3.5- Discussion :*

Les techniques conventionnelles de traitement de l'arthrose présentent des limites ,elles ne sont pas indiquées a tout le monde et concernent surtout les sujets jeunes ayant une perte minime du cartilage . D ou l'apport de la thérapie cellulaire pourrait élargir le cercle des patients concernés , on réussi déjà aux essais cliniques d'améliorer des formes graves d'arthrose tout en injectant des cellules souches au niveau de l'articulation arthritique .

Matériel: Un essai clinique multicentrique randomisé de phase I / II avec contrôle actif a été mené entre 2012 et 2014. Trente patients diagnostiqués avec une arthrose du genou ont été assignés au hasard au groupe témoin, acide hyaluronique administré par voie intra-articulaire seul, ou à deux groupes de traitement, acide hyaluronique en association avec  $10 \times 10^6$  ou  $100 \times 10^6$  cultures autologues dérivées de la moelle osseuse MSC (BM-MSC), et suivis pendant 12 mois. Après un suivi de 4 ans, les effets indésirables et l'évolution clinique, évalués à l'aide des scores VAS et WOMAC, sont rapportés.

Résultats: Aucun effet indésirable n'a été signalé après l'administration de BM-MSC ou pendant le suivi. Les patients administrés par BM-MSC se sont améliorés selon l'EVA, la valeur médiane (IQR) pour les groupes Contrôle, Faible dose et Forte dose est passée de 5 (3, 7), 7 (5, 8) et 6 (4, 8) à 7 (6, 7), 2 (2, 5) et 3 (3, 4), respectivement à la fin du suivi (faible dose vs groupe témoin,  $p = 0,01$ ; dose élevée vs groupe témoin,  $p = 0,004$ ). Les patients recevant des BM-MSC se sont également améliorés cliniquement selon WOMAC. Le groupe témoin a montré une augmentation de la valeur médiane de 4 points (- 11; 10) tandis que les groupes à faible dose et à forte dose ont présenté des valeurs de - 18 (- 28; - 9) et - 10 (- 21; - 3) points, respectivement (Faible dose vs groupe témoin  $p = 0,043$ ). Aucune différence clinique entre les groupes recevant BM-MSC n'a été trouvée.

Conclusions: L'injection intra-articulaire unique de BM-MSC autologues expansés in vitro est une procédure sûre et faisable qui se traduit par une amélioration clinique et fonctionnelle à long terme de l'arthrose du genou.

Quarante-sept patients atteints d'arthrose du genou radiographique et symptomatique ont été randomisés en trois groupes pour des injections intra-articulaires: CSM autologues dérivés de la moelle osseuse expansée par culture ( $n = 16$ ); MSC + PRP expansés par culture dérivés de moelle osseuse autologues

(n = 14); et corticostéroïde (n = 17). Les résultats ont été évalués par le Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) et l'amplitude des mouvements (ROM) au départ, 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois et l'analyse des cytokines intra-articulaires au départ, 6 et 12 mois. postopératoire.

Résultats: Les trois groupes ont montré une amélioration significative dans la plupart des domaines KOOS et le score global au 1er mois et tous les domaines et le score global au suivi de 12 mois ( $p < 0,05$ ). Au 1er mois, seul le groupe MSC a montré des différences significatives dans le domaine des symptômes KOOS ( $p = 0,003$ ). Les groupes MSC et MSC + PRP ont montré le pourcentage le plus élevé d'amélioration dans la plupart des domaines KOOS et le score global par rapport au groupe corticostéroïde. Les trois groupes ont montré une réduction significative des taux intra-articulaires de cytokine d'interleukine-10 humaine, de la ligne de base à 12 mois ( $p < 0,05$ ).

Conclusion: Une injection intra-articulaire de CSM expansés par culture dérivés de la moelle osseuse avec ou sans la dépendance au PRP est efficace pour améliorer la fonction et diminuer les symptômes causés par l'arthrose du genou au suivi de 12 mois.

Des études sur des modèles animaux ont montré que l'implantation chirurgicale de cellules souches dérivées d'adipocytes (ASC) peut régénérer le tissu cartilagineux endommagé. La thérapie ASC est une option moins douloureuse et moins risquée par rapport aux autres thérapies cellulaires qui nécessitent l'obtention de chondrocytes autologues. Des chercheurs financés par l'UE ont étudié l'efficacité thérapeutique des ASC autologues chez les animaux et les humains dans le cadre du projet «Cellules stromales adipeuses dérivées pour l'arthrose» (ADIPOA). Une nouvelle caractéristique de cette méthode de traitement du genou est l'injection intra-articulaire d'ASC au lieu de l'implantation

chirurgicale. Dans un premier temps, des ASC ont été prises et caractérisées afin d'optimiser l'effet chondroprotecteur dans le cadre d'études in vivo. L'innocuité, l'efficacité et la posologie appropriée de la thérapie ASC ont ensuite été confirmées dans des expérimentations animales et, sur la base de ces données précliniques, l'approbation d'une étude clinique de phase 1 chez l'homme a été obtenue. Dans l'étude de phase 1 de 18 patients qui auraient normalement besoin d'une endoprothèse, trois doses différentes d'ASC ont été testées. Les résultats cliniques et l'imagerie par résonance magnétique ont montré que la fonction articulaire s'est améliorée de manière significative, en particulier dans le groupe avec la dose la plus faible, et la douleur a diminué. Sur les 18 patients initialement envisagés, Après un an de thérapie ASC, seuls deux patients ont décidé de subir une chirurgie du genou. La sécurité du produit et la faisabilité du procédé ont également été confirmées. Les activités du projet ont été publiées dans plusieurs articles dans des revues internationales ainsi que dans plus de 12 publications Web et 8 articles de presse. Outre les interviews pour la radio et la télévision, les résultats ont également été présentés lors de congrès et colloques scientifiques internationaux. Le résultat le plus important est la demande de brevet déposée par un partenaire de projet sur l'activité paracrine de l'ASC. Ce test peut être utilisé pour déterminer rapidement si un patient répondra à un traitement anti-inflammatoire cellulaire. Il convient également au traitement d'autres maladies inflammatoires incurables auparavant. Les résultats du projet seront testés plus avant dans une étude contrôlée de phase 2B. Non seulement les patients et les médecins peuvent alors bénéficier des succès, mais également de la compétitivité de l'UE dans ce secteur mondial de la médecine régénérative.

La présente étude visait à évaluer la sécurité d'un protocole d'augmentation de la dose de cellules stromales dérivées adipeuses injectées intra-articulaires (ASC) chez les patients souffrant d'arthrose du genou, ainsi que l'efficacité clinique en tant que critère secondaire. Un essai clinique de phase I bicentrique, non contrôlé et ouvert a été mené en France et en Allemagne avec l'approbation de l'agence de réglementation pour la procédure d'expansion de l'ASC dans les deux pays. D'avril 2012 à décembre 2013, 18 patients consécutifs atteints d'arthrose symptomatique et sévère du genou ont été traités par une seule injection intra-articulaire de ASC autologues. La conception de l'étude consistait en trois cohortes consécutives (six patients chacune) avec une augmentation de dose: faible dose ( $2 \times 10^6$  cellules), dose moyenne ( $10 \times 10^6$ ) et dose élevée ( $50 \times 10^6$ ). Le paramètre de résultat principal était la sécurité évaluée en enregistrant les événements indésirables tout au long de l'essai, et les paramètres secondaires étaient les sous-échelles de la douleur et de la fonction de l'Indice de l'arthrite des universités de l'Ouest de l'Ontario et de l'Université McMaster. Après 6 mois de suivi, la procédure s'est avérée sûre et aucun événement indésirable grave n'a été signalé. Quatre patients ont présenté une douleur et un gonflement transitoires de l'articulation du genou après une injection locale. Il est intéressant de noter que les patients traités avec des ASC à faible dose ont connu des améliorations significatives des niveaux de douleur et de la fonction par rapport à la ligne de base. Nos données suggèrent que l'injection intra-articulaire d'ASC est une alternative thérapeutique sûre pour traiter les patients atteints d'arthrose sévère du genou. Une étude de phase IIb en double aveugle contrôlée par placebo est en cours d'initiation pour évaluer l'efficacité clinique et structurelle.

Signification: Bien que cette étude de phase I ait inclus un nombre limité de patients sans bras placebo, elle a montré que l'injection locale de cellules souches autologues dérivées de l'adipose était sûre et bien tolérée chez les patients souffrant d'arthrose du genou. Cette étude fournit également des preuves préliminaires encourageantes d'efficacité. Des études à long terme plus vastes et contrôlées sont désormais obligatoires pour confirmer si cette nouvelle stratégie de thérapie cellulaire peut améliorer la douleur et induire un bénéfice structurel dans l'arthrose.

## **2- Ostéonécrose de la tête fémorale**

### *2.1- Qu'est ce que c'est ?*

L'ostéonécrose aseptique de la tête fémorale est la mort d'une portion de la tête fémorale qui peut être causée par des facteurs étiologiques spécifiques (troubles de vascularisation osseuse) comme elle peut être idiopathique. Elle entraîne des douleurs, une mobilité réduite, une déformation articulaire et une arthrose secondaire de la hanche. Le diagnostic se fait par radiographies et IRM. Dans les premiers stades, les interventions chirurgicales peuvent ralentir ou empêcher la progression. Dans les stades ultérieurs, des remplacements articulaires peuvent être nécessaires pour soulager la douleur et maintenir la fonction.

### *2.2- Quelles sont les causes ?*

La cause la plus fréquente d'ostéonécrose est le traumatisme. L'ostéonécrose non traumatique touche plus fréquemment les hommes que les femmes, elle est bilatérale dans > 60% des cas et survient principalement chez les patients âgés de 30 à 50 ans.

## **Ostéonécrose traumatique**

La cause la plus fréquente d'ostéonécrose traumatique est une fracture de la tête ou du col du fémur .L'incidence de l'ostéonécrose après luxation de la hanche est principalement liée à la gravité de la blessure initiale, mais elle peut être plus élevée si la luxation n'est pas réduite immédiatement. Une fracture ou une luxation peut provoquer une ostéonécrose par une perturbation ou une compression massive des vaisseaux sanguins adjacents.

## **Ostéonécrose non traumatique**

Les facteurs les plus courants qui causent ou contribuent à l'ostéonécrose non traumatique sont:

⑩ utilisation chronique de corticostéroïdes : Le risque d'ostéonécrose est augmenté si la dose de prednisone ou d'un corticostéroïde équivalent est  $> 20$  mg / jour pendant plusieurs semaines ou mois , ce qui se traduit généralement par une dose cumulée  $> 2000$  mg.

⑩ consommation excessive d'alcool : Le risque d'ostéonécrose est également augmenté si  $> 3$  verres d'alcool (  $> 500$  ml d'éthanol / semaine) sont consommés sur une période de plusieurs années .

⑩ Certains facteurs génétiques augmentent la susceptibilité à l'ostéonécrose. De subtiles anomalies de la coagulation dues à un déficit en protéine C ou S ou à des anticorps anti-thrombine III peuvent être détectées chez un pourcentage élevé de patients atteints d'ostéonécrose.

Certaines conditions associées à l'ostéonécrose sont traitées avec des corticostéroïdes (par exemple le lupus érythémateux disséminé). Il est prouvé que le risque d'ostéonécrose dans un bon nombre de ces affections est principalement dû à l'utilisation de corticostéroïdes plutôt qu'à l'affection associée.

### *2.3- Symptôme (signes cliniques)*

Les zones touchées peuvent rester asymptomatiques pendant des semaines à des mois après l'agression vasculaire. Habituellement, la douleur se développe progressivement, même si elle peut être aiguë. À mesure que l'articulation s'effondre, la douleur augmente et elle est aggravée par l'exercice et le stress, et soulagée par le repos.

#### Symptômes spécifiques aux articulations

Une ostéonécrose de la hanche provoque des douleurs au niveau du pli de l'aîne ou plus latérales dans un contexte d'activités physiques comme le sport, la marche, la montée/descente des escaliers ou même lors des activités sexuelles. La mobilité est limitée et une boiterie se développe généralement. L'ONA de la hanche évolue progressivement avec des épisodes de poussées douloureuses.

### *2.4- Diagnostic / classification*

\* Rayons X

\* IRM

-L'ostéonécrose est suspectée chez les patients présentant:

\*Fractures associées à une incidence accrue d'ostéonécrose, en particulier si la douleur persiste ou s'aggrave

\*douleur spontanée persistante à la hanche en particulier si des facteurs de risque d'ostéonécrose sont présents

Tout d'abord, des enregistrements de vue d'ensemble doivent être effectués. Vous pouvez être sans anomalies pendant des mois. Les premiers résultats sont des zones localisées de perméabilité accrue aux radiations et de sclérose. Plus tard, une marque sous-chondrale en forme de croissant peut apparaître. Après cela, un effondrement massif et un aplatissement de la surface articulaire sont observés, suivis de changements dégénératifs avancés.

Si la suspicion clinique est élevée mais que les radiographies sont normales ou non diagnostiques, une IRM doit être réalisée, ce qui est beaucoup plus sensible et spécifique. Les deux hanches doivent être montrées. Les scintigraphies osseuses, en revanche, sont moins sensibles et moins spécifiques qu'une IRM et sont rarement réalisées aujourd'hui. La tomodensitométrie est rarement nécessaire, même si elle peut parfois être utile pour détecter une déformation articulaire non visible sur les radiographies et parfois non visible à l'IRM.

Les tests de laboratoire sont généralement normaux et peu concluants pour identifier l'ostéonécrose. Cependant, ils pourraient aider à identifier une maladie sous-jacente (par exemple, troubles de la coagulation, hémoglobinopathies, anomalies lipidiques).

L'ONA évolue en plusieurs stades radiologiques correspondant à la classification de FICAT (ci-contre) :

St 1: radiographies normales (ONA visible seulement à l'IRM)

St 2: ONA visible à la radiographie et sphéricité de la tête fémorale conservée.

St 3: perte de sphéricité de la tête fémorale

St 4: coxarthrose secondaire à l'ONA.

### *2.5- Traitement médical*

Le traitement médical de l'ONA ne permet en aucun cas de limiter la progression de la maladie, il est donc réservé aux patients ayant des contre-indications à l'anesthésie ou chez lesquels une intervention chirurgicale pourrait être trop risquée. Et aussi dans la mise en attente de l'intervention chirurgicale .

\*Réduction de la charge en particulier dans la phase initiale de la maladie, mais le soulagement n'a aucun effet sur la progression de la maladie.

un soulagement de l'extrémité touchée à l'aide de béquilles. Une réduction de poids du patient est également une approche sensée ici.

\* Physiothérapie : Un exercice intensif de physiothérapie n'a aucune influence sur le développement ou la progression . Ainsi, la physiothérapie seule n'est pas une véritable option thérapeutique . Cependant, la physiothérapie joue un rôle important dans le maintien de la mobilité articulaire. Le but d'un exercice physiothérapeutique est d'améliorer ou au moins de maintenir la mobilité des articulations touchées, également en ce qui concerne un éventuel remplacement articulaire ultérieur. La physiothérapie est donc une partie importante de la thérapie multimodale de L ONA . Le résultat des thérapies chirurgicales en combinaison avec la physiothérapie simultanée est nettement meilleur que la thérapie chirurgicale seule .

\*Thérapie aux bisphosphonates : l'affaissement de la surface articulaire pouvait être retardé et donc la nécessité d'une arthroplastie de la hanche a été reportée.

\*Traitement médicamenteux avec des statines : En raison de la physiopathologie possible de la nécrose osseuse aseptique due à une perturbation du métabolisme lipidique, les patients à risque de L ONA ont été traités de manière préventive avec des statines. Une étude menée par le groupe de travail de Pritchett en 2001 a montré une incidence de L ONA dans le cadre d'un traitement à haute dose avec des glucocorticoïdes et l'administration simultanée de statines de seulement 1% chez 284 patients, tandis que les incidences sans administration de statines entre 3% et 20% sont décrites dans le Littérature. Le groupe de travail d'Ajmal, d'autre part, n'a pas pu prouver un lien significatif entre l'administration de statine et la prévention de la l ONA. Une méta-analyse des études animales de la 2016 n'a montré aucun avantage de l'administration de statines en

monothérapie. En combinaison avec d'autres thérapies, un effet positif pour sa survenue .

\* Anticoagulants : L'utilisation d'anticoagulants pour le traitement ou pour éviter l'ONA est très controversée. L'hypercoagulabilité a été identifiée comme un facteur de risque de survenue de l'ONA. En 2005, le groupe de travail autour de Glueck est arrivé aux résultats que le traitement par énoxaparine peut influencer positivement l'évolution de la nécrose de la tête fémorale dans les premiers stades et réduire l'incidence du traitement par prothèse de hanche.

### *2.6- Traitement chirurgical, suites post opératoire et les complications :*

Les traitements chirurgicaux sont plus efficaces lorsqu'ils sont effectués avant un effondrement osseux. Ils ont été le plus couramment utilisés dans le traitement de l'ostéonécrose de la hanche, où le pronostic sans traitement est pire que celui des autres régions. Dans les stades 1 et 2 de FICAT ,lorsque la tête fémorale est toujours sphérique; le traitement chirurgical est a but conservateur .On effectue ainsi sous contrôle radiographique une décompression du centre osseux du fémur : Un ou plusieurs foyers osseux sont retirés de la région nécrotique, ou plusieurs petits alésages ou perforations sont réalisés pour tenter de soulager la pression intra-osseuse et de stimuler la réparation en établissant la néo vascularisation de la tête fémorale . La décompression des foyers osseux est techniquement simple et le taux de complications est très faible si la procédure est effectuée correctement. Une protection contre les charges de poids (uniquement supporté et avec des aides à la mobilité telles que des béquilles ou des aides à la marche) est requise pendant environ 6 semaines pour minimiser l'appui et ainsi diminuer le risque de fracture du col du fémur . La plupart des rapports montrent

des résultats satisfaisants ou bons chez 65% des patients dans l'ensemble et 80% des patients dont les hanches présentent de petites lésions précoces .

L'injection de cellules autologues prélevées sur la crête iliaque lors de la décompression médullaire opératoire a récemment montré qu'elle améliorerait le résultat clinique et l'aspect d'imagerie de l'ostéonécrose de la tête fémorale . Cette procédure est réalisée lors courte d'une hospitalisation . Une anticoagulation préventive est mise en place pour cette période . Si de la rééducation est nécessaire, celle-ci sera prescrite par votre chirurgien lors de la consultation de contrôle 1 mois après l'intervention.

-Les complications possibles :

- \* La fracture du col du fémur .
- \* les risques de L'infection du site opératoire .
- \* un hématome postopératoire se constitue dans les suites d'un forage de hanche.

L'instillation de cellules souches dans la zone de nécrose dans les premiers stades de l'ONA. La surface articulaire ne doit pas s'être affaissée pour cette méthode chirurgicale. L'idée sous-jacente est que des os sains sont régénérés à partir des cellules souches et que l'ONA est ainsi traité de manière causale. Environ trois semaines avant l'opération prévue, des cellules souches sont prélevées sur le patient et traitées. D'une part, cela peut se faire directement à partir de la moelle osseuse, par exemple par une ponction de la crête iliaque. D'autre part, les cellules souches peuvent également être retirées du sang, ce qui est une méthode moins invasive pour obtenir des cellules souches.

L'idée que les cellules souches pourraient former de nouveaux os existe depuis plusieurs décennies. Les groupes de travail autour d'Hernigou se sont montrés pionniers dans la thérapie de l'ONA ; Les méta-analyses actuelles montrent un avantage de l'instillation simultanée de cellules souches par rapport au forage d'un ONA dans les stades précoces. Cependant, il ne faut pas oublier que l'extraction de cellules souches comporte également des risques tels que des infections pour le patient.

#### Évaluation thérapeutique de la nécrose osseuse aseptique:

Il n'est pas facile d'objectiver le succès ou l'échec du traitement dans la nécrose osseuse aseptique, car l'effet de la thérapie a un effet à différents niveaux.

Pour cela, l'imagerie IRM est principalement utilisée, car la taille de l'ONA peut être déterminée dans 3 plans (sagittal / axial / coronaire) en IRM. De plus, une IRM n'endommage pas la santé du patient en cas d'exposition à des radiations telles que B. potentiellement dans le scanner ou dans la radiographie, ce qui est particulièrement important pour les jeunes patients.

En comparant l'étendue d'une ONA dans l'IRM avant et après la thérapie, une déclaration sur le succès de la thérapie peut être faite via le développement de la taille. Selon cette procédure, une augmentation de l'ostéonécrose parle pour un échec thérapeutique, et lorsque la diminution de la taille est constatée on conclut pour la réponse thérapeutique.

La physiopathogénie de l'ONA est encore mal connue. Les hypothèses vasculaires avec interruption du flux artériel, capillaire ou des sinusoides intraosseux ou les hypothèses emboliques et de fragilisation osseuse ne permettent pas d'expliquer l'ensemble du tableau allant de l'apparition de la lésion de nécrose à sa progression vers la fracture. Celle-ci se caractérise par une dissection partant

de la périphérie à la jonction de la zone de revascularisation et du séquestre pour se propager au sein de la zone de nécrose en voie de revascularisation(58).



Figure 33: classification d'Arlet et Ficat (59)

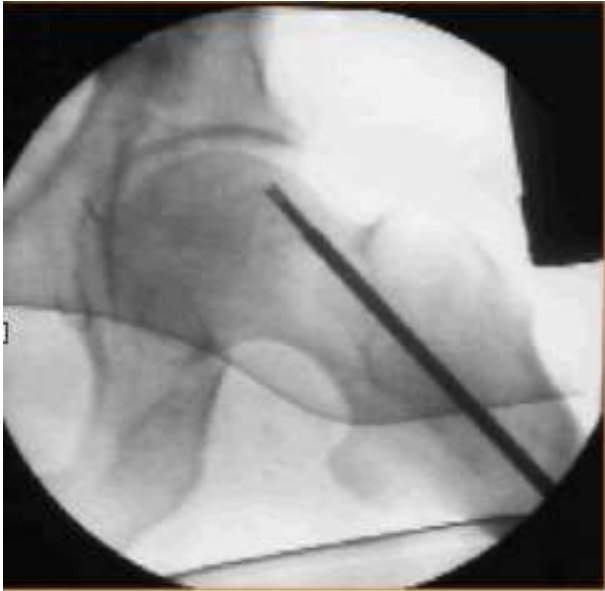


Figure 34: Trocart de Hauzeur en place pour l'injection de moelle (68)

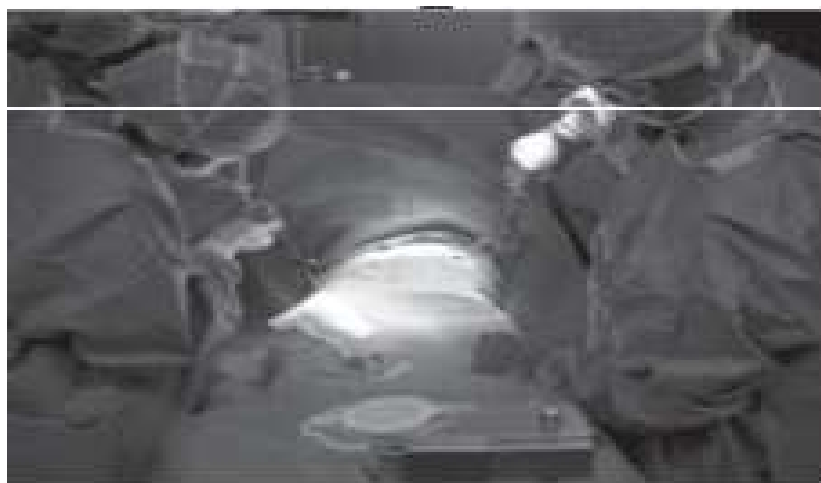


Figure 35: prélèvement de la moelle par aspiration au niveau des crêtes iliaques antérieures (72)

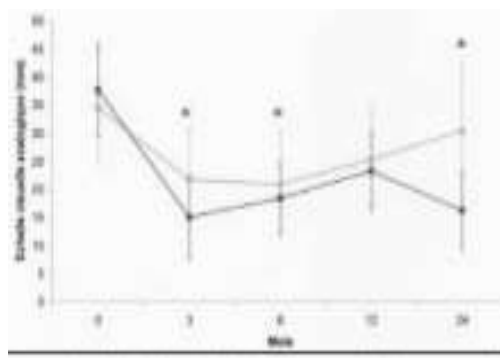


Figure 36: patiente traitée par greffe de moelle, diminution de la douleur au fil du temps (74)

## 2.7- apport thérapie cellulaire dans l'ONA :

Résultats thérapeutiques de l'instillation de cellules souches :

La première publication majeure d'un suivi après instillation de cellules souches vient de Hernigou, le pionnier dans le domaine de l'instillation de cellules souches. Des résultats à long terme après forage avec instillation de cellules souches dans la nécrose de la tête fémorale ont été publiés (61). Dans ce travail 189 nécroses de la tête fémorale chez 116 patients ont été suivies après 5 et 10 ans. Il n'y avait pas de groupe de contrôle. Le succès de la thérapie a été mesuré à

l'aide de trois critères: la fonctionnalité à l'aide du Harris Hip Score, le développement radiologique à l'aide de la classification ARCO et la nécessité d'une prothèse de hanche en postopératoire. Hernigou a montré une amélioration de la fonctionnalité ainsi qu'une amélioration fortement dépendante du stade ARCO préopératoire, développement radiologique et implantation de prothèse de hanche au cours. On peut s'attendre à un plus grand succès thérapeutique avec un stade inférieur de nécrose osseuse, car la maladie n'a pas encore progressé aussi loin. Également présenté à Les patients présentant des concentrations plus élevées de cellules progénitrices dans la moelle osseuse ont globalement de meilleurs résultats, ce qui pourrait indiquer une meilleure capacité de régénération de l'os en raison d'un nombre plus élevé de cellules progénitrices. Dans l'ensemble, la publication d'Hernigou montre un succès thérapeutique du forage avec instillation de cellules souches, mais s'il n'y a pas de groupe témoin, l'effet thérapeutique peut être uniquement dû au forage (62). Dans une autre publication du groupe de travail de Hernigou datant de 2009, 534 nécroses de la tête fémorale au stade I ou II sur 342 patients ont été examinées rétrospectivement entre 8 et 18 ans (en moyenne 12 ans) après forage avec instillation de cellules souches (63). Ici aussi, il n'y avait pas de groupe témoin. Cette étude a également montré une corrélation positive entre le nombre de cellules progénitrices et la diminution de la taille de la nécrose osseuse. Dans la publication du groupe de travail autour de Hernigou a montré une diminution de la taille de la nécrose osseuse d'une moyenne de 26 cm<sup>3</sup> en préopératoire à 12 cm<sup>3</sup> 12 ans après l'opération. Cela signifie que la zone de la nécrose osseuse rétrécit de 54% à 46% de sa taille d'origine. Dans sa publication de 2009, Hernigou ne décrit aucune évolution de taille au fil des ans, mais seulement la valeur initiale et la valeur finale après 12 ans (65). Une courbe de

taille serait ici intéressante afin de reconnaître une évolution négative de l'évolution postopératoire à un stade précoce .

La question se pose de savoir pourquoi dans notre collectif de patients, seul un très petit nombre de patients sont venus pour un suivi annuel, ou après 2 ans et 5 ans pour un suivi. Il est donc d'usage dans notre clinique de faire effectuer des contrôles de suivi clinique et radiologique par le chirurgien orthopédiste traitant ou traumatologue.

Afin de faire une déclaration vraiment bien fondée sur l'efficacité du traitement par instillation de cellules souches, des études avec un groupe témoin approprié sont nécessaires. Le groupe de contrôle optimal ne diffère pas du groupe de la méthode à tester afin d'éviter une éventuelle influence des résultats. Le groupe de travail dirigé par Lachaniette, Poignard et Hernigou a publié en 2012 (66) une étude qui a démontré l'effet thérapeutique du forage avec et sans instillation de cellules souches chez des patients avec nécrose bilatérale de la tête fémorale induite par les glucocorticoïdes. Entre 1988 et 1995, 62 patients présentant une nécrose bilatérale symptomatique de la tête fémorale au stade I ou II ont été forés des deux côtés dans le cadre d'une opération, en même temps des cellules souches ont également été instillées d'un côté. Les résultats préopératoires ont été mis à jour avec les dernières (67)

Résultats comparés après 17 ans en moyenne. Entre autres, le score de Harris de la hanche, le développement de la taille radiologique et la nécessité d'une prothèse de hanche artificielle ont été comparés. Les articulations de la hanche percées avec instillation de cellules souches ont montré une plus grande réduction des symptômes et un affaissement moins fréquent de la tête fémorale. Bien que le nombre de nécroses de la tête fémorale nécessitant une prothèse de hanche était le même dans les deux groupes, la durée était significativement plus

longue entre l'opération initiale d'implantation d'une prothèse de hanche dans la nécrose de la tête fémorale avec instillation de cellules souches que dans la nécrose de la tête fémorale avec forage sans instillation de cellules souches. Également en termes de réduction de la taille de La nécrose osseuse a montré un léger avantage dans la nécrose de la tête fémorale avec instillation de cellules souches. Cependant, les différences entre les deux groupes n'étaient pas statistiquement significatives. Dans cette publication,

l'instillation supplémentaire de cellules souches semble avoir une influence positive sur la réparabilité de l'os et ainsi conduire à une amélioration du résultat (69).

D'une part, il faut penser à la volonté du patient d'avoir le forage malgré le mauvais pronostic lorsque la surface articulaire s'est effondrée. En revanche, un diagnostic erroné préopératoire doit également être envisagé lors de l'évaluation de l'imagerie. Le groupe de travail de Gangji a publié les résultats de deux études prospectives en 2004 et 2011, dans lesquelles 18 et 24 nécroses de la tête fémorale chez 13 et 19 patients, respectivement dans ARCO stade I ou II, soit seules les cellules souches ont été forées, soit des cellules souches ont été instillées en plus du forage. Les patients ont été suivis respectivement pendant 24 mois et 5 ans. Après 24 mois, le groupe avec instillation de cellules souches a montré une réduction significativement meilleure de la douleur et une amélioration de la fonction articulaire par rapport au groupe témoin. De plus, la classification ARCO s'est détériorée au stade III dans une seule hanche avec instillation de cellules souches, alors que dans le Groupe témoin 5 sur 8 nécroses de la tête fémorale aggravée au stade III. Les résultats correspondaient à ceux de l'étude pilote de Gangji de 2004 avec une réduction de la douleur significativement meilleure et une amélioration de la fonction articulaire du groupe par instillation de cellules

souches par rapport au groupe témoin. L'aggravation du stade ARCO était également plus fréquente dans le groupe sans instillation de cellules souches.

En 2016, Pepke a publié une étude prospective randomisée qui comparait également le forage d'une nécrose aseptique de la tête fémorale dans ARCO stade II avec et sans instillation de cellules souches (71). A cet effet, 25 nécroses de la tête fémorale chez 24 patients avec (11Nécrose de la tête fémorale) ou sans instillation de cellules souches (15 nécrose de la tête fémorale) vérifiée après 12 et 24 mois. En ce qui concerne la fonction clinique (Harris Hip Score) et les informations sur la douleur (échelle visuelle analogique), les deux groupes de l'étude de Pepke ne différaient pas en préopératoire. Cela n'a pas non plus changé dans le cours postopératoire. Il n'y avait aucune différence entre les deux après 12 ou 24 mois

En comparant le développement radiologique à l'IRM, les travaux de Pepke n'ont également montré aucune différence entre les deux groupes.

Les suivis IRM n'ont montré aucune augmentation ou diminution significative de la taille de la zone de nécrose dans les deux groupes. Ici, l'opération n'a donc eu aucune influence sur l'évolution de la taille. Dans l'ensemble, il s'est avéré que quelque soit la méthode chirurgicale, avec ou sans instillation de cellules souches, une fonction significativement améliorée et une réduction significative de la douleur est constatée en postopératoire.

Les études des groupes de travail autour de Hernigou a montré de bons résultats dans le forage de la nécrose de la tête fémorale avec instillation simultanée de cellules souches. Cependant, cela n'est probablement pas dû à l'instillation supplémentaire de cellules souches, car il n'y avait pas de groupe témoin et l'effet thérapeutique positif peut donc être dû au forage seul.

## Conclusion

L'implantation de moelle dans la zone de nécrose pourrait être une nouvelle approche thérapeutique qui devrait modifier la prise en charge de l'ON de la tête fémorale. Cependant, ces résultats encourageants devraient encore être confirmés par des études multicentriques incluant un plus grand nombre de patients.

## **VI-CONTRAINTE ETHIQUES, JURIDIQUES ET RELIGIEUX DE LA RECHERCHE SUR LES CELLULES SOUCHES HUMAINES :**

### **1-Définition :**

Les médecins sont de plus en plus confrontés à des défis éthiques dans leur vie quotidienne dans les cliniques et les cabinets. Les progrès médico-techniques ouvrent de nouvelles possibilités d'action et d'intervention au début et à la fin de la vie, qui remettent non seulement en cause notre jugement moral, mais aussi l'image de soi humaine. La question qui se pose de plus en plus souvent est de savoir si tout ce qui est médicalement possible doit réellement être effectué. Dans le même temps, notre société se caractérise par un pluralisme de convictions de valeurs et d'attitudes envers la vie, de sorte que lorsqu'il s'agit de défis éthiques, il est rarement possible de se rabattre sur un consensus de valeurs généralement partagé. Enfin, l'économisation croissante du système de santé conduit de plus en plus à des situations de conflit éthique. L'éthique médicale est en fait aussi vieille que la médecine en tant que discipline écrite traditionnelle.

Déjà dans la Grèce antique, les médecins s'engageaient dans le serment hippocratique à privilégier le patient, à ne pas lui faire de mal et à maintenir la confidentialité. Cet engagement moral des médecins repose sur la situation de base archétypale du besoin et de l'aide, qui a toujours caractérisé la relation médecin-patient: une personne en détresse due à une maladie ne pourra se confier à un médecin que si elle est lui-même Il peut s'appuyer sur le fait qu'il prend en compte certains principes moraux, en particulier qu'il place ses propres intérêts derrière ceux du patient. Ce qui est nouveau, cependant, c'est la complexité croissante des défis éthiques, dont les ethos médical souvent un seul fournit une orientation insuffisante. Non seulement les innovations technologiques, mais aussi les nouvelles structures de soins de santé et les tâches élargies de la médecine

exigent une réflexion et une discussion constamment nouvelles sur les questions éthiques. Là où les limites éthiques de ce qui est médicalement possible doivent être tracées, cela n'a pas été discuté uniquement par les acteurs impliqués, chercheurs et médecins, depuis les années 1970, mais est de plus en plus systématiquement recherché et enseigné dans les instituts médicaux et bioéthiques. La réflexion éthique a trouvé sa place dans les sciences, l'éthos médical est complété et élargi par l'éthique médicale. Elle ne se limite pas à l'activité médicale, mais englobe tous les acteurs du système de santé.

Outre l'enseignement et la recherche, l'éthique médicale a pris une forme explicite et de plus en plus professionnelle dans divers services de conseil. Les décideurs politiques, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur du système de santé, ont de plus en plus recours à l'expertise médicale éthique.

L'examen des projets de recherche sur l'homme par les comités d'éthique peut désormais revenir sur une longue et fructueuse tradition. En revanche, une évolution relativement récente concerne les services de conseil éthique dans les cliniques et autres établissements de soins de santé, qui fournissent un soutien pour les questions éthiquement difficiles liées aux soins des personnes malades ou nécessitant des soins. Cette «consultation d'éthique clinique» est une tentative de mener la réflexion éthique au quotidien dans le système de santé de manière explicite, structurée et méthodiquement soutenue et d'accompagner les acteurs impliqués dans l'exercice de leur responsabilité morale. Il peut éclairer le jugement éthique des décideurs sur place, mais il ne peut pas le remplacer. La responsabilité décisionnelle incombe nécessairement aux acteurs impliqués.

Un objectif essentiel de la réflexion éthique en médecine est de trouver des solutions éthiquement fondées dans des situations de prise de décision difficiles. Cela soulève la question de savoir sur quelles raisons l'éthique médicale devrait-

elle se fonder: quels points normatifs d'orientation devraient être décisifs pour les décisions éthiques en médecine? L'éthique médicale est axée sur des principes .

## **2- contexte éthique :**

### *2-1- Il est important de rappeler les principes éthiques fondamentaux : [78]*

Les quatre principes d'éthique médicale suivants définissent les obligations morales fondamentales des médecins et autres agents de santé. Ils offrent ainsi des conseils contraignants dans les situations difficiles de prise de décision éthique:

Le «principe de bienveillance» oblige tous ceux qui travaillent dans le secteur de la santé à promouvoir au mieux le bien-être du patient, c'est-à-dire à sélectionner les mesures qui offrent le plus grand bénéfice au patient. En général, les mesures qui améliorent l'espérance de vie et / ou la qualité de vie du patient sont utiles.

Le «principe de non-malfaisance» oblige le médecin à ne pas nuire au patient autant que possible grâce aux efforts thérapeutiques. Souvent, le médecin ne peut aider efficacement le patient que s'il anticipe à la fois des risques pour la santé et des charges (cf. par exemple les traitements oncologiques ou de soins intensifs). Dans ce cas, il est nécessaire de peser soigneusement les avantages et les inconvénients pour le patient.

Selon le «principe du respect de l'autonomie», seules peuvent être mises en œuvre les mesures auxquelles le patient lui-même a consenti après une information appropriée (ce que l'on appelle le «consentement éclairé»). Le principe d'autonomie comprend non seulement la liberté de décision, mais aussi l'obligation de soutenir activement le patient dans sa prise de décision et de lui

permettre ainsi de prendre une décision autodéterminée sur les mesures à mettre en œuvre. Les conditions du «consentement informel» sont remplies lorsque le patient est capable cognitivement de prendre des décisions, a reçu suffisamment d'informations et les a comprises, prend une décision volontairement et donne finalement son consentement à la mesure.

Le "principe de justice" va au-delà du patient individuel et exige une répartition équitable des avantages et des charges .

*2.1.1- Chaque stade de prélèvement a un point de vue éthique différent , les principes éthiques peuvent être altérés dans un stade plus que l'autre par conséquent nous discutons cas par cas :*

La recherche sur les cellules souches en particulier s'est accompagnée de débats éthiques complexes et parfois très controversés depuis le début de ce domaine de recherche. La question de l'importance du début de la vie humaine a joué un rôle important, en particulier dans les premiers jours du débat sur la recherche sur les cellules souches, mais elle est toujours débattue aujourd'hui. Bien que la reprogrammation des cellules du corps (voir Cellules souches pluripotentes induites) offre désormais une très bonne alternative à l'utilisation de cellules souches embryonnaires, de nombreuses approches de recherche dépendent encore de l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines, pour la production desquelles des embryons humains ont été utilisés. initialement détruit (voir Cellules souches embryonnaires). Cependant, de nouvelles cellules souches embryonnaires ne doivent pas être obtenues pour chaque question de recherche, mais des lignées de cellules souches déjà établies peuvent être utilisées, car les cellules souches embryonnaires peuvent être reproduites encore et encore dans des conditions de culture.

La discussion éthique se concentre sur la question de savoir si l'embryon humain mérite d'être protégé. Permet-il d'utiliser des embryons pour obtenir des cellules souches ou même de les créer uniquement à cette fin? Il n'y a pas de réponse globale à cela. Dans certains pays, comme l'Allemagne, l'extraction de cellules souches embryonnaires est interdite, dans d'autres systèmes juridiques, seuls les embryons dits excédentaires issus de traitements de fertilité peuvent être utilisés pour la recherche. D'autres systèmes juridiques permettent la création et la destruction d'embryons humains spécifiquement à des fins de recherche. En fin de compte, derrière ces réglementations, il y a toujours des questions sur le statut moral des premières vies humaines. Quand l'embryon humain est-il un être humain au sens moral? De la fécondation, de l'implantation dans l'utérus, d'un certain stade de développement ou, par exemple, de la naissance?

Des bases de données de tissus sont créées pour la recherche sur les cellules souches, en particulier pour la recherche sur les cellules souches pluripotentes induites. Mais quels droits les donneurs de tissus d'origine ont-ils sur les cultures de cellules traitées et comment peuvent-ils être impliqués de manière appropriée dans les résultats de la recherche? Les donneurs de tissus devraient-ils être informés si des anomalies sont observées dans leurs échantillons de tissus au cours de la recherche?

Pour le stade embryonnaire :

\*Les arguments soutenant l'interdiction absolue : [79,80]

***-Le concept de continuité de la vie .***

**-L'embryon est protégé par le principe de dignité .**

\* Les arguments en faveur d'une autorisation encadrée des recherches :[79]

**-L'embryon n'est pas juste des "cellules souches embryonnaires"**

**- Les cellules fœtales qui sont prélevées lors des IVG [81,79]**

***-Les prélèvements post natalis perçue comme un droit de la personne malade.  
[81,79]***

### *2.1.2- Le contexte juridique*

- Situation juridique du Maroc :

les prélèvements d'organes ,juste dans le cas ou la personne est en état de mort encéphalique ont été autorisés juste récemment pour une éventuelle banque d'organes. La loi n°16-98 relative au don d'organes n'autorise pas le don altruiste, même gratuit. Cependant,même si le besoin thérapeutique l'impose, le prélèvement du sang placentaire,bienqu il soit anonyme ou considéré comme « un déchet opératoire », est strictement interdit .

De nos jours ,il existe des projets de loi sur le lancement de banques de cellules souches issues du placenta ou la paroi [83] la ministère de santé envisage également l'encadrement législatif du prélèvement et greffe des cellules souches

-Situation juridique dans les pays européens :

Le conseil d'Europe a laissé le choix libre a chaque pays de son union d opter pour une stratégie de recherche sur les cellules souches , a condition que cette stratégie respecte 2 points importants[84] :

-chaque pays participant a la recherche sur les cellules souches doit préparer un cadre législatif qui protège l'embryon en fixant les conditions et les limites de la recherche.

-tous les pays s'intéressant a la recherche sur les cellules souches doivent interdire la constitution d'embryons .

Les législations selon les pays :

/ L'Irlande, le seul pays de l'union qui interdit la recherche sur les cellules souches , les comités scientifiques irlandaises de recherche sur les cellules souches demandent toujours au gouvernement de légaliser la recherche .

/ la Belgique et des Pays Bas, ne disposent pas de législations sur la recherche sur les cellules souches. les recherches sur l'embryon sont toutefois menées. Par contre Au Portugal , il n y a pas de recherche sur l'embryon même si le cadre législatif est absent dans le cadre en revanche où il n'existe aucune législation sur le sujet.

/Dans les pays comme Autriche, et l'Allemagne il est interdit de mener toute sorte de recherche sur l'embryon . Cependant il existe un cadre législatif encadrant la recherche .Dans les pays comme Finlande, Espagne, Suède et Royaume Uni on autorise la recherche avec des conditions . En France, la loi a légalisé la recherche qui ne porte pas à l'intégrité de l'embryon .

### *2.1.3- Contexte religieux*

Les points de vue de trois grandes religions Islam, Judaïsme et Catholicisme seront donnés.

- Islam : Les embryons sont-ils humains?
- Selon la charia, une distinction doit être faite entre la vie réelle et la vie potentielle. De même, il faut bien distinguer entre un ovule fécondé dans une boîte de Pétri ou un tube à essai en laboratoire et un ovule fécondé dans l'utérus de la future mère. En effet, un embryon a de la valeur car il a le potentiel de devenir un être humain, mais ce n'est pas (encore) un humain. Il y a aussi une grande différence entre le fait que quelque chose soit stocké dans un tube à essai ou une boîte de Pétri ou dans le corps d'un être humain. Les juristes musulmans font une distinction claire entre les premiers stades de la grossesse (les 40 premiers jours) et les derniers stades. Dans ce contexte, il convient de mentionner qu'une fausse couche due à une attaque physique sur une femme enceinte au début de la grossesse entraîne moins

de punition que si elle survient vers la fin de la grossesse. Si l'enfant est tué après sa naissance, l'auteur sera puni pour meurtre. Les embryons peuvent-ils être détruits?

- Une autre question se pose de savoir s'il est permis en vertu de la charia de détruire un embryon à des fins de recherche, même si cette recherche pourrait conduire au développement d'une thérapie pour guérir des maladies autrement mortelles. La réponse à cela est qu'un embryon à ce stade n'est pas humain. Il n'est pas non plus dans son environnement naturel, l'utérus. S'il n'y est pas mis, il ne peut pas survivre et se développer en un être humain. Par conséquent, cette recherche ne peut être rejetée, notamment en raison de son potentiel à développer des thérapies pour des maladies pour lesquelles il n'y a actuellement aucune chance de guérison (Parkinsonisme, Alzheimer, etc.). En revanche, il est important d'établir des règles strictes contre l'abus d'embryons. La recherche sur les embryons peut également conduire à des abus et, par conséquent, des mesures de sécurité appropriées doivent être prises [85,86]

- Le Judaïsme :

Pour les juifs, c'est la halakha qui définit leur comportement dans la vie. La Halakha est basée sur la Torah et ses valeurs éternelles, mais elle est néanmoins sujette à une révision constante en fonction de l'évolution des connaissances humaines et, en particulier, des dernières réalisations scientifiques.

Les juifs ne connaissent ni pape ni autorité supérieure capable de prendre des décisions dans de nouveaux domaines. Certains décideurs rabbiniques, appelés poskim, qui ont de profondes connaissances talmudiques et qui ont de plus en plus bénéficié d'une formation scientifique (en médecine, physique, chimie, biologie, etc.), suivent l'avancée des sciences et étudient la compatibilité

des nouvelles découvertes aux valeurs fondamentales du judaïsme. Ils élaborent des conclusions et les publient. Certains d'entre eux sont plus conservateurs que d'autres, mais petit à petit, un consensus peut se dégager sur chaque sujet.

«Tu ne tueras pas» est l'un des dix commandements. D'autre part, les humains doivent faire tout ce qui est en leur pouvoir pour préserver la vie et même avoir le devoir de bénéficier de tout ce que la science a à offrir pour améliorer leur santé.

Le troisième élément essentiel vient du Talmud et ne se trouve pas dans les autres religions: pour les juifs, la vie ne commence ni par la fécondation ni par la naissance, mais le 40<sup>e</sup> jour de la grossesse. Avant cela, le fœtus n'est pas considéré comme une personne, comme un être humain. À partir de cela, on pourrait extrapoler que d'ici ce 40<sup>e</sup> jour, il y a une possibilité de détruire les embryons en excès, et sinon tous les Poskim soutiennent cette interprétation, la plupart d'entre eux le font. Raw Joseph Shalom Eliyashuv, probablement le plus influent des Poskim d'aujourd'hui, comme Raw Moshe Feinstein s. A. avant lui, a pris une position claire en déclarant la destruction d'embryons présentant de graves dommages pour la santé, qui ne peuvent donc être ni implantés ni implantés approuver.

Si la destruction des embryons excédentaires est approuvée, y a-t-il un droit de les utiliser pour obtenir des cellules souches embryonnaires? Si cette procédure a lieu dans les premiers jours après la fécondation, alors le rabbin Moshe David Tendler, un autre des grands Poskim de notre époque, répond par oui à cette question. Cependant, tous ne sont pas d'accord.

Pour les Juifs, l'utilisation de cellules souches embryonnaires n'est autorisée que si la recherche concernée est exclusivement orientée vers l'application thérapeutique. Les cellules souches ont un énorme potentiel pour guérir ou

supprimer certaines maladies ou malformations graves. Éradiquer les maladies incurables (telles que la maladie d'Alzheimer) ou les maladies gravement débilitantes est l'une des tâches les plus importantes de la médecine d'aujourd'hui, conformément à l'importance que le judaïsme accorde à la vie[85,87]

- Le Catholicisme :

la tradition catholique s oppose fermement aux recherches sur les cellules souches embryonnaires , Selon les textes bibliques, l embryon est un futur être humain qui a droit comme tout le monde a sa propre vie . Chaque Pape a constamment confirmé que la vie naissante (l embryon)est un don sacré et inviolable du dieu . Par conséquent, l'Eglise catholique affirme que Chaque embryon doit avoir toutes ses chances de vie pour parvenir à terme sans intervention des humains. [85,88]

## RÉSUMÉ

**Titre de la thèse : Biotechnologie, L'apport de la cellule souche dans l'orthopédie .**

**Auteur : Mr INHAD ZAKARIA**

**Encadrant : Professeur Azzedine Ibrahimi .**

**Mots clés : cellules souches - thérapie cellulaire – l'orthopédie .**

L'objectif de cette thèse est de définir la médecine régénérative, ses composantes principales représentées par les cellules souches et leurs apports efficace en traumatologie dans des pathologies fréquentes pour lesquelles on dispose actuellement de plusieurs traitements mais pas efficaces à 100% motivant les chercheurs à se diriger vers d'autres thérapies comme la thérapie cellulaire .

La première partie de cette thèse définit les cellules souches, leur découverte grâce au microscope et les techniques de culture cellulaire, les cadres réglementaires qui régissent leur utilisation vers le bien et décrit les multiples possibilités d'exploitation potentielle de leurs propriétés en thérapeutique. Le cadre légal des Cellules souches mésenchymateuses est plus souple que celui des cellules souches embryonnaires.

Dans la deuxième partie, nous montrons les limites thérapeutiques dans les maladie de l arthrose et de l ostéonécrose de la tête fémorale , et nous discutons les résultats des essais cliniques les plus récents de l apport de la thérapie cellulaire dans ces pathologies du point de vue d efficacité et innocuité ainsi que les types de cellules souches concernées et leurs modalité de prélèvement , culture et réimplantation .

Le domaine de biotechnologie est le domaine s intéressant a la recherche sur les cellules souches ,c est un domaine qui ne cesse de se développer mais je pense que pour notre pays le Maroc il faut avoir un cadre légal et éthique le régissant pour que le peuple bénéficie des fruits de ces technologies d une manière adéquate .

## SUMMARY

**Title: Biotechnology, The contribution of stem cells in orthopedics .**

**Author : Mr INHAD ZAKARIA**

**Instructor : Professor Azzedine ibrahimi**

**keywords : stem cells - cell therapy - orthopedics**

The objective of this thesis is to define regenerative medicine, its main components represented by stem cells and their usefulness in frequent pathologies for which there are currently several treatments but aren't 100% effective, that has motivated researchers to start developing other therapies such as cellular therapy.

The first part of this thesis defines stem cells, their discovery through the microscope and cell culture techniques, the regulatory frameworks governing their use and describes the potential exploitation of their properties in human therapeutics. Stem cells from amniotic fluid (SCAF) are mesenchymatous stem cells (MSCs) that have remarkable potential therapeutic properties. The legal framework of MSCs is more flexible than the one for embryonic stem cells, and the specific properties of MSCs, such as the secretion of growth factors, have made these cells undergo advanced clinical and preclinical studies.

In the second part, we show the limits of therapeutics in osteoarthritis and osteonecrosis of the femoral head, and we discuss the results of the most recent clinical trials of the contribution of cell therapy in these pathologies from the point of view of efficiency and safety as well as the types of stem cells involved and their method of collection, culture and resettlement.

The field of biotechnology is the field that studies stem cells, this is an area that continues to develop but I think that for our country Morocco it is necessary to have a legal and an ethical framework governing it so that the people could benefit from the fruits of these technologies in an adequate way.

## ملخص

**العنوان :** التكنولوجيا الحيوية ، مساهمة الخلايا الجذعية في جراحة العظام :

**الكاتب :** إنهاد زكرياء

**الاستاذ المشرف:** الاستاذ عز الدين الابراهيمى

**البحث :** الخلايا الجذعية - العلاج بالخلايا - جراحة العظام

الهدف من هذه الأطروحة هو تعريف الطب التجديدي ، ومكوناته الرئيسية ممثلة . بالخلايا الجذعية وإسهاماتها الفعالة في طب العظام

يعرف الجزء الأول من هذه الأطروحة الخلايا الجذعية واكتشافها باستخدام تقنيات المجهر وزراعة الخلايا والأطر التنظيمية التي تحكم استخدامها ويصف الاستغلال المحتمل لخصائصها في العلاج البشري . يُعد الإطار القانوني للخلايا الجذعية المتعددة الخلايا أكثر مرونة من إطار الخلايا الجذعية الجنينية وبفضل الخصائص المميزة للخلايا الجذعية المتعددة الخلايا ، مثل إفراز عوامل النمو ، فإنها تخضع حاليًا لدراسات سريرية وما قبل سريرية متقدمة

في الجزء الثاني ، نعرض الحدود العلاجية لأمراض هشاشة العظام ونخر العظام في رأس الفخذ ، وناقش نتائج أحدث التجارب السريرية لمساهمة العلاج بالخلايا في هذه الأمراض من وجهة نظر د الفعالية و السلامة وكذلك أنواع الخلايا الجذعية المعنية وطرق جمعها وزرعها وإعادة زرعها

مجال التكنولوجيا الحيوية هو مجال الاهتمام بالبحث عن الخلايا الجذعية ، وهو مجال يستمر في التطور ولكن أعتقد أنه بالنسبة لبلدنا المغرب يجب أن يكون لدينا إطار قانوني وأخلاقي يحكمه حتى يستفيد الناس من ثمار هذه التقنيات بطريقة مناسبة

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1-Joël de Rosnay, « The Macroscope » sur Principia Cybernetica Web .
2. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet.9ème édition, Masson2002.
3. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet.10ème édition, Masson2006.
4. Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes, 2 ème édition. J c Callen. DUNOD.2005.
4. He, S, Nakada, D, and Morrison et al Mechanisms of stem cell self-renewal. 2009; 25: 377-406.
5. Frenette, PS, Pinho, S, Lucas, D, and Scheiermann, C et al. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. 2013; Rev Immunol 31: 285-316.
6. Yin, H, Price, F, and Rudnicki, MA et al. Satellite cells and the muscle stem cell niche.2013; Physiol Rev 93: 23-67.
7. Gonzalez-Perez, O, Gutierrez-Fernandez, F, Lopez-Virgen, V, Collas-Aguilar, J, Quinones-Hinojosa, A, and Garcia-Verdugo, JM et al . Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain.2012; Neuroscience 226: 270-281.
8. Watt, FM, and Hogan, BL et al. Out of Eden: stem cells and their niches . 2000; Science 287: 1427-1430.
9. Chen, S, Lewallen, M, and Xie, T . Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation.2013; Development 140: 255-265.
10. Reynolds, A, et al . Canonical Wnt signals combined with suppressed TGFbeta/BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium.2013 ;21:8-12 .
11. Hirai, H, Karian, P, and Kikyo, N et al. Regulation of embryonic stem cell selfrenewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. Biochem .2011 ;J 438: 11-23.

12. Gotoh, N et al. Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells.2009; *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 9-15.
13. Takahashi, K, et al. . Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors 2007; *Cell* 131: 861-872.
14. He, XC, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. 2004; *Nat Genet* 36: 1117-1121.
15. Katoh, M et al. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. 2007; *Clin Cancer Res* 13: 4042-4045.
16. Borovski, T, De Sousa, EMF, Vermeulen, L, and Medema, JP (2011). Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res* 71: 634-639.
17. Rossant, J (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19: 477-482.
18. De Miguel, MP, Fuentes-Julian, S, and Alcaina, Y (2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev* 6: 633-649.
19. Takahashi, K, and Yamanaka, S et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.2006; *Cell* 126: 663-676.
20. Ratajczak, MZ, Zuba-Surma, E, Kucia, M, Poniewierska, A, Suszynska, M, and Ratajczak, J (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci* 57: 1-17.
21. Majo, F, Rochat, A, Nicolas, M, Jaoude, GA, and Barrandon, Y et al. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface.2009; *Nature* 456: 250-
22. Ko, K, et al. Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells.2009; *Cell Stem Cell* 5: 87-96.
23. Passweg J, Chalandon Y, Lehmann T et al. *Paediatrica*. 2010, 21, p.52-55.
24. Agence de la biomédecine. Rapport médical et scientifique. Disponible sur: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2012/donnees/cellules/04-consulté le 24/03/2021> .

25. Reppel L. Potentialité des cellules stromales de la gelée de Wharton en ingénierie du cartilage. Thèse de doctorat d'université. Université de Lorraine, 2014. Disponible sur: [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC\\_T\\_2014\\_0164\\_REPPEL.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2014_0164_REPPEL.pdf) consulté le 24/03/2021 .
26. Maumus M. Caractérisation des cellules souches/progénitrices CD34+/CD31- du tissu adipeux humain et influence du microenvironnement sur leur prolifération, migration et différenciation. Thèse de doctorat d'université. TOULOUSE. Université Paul Sabatier,
2009. Disponible sur: [http://thesesups.ups-tlse.fr/1214/1/Maumus\\_Marie.pdf](http://thesesups.ups-tlse.fr/1214/1/Maumus_Marie.pdf) consulté le 24/03/2021 .
27. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, André-Schmutz I et al. Moelle osseuse : réservoir de cellules souches réparatrices de différents tissus ? Ann Biol Clin (Paris). 2004;62(2):131-8.
28. Agence de la Biomédecine. Don de moelle osseuse. Disponible sur: [http://www.agencebiomedecine.fr/IMG/pdf/dossier\\_de\\_presse\\_4eme\\_semaine\\_vdef.pdf](http://www.agencebiomedecine.fr/IMG/pdf/dossier_de_presse_4eme_semaine_vdef.pdf) consulté le 24/03/2021 .
29. Roubéix C. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome. Thèse de doctorat d'université. Université Pierre Marie Curie, 2014. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01134389/document>
30. Noguès C, Creane M. Euro Stem Cell. Les cellules souches mésenchymateuses : les « autres » cellules souches de moelle osseuse. Disponible sur: <http://www.eurostemcell.org/fr/factsheet/les-cellules-souches-m> consulté le 24/03/2021 ..
31. Joyeux H. Cellules souches : espoirs thérapeutiques. Disponible sur: <http://www.professeur-joyeux.com/espoirs-therapeutiques-cellules-souches/> consulté le 24/03/2021 .
32. Maggioni M. Euro Stem Cell. Cellules souches de la peau: où se trouvent-elles et que peuvent-elles faire? Disponible sur: <http://www.eurostemcell.org/fr/factsheet/cellules-souches-de-la-peau> .consulté le 24/03/2021 .
33. Bismuth C. Les cellules souches chez l'adulte, applications possibles en médecine vétérinaire. Thèse doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil,

2008. Disponible sur: <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php> consulté le 24/03/2021.

34. Goblot P. Cité des sciences et de l'industrie. IPS, la nouvelle révolution cellulaire. Disponible sur: <http://www.universcience.tv/video-ips-la-nouvelle-revolution-cellulaire450.html?> . consulté le 24/03/2021 .

35. Le Bousse-Kerdilès MC. Inserm. Niche des cellules souches hématopoïétiques. Disponible sur: <http://institut-lwoff.fr/niche-des-cellules-souches-hematopoietiques> . consulté le 24/03/2021 .

36. Pharmacorama. Régulation de la division cellulaire. Disponible sur: [http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Therapie\\_geniquea3.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Therapie_geniquea3.php) . consulté le 24/03/2021 .

37. Peschanski M. Inserm. Première reconstitution d'un épiderme à partir de cellules souches. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/espace-journalistes/premierereconstitution-d-un-epiderme-a-partir-de-cellules-souches> . consulté le 24/03/2021 .

38. Berta Á, Duska Z, Tóth F et al. Clinical experiences with cartilage repair techniques: outcomes, indications, contraindications and rehabilitation. *Eklemler Hastalıkları ve Cerrahisi* Jt Dis Relat Surg. 2015;26(2):84-96.

39. Bark S, Piontek T, Behrens et al. Enhanced microfracture techniques in cartilage knee surgery: Fact or fiction? *World J Orthop*. 2014;5(4):444-9.

40. Ulstein S, Årøen A, Røtterud JH et al. Microfracture technique versus osteochondral autologous transplantation mosaicplasty in patients with articular chondral lesions of the knee: a prospective randomized trial with long-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014;22(6):1207-15.

41. Ulstein S, Årøen A, Røtterud JH et al. Microfracture technique versus osteochondral autologous transplantation mosaicplasty in patients with articular chondral lesions of the knee: a prospective randomized trial with long-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014;22(6):1207-15.

42. Dickhut A, Gottwald E, Steck E et al. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008;13:4517-28.

43. Benthien JP, Behrens P. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC). *Cartilage*. janv 2010;1(1):65-8.
44. Boyer T, Bonvarlet JP. Traitement des lésions cartilagineuses du genou. Disponible sur: <http://thierry.boyer13.pagesperso-orange.fr/Lesions%20cartilagineuses.html>
45. Tegner Y, Lysholm J (1985) Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. *Clin Orthop Relat Res* 198:43–49.
46. Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody LR et al. Autologous osteochondral grafting-- technique and long-term results. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S32-9.
47. Gudas R, Gudaite A, Pocius A et al. Ten-year follow-up of a prospective, randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint of athletes. *Am J Sports Med*. 2012;40(11):2499-508.
48. Zhang Z, Zhong X, Ji H et al. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of chondral defects of the knees in Chinese patients. *Drug Des Devel Ther*. 5 déc 2014;8:2439-48.
49. Haute Autorité de Santé. Avis Autogreffe de chondrocytes au niveau des condyles fémoraux. Disponible sur: [http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-02/avis\\_autogreffe\\_chondrocytes.pdf](http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-02/avis_autogreffe_chondrocytes.pdf) . consulté le 24/03/2021 .
50. Cheng A, Kapacee Z, Peng J et al. Cartilage Repair Using Human Embryonic Stem CellDerived Chondroprogenitors. *Stem Cells Transl Med*. nov 2014;3(11):1287-94.
51. Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y et al. Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model. *Biomed Res Tokyo Jpn*. 2013;34(6):281-8.
52. Saito T, Yano F, Mori D et al. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res Tokyo Jpn*.2015;36(3):179-86.
53. Margossian T. Caractérisation des Cellules Souches Mésenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton. Thèse de doctorat d'université.

Univesité de Lorraine, 2013. Disponible sur: <http://docnum.univlorraine.fr/public/MARGOSSIAN.pdf> . consulté le 24/03/2021 .

54. Gil-Ortega M, Garidou L, Barreau C et al. Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells Day Ohio*. Juill 2013;31(7):1309-20.

55. Nakagami H, Morishita R, Maeda K et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*. avr 2006;13(2):77-81.

56. Jingwei Y. Optimisation de modèles de culture 3D pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses application à la chondrogénèse. Thèse de doctorat d'université. Nancy. Université Henri Poincare. Disponible sur: [http://docnum.univlorraine.fr/public/SCD\\_T\\_2006\\_0251\\_YANG.pdf](http://docnum.univlorraine.fr/public/SCD_T_2006_0251_YANG.pdf)

57. Kuroda K, Kabata T, Hayashi K et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord*. 3 sept 2015 ;16. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559871/>. consulté le 24/03/2021.

58. Glimcher MJ, Kenzora JE : The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications. III. Discussion of the etiology and genesis of the pathological sequelae ; commments on treatment. *Clin Orthop* 1979 ; 140 : 273-312

59. Johnson JT, Crothers O : Revascularization of the femoral head. A clinical and experimental study. *Clin Orthop* 1976 ; 114 : 364-73

60. Hauzeur JP, Pasteels JL, Orloff S : Bilateral non-traumatic aseptic osteonecrosis in the femoral head. An experimental study of incidence. *J Bone Joint Surg Am* 1987 ; 69 : 1221-5

61. Hernigou P, Beaujean F : Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. *J Bone Joint Surg Am* 1997 ; 79 : 1047-53

62. Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC : Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br* 1999 ; 81 : 349-55

63. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC : Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 2907-12
64. Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Egrise D : Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head *J Rheumatol* 2003 ; 30 : 348-51
65. Neumayr LD, Aguilar C, Earles AN et al. : Physical therapy alone compared with core decompression and physical therapy for femoral head osteonecrosis in sickle cell disease. Results of a multicenter study at a mean of three years after treatment. *J Bone Joint Surg Am* 2006 ; 88 : 2573-82
66. Stulberg BN, Davis AW, Bauer TW, Levine M, Easley K : Osteonecrosis of the femoral head. A prospective randomized treatment protocol. *Clin Orthop Relat Res* 1991 ; 268 : 140-51
67. Hernigou P, Bernaudin F, Reinert P, Kuentz M, Vernant JP : Bonemarrow transplantation in sickle-cell disease. Effect on osteonecrosis : a case report with a four-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 1997 ; 79 : 1726-30
68. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M : Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 2004 ; 86 : 1153-60
69. ARCO (Association Research Circulation Osseous) : Committee on Terminology and Classification. *ARCO News*. 1992 ; 4 : 41-6
70. Hauzeur JP, Orloff S, Taverne-Verbanck J, Pasteels JL : Diagnosis of aseptic osteonecrosis of the femoral head by percutaneous transtrochanterian needle biopsy. *Clin Rheumatol* 1986 ; 5 : 346-58
71. Frank AJ, Moll JM, Hort JF : A comparison of three ways of measuring pain. *Rheumatol Rehabil* 1982 ; 21 : 211-7
72. Lequesne MG, Mery C, Samson M, Gerard P : Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests. *Scand J Rheumatol Suppl* 1987 ; 65 : 85-9

73. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW : Validation study of WOMAC : a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988 ; 15 : 1833-40
74. Hernigou P, Beaujean F : Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2005 ; 405 : 14-23
75. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002 ; 360 : 427-35
76. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. : Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002 ; 106 : 1913-8
77. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP : Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation.
78. Simone B. Stem cell research: the ethical debate. Atelier de formation Inserm. 16-17 Novembre 2006 ; n°171
79. Pierre Louis Fagniez ; Cellules souches et choix éthique. Rapport au 1er ministre, juillet 2006
80. Hervé C. ; Chroniques bioéthiques (11) : Cloningate? La publication scientifique et le clonage thérapeutique face à la mystification Hwang. *Médecine/Sciences*. 2006 ; 22 : 218-222
81. Pellerin D. Cellules souches et thérapie cellulaire contribution au débat éthique. *C. R. Biologies*. 2002; 325: 1059-1063
82. B. Ramdani; Actions à venir Ministère de la Santé MAROC; 5ème colloque France Maghreb, Nice 23-24 Mars 2012
83. Dr Loubna Mazini; Cellules souches au Maroc; *Doctine* n°54; Avril 2013
84. Avis du GEE des sciences et des nouvelles technologies « Aspects Législatif de la recherche sur les cellules souches humaines et leur utilisation

». <http://ec.europa.eu/european-group-ethics/index-fr.html>. 14 Nov 2000 ; consulté le 24/03/2021 .

85. Guibert TERLINDEN ; « Christianisme, Islam et Judaïsme : greffer du symbole en transplantation » ; In Ethica Clinica, n°61, 2011, p.43-52.

86. International Islamic Fiqh Academy; <http://www.fiqhacademy.org.sa> . consulté le 24/03/2021 .

87. Revue : actualité des religions : Avril 2001 ; n°26 ; Novembre 2002 ; n°43

88. [www.genethique.org](http://www.genethique.org) : consulté le 24/03/2021 .

89. Matthieu Rembarz ; Thérapie Cellulaire, Dossier thématique de la fondation de l'Avenir, Juin 2007 p 1-8

## *Serment d'Hippocrate*

*Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.*

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

# قسم ابقر اط

بسم الله الرحمان الرحيم

## أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- ◀ بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
- ◀ وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
- ◀ وأن أمارس مهنتي بوازع من ضميري وشرفي جاعلتنا صحة مريضه هدي في الأول.
- ◀ وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي.
- ◀ وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب.
- ◀ وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي.
- ◀ وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي.
- ◀ وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها.
- ◀ وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد.
- ◀ بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسمتا بالله.

والله على ما أقول شهيد.



المملكة المغربية  
جامعة محمد الخامس بالرباط  
كلية الطب والصيدلة  
الرباط



أطروحة رقم: 153

سنة: 2021

التكنولوجيا الحيوية، مساهمة الخلايا الجذعية  
في جراحة العظام  
أطروحة

قدمت ونوقشت يوم: .....

من طرف

السيد: إنهاد زكرياء

المزاد في 27/10/1995 بطنجة

لنيل شهادة

دكتور في الطب

الكلمات الأساسية: الخلايا الجذعية -العلاج بالخلايا -جراحة العظام

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيسة

السيدة نعيمة الحافظي

أستاذة في طب الأطفال

مشرف

السيد عز الدين إبراهيمي

أستاذ في علم البيوتكنولوجيا

عضو

السيدة منى أحمد

أستاذة في علم البيوتكنولوجيا