

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies (SST)

Equipe E.A.3855

Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches

THÈSE présentée par :

Thomas CORDONNIER

soutenue le : 29 octobre 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Associations cellules souches mésenchymateuses et céramiques pour l'ingénierie tissulaire osseuse

**[Intérêt du milieu cellulaire et de l'environnement
tridimensionnel sur la différenciation ostéoblastique]**

THÈSE dirigée par :

M. ROSSET Philippe

Professeur des Universités (Tours, France)

RAPPORTEURS :

M. DOMINICI Massimo

Professeur adjoint de l'université de Modène (Italie)

M. PETITE Hervé

Directeur de recherche INSERM (Paris, France)

Jury :

M. DESCHASEAUX Frédéric

Chargé de recherche EFS (Tours, France)

M. LAYROLLE Pierre

Directeur de recherche INSERM (Nantes, France)

M. SENSEBE Luc

Directeur médical et scientifique EFS (Tours, France)

M. SOHIER Jérôme

Docteur des Universités (Nantes, France)

Jury de Thèse

Cette thèse a été réalisée sous la direction du professeur Philippe Rosset de l'université François-Rabelais de Tours et co-encadrée par le docteur Jérôme Sohier de l'université de Nantes.

Jury :

M. Philippe ROSSET
M. Jérôme SOHIER
M. Massimo DOMINICI
M. Hervé PETITE
M. Frédéric DESCHASEAUX
M. Pierre LAYROLLE
M. Luc SENSEBE

Avant-propos

A mes parents et mon frère,

Pour leur amour et leur soutien de tous les instants.

A Julie, pour son amour, son soutien et la motivation qu'elle m'insuffle.

A mes proches, famille et amis, pour leur affection et pour m'avoir permis d'en arriver là aujourd'hui.

Remerciements

Je tiens à remercier les directeurs des laboratoires avec qui j'ai pu collaborer et qui ont accepté de m'accueillir au sein de leur groupe :

Je voudrais remercier le Prof. Jorge Domenech pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire du « microenvironnement de l'hématopoïèse et cellules souches » dans son équipe EA3855 de l'université François-Rabelais de Tours. Merci de m'avoir accepté malgré mes vas et vient incessants durant ces trois années de collaboration.

Je remercie le Prof. Pierre Weiss pour m'avoir accueilli, durant les deux premières années de ma thèse au sein du laboratoire « ingénierie ostéo-articulaire et dentaire » de l'université de Nantes. Merci de m'avoir permis d'intégrer l'unité Inserm U791 et pour y avoir passé deux années très agréables et enrichissantes.

Je remercie également le Prof. Dominique Heymann pour son accueil lors cette dernière année de thèse au sein du laboratoire de « physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs primitives osseuses » de l'université de Nantes. Merci de m'avoir accepté pour une période courte mais agréable dans ce groupe qu'est l'unité Inserm U957.

Je remercie très chaleureusement les personnes qui m'ont encadré durant ces 3 années :

Je remercie mon directeur, le Prof. Philippe Rosset, qui a bien voulu me diriger durant ces 3 années et qui a fait son maximum pour être disponible, même très tard, malgré ses obligations cliniques. Merci de m'avoir fait confiance, merci pour tes conseils, ton regard de clinicien sur mes travaux et merci pour ta gentillesse et ton calme.

Je remercie fortement mon co-encadrant, le Dr. Jérôme Sohier, qui m'a offert énormément de son temps pour me guider et m'enseigner les rudiments de l'ingénierie tissulaire pour que je puisse être autonome. Merci à toi d'avoir été présent, même à distance. Merci pour tes précieux conseils et ton soutien qui ont permis l'aboutissement de cette thèse. Merci à toi et à ta joie de vivre.

Je tiens à remercier le Prof. Pierre Layrolle qui a su me faire confiance en me permettant de réaliser cette thèse dans la cadre du projet ANR ATOS. Merci pour la confiance que tu m'as

accordée, pour les conseils et le soutien que tu as pu m'offrir. Je te remercie pour m'avoir montré ce qu'était la recherche.

Je voudrais remercier également le Dr. Luc Sensebé qui m'a épaulé lors de mes séjours à Tours et qui m'a permis de travailler en collaboration avec son équipe de recherche de l'EFS Centre-Atlantique. Merci pour tes conseils, notamment lors de mes présentations, qui m'ont permis d'avancer. Merci pour ton soutien et ton accessibilité.

Je remercie grandement le Dr. Frédéric Deschaseaux pour sa confiance et son aide lors des nombreuses collaborations que nous avons eues à Tours et à Nantes. Merci de m'avoir écouté et conseillé lorsque j'étais à Tours et merci pour ton humour intarissable.

Je tiens vivement à remercier M. Hervé Petite et M. Massimo Dominici pour me faire le grand honneur d'évaluer ce travail.

Merci à M. Hervé Petite d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Pour la rigueur scientifique de ses travaux qui ont contribué à la réalisation de ce manuscrit.

Merci à M. Massimo Dominici d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Pour la rigueur scientifique de ses travaux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Liste des Publications

Cordonnier T., Layrolle P., Gaillard J., Langonné A., Sensebé L., Rosset P., Sohier J. "3D environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation for Bone Tissue Engineering". *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Mar;21(3):981-7. Epub 2009 Oct 25.

Cordonnier T., Langonné A., Sohier J., Layrolle P., Rosset P., Sensebé L., Deschaseaux F. "Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum" *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Sep 8.

Cordonnier T., Sohier J., Rosset Ph., Layrolle P. "Bone Tissue Engineering using Biomimetic Materials and Approaches – State of the Art and Future Trends. Submitted to Advanced Biomaterials on September, 2010.

Cordonnier T., Sohier J., Coipeau P., Marteau E., Source S., Langonné A., Gaillard J., Sensebé L., Layrolle P., Rosset P. "Healing of Long-Bone Defects in Metatarsus of Sheep using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells" Submitted to *Journal of Orthopaedic Research* on September, 2010.

Cordonnier T., Layrolle P., Langonné A., Corre P., Renaud A., Sensebé L., Rosset P., Sohier J. "Interest of Biomimetic Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Engineering" Submitted to *Tissue Engineering* on August, 2010.

Meetings, Abstracts and Presentations

2010:

Cordonnier T., Layrolle P., Langonné A., Sensebé L., Rosset P., Sohier J. "Cell-synthesized 3D Environment is a Potent Osteoblastic Inducer" **Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (Galway), June 2010. Oral presentation.** Price for "50 Best Abstracts Awards" of TERMIS-EU 2010 Meeting in Galway

Cordonnier T., Deschaseaux F., Sensebé L., Langonné A., Layrolle P., Rosset P., Sohier J. "Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Benefits from Low Serum Level and BMP4 Supplementation" **International Bone and Mineral Society (Davos), March 2010. Poster presentation.**

2009:

Cordonnier T., Layrolle P., Gaillard J., Langonné A., Sensebé L., Rosset P., Sohier J.
“Influence of a 3D environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation”
European Society for Biomaterials (Lausanne), September 2009. Oral presentation.

Cordonnier T., Layrolle P., Gaillard J., Langonné A., Sensebé L., Rosset P., Sohier J.
“Influence of a 3D environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation” **PhD student forum (Tours), June 2009. Oral presentation.**

Lopez-Cazaux S., **Cordonnier T.**, Julien M., Masson M., Weiss P., Guicheux J., Alliot-Licht B., “Growth Hormone Stimulates Proliferation and Differentiation of M2H4 Odontoblasts and Human Pulp Cells”. **Les cahiers de l'ADF - N°22-23 1er trimestre 2007.**

Résumé

Les affections ostéo-articulaires concernent des millions de personnes. L'ingénierie tissulaire osseuse, associant cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) et matériaux synthétiques, pourrait répondre aux besoins cliniques. Pour cela, les différentes composantes de cette approche et leur association doivent être mieux étudiées pour la rendre utile cliniquement. Durant cette thèse, une première étude animale proche du cas clinique nous a permis de définir les points à améliorer pour le traitement des pertes osseuses. Nous avons ainsi pu développer un milieu spécifique induisant une différenciation rapide et terminale des CSM en ostéoblastes. Par la suite, l'utilisation de particules de céramiques comme support cellulaire nous a permis d'obtenir des hybrides riches en matrice extracellulaire. Cet environnement 3D biomimétique permet l'engagement spontané des CSM vers un phénotype ostéoblastique et l'obtention d'une quantité osseuse importante *in vivo*. L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance de l'environnement et du stade de différenciation cellulaire pour la formation osseuse par ingénierie tissulaire osseuse.

Mots clefs : cellules souches mésenchymateuses humaines, céramiques phosphocalciques, différenciation ostéoblastique, environnement tridimensionnel, biomimétisme, régénération osseuse, ingénierie tissulaire osseuse.

Abstract

Osteo-articular disorders affect millions of people over the world. Bone tissue engineering, an approach combining human mesenchymal stem cells (MSC) and synthetic materials, could potentially fulfill clinical needs. However, the different components of this approach and their association should be investigated further to make it clinically useful. In this thesis, an initial animal study close to clinical situation allowed us to identify areas that need improvement for regenerating bone defect. We were then able to develop a specific medium which induces a rapid and terminal osteoblastic differentiation of MSC. Subsequently, the use of ceramic particles as cell support has allowed us to obtain hybrid mainly composed of extracellular matrix. This biomimetic 3D environment allows spontaneous osteoblastic commitment of MSC and induces a large bone quantity *in vivo*. Overall, these results highlight the importance of the environment and the cell differentiation state for bone formation using bone tissue engineering.

Keywords: mesenchymal stem cells, phosphocalcic ceramics, osteoblastic differentiation, three-dimensional environment, biomimetism, bone regeneration, bone tissue environment.

Liste des abréviations

3D	Tridimensionnel
a.a.	acide ascorbique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN copie
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCP	Phosphate de calcium biphasé - Biphasic calcium phosphate
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumin
BSEM	Back-scattered electron microscopy
BSP	Bone sialoprotein
CaSR	Calcium sensing receptor
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
CFU	Colony forming unit
CHRU	Centre hospitalier régional universitaire
Coll	Collagène de type I – Type 1 collagen
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
Ct	Cycle threshold
DAB+	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DBM	Matrice osseuse déminéralisée – Demineralized bone matrix
Dex	Dexaméthasone
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMP-1	Dentin matrix protein-1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphate
EBIC	Electron beam induced current
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EFS	Etablissement français du sang
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HA	Hydroxyapatite
HRP	Horseradish peroxidase
IGF	Insulin growth factor
ITO	Ingénierie tissulaire osseuse

ITS	Insuline transferrine et sodium sélénite
M-CSF	Macrophage monocyte colony-stimulating factor
MEB	Microscope électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MEPE	Matrix metalloproteinase de type 2
MMLV-T	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2
MO	Moelle osseuse
OCN	Ostéocalcine
OMS	Organisation mondiale de la santé
OPN	Ostéopontine
OSN	Ostéonectine
Osx	Ostérix
P/S	Pénicilline/streptomycine
PBO	Peroxyde de benzoyle
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PMMA	Polyméthylméthacrylate
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SVF	Sérum de veau fœtal
TGF-β	Transforming growth factor- <i>beta</i>
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
UI	Unité internationale
U.V.	Ultra-violet
α-MEM	<i>Alpha</i> -modified eagle's medium
β-gly	<i>Beta</i> -glycérophosphate
β-TCP	<i>Beta</i> -tricalcium phosphate

Liste des figures

Figure 1 : Composition et structure d'un os long.

Figure 2 : Organisation hiérarchique d'un faisceau de fibres de collagène

Figure 3 : Processus de l'ossification endochondrale et la plaque de croissance.

Figure 4 : Remodelage du tissu osseux.

Figure 5 : Processus de réparation osseuse spontanée après fracture.

Figure 6 : Principe général de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Figure 7 : Caractère multipotent des cellules souches mésenchymateuses adultes de la moelle osseuse.

Figure 8 : Les céramiques phosphocalciques, principale source de substituts osseux synthétiques.

Figure 9 : Les différentes méthodes d'association des cellules avec le matériau envisageables.

Figure 10 : Images MEB des différents matériaux utilisés lors de cette thèse.

Figure 11 : Représentation schématique du principe général de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage.

Figure 12 : Mise en évidence par coloration histologique des différentes voies de différenciation de CSM cultivées *in vitro*.

Figure 13 : Culture de CSM sur des céramiques de BCP de granulométrie différente.

Figure 14 : Principe de la réaction de PCR en temps réel basée sur la technologie SybrGreen.

Figure 15 : Principe de fonctionnement de la technique d'immunohistochimie.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.

Tableau 2 : Récapitulatif des séquences d'amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR en temps réel.

Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés lors des expériences de western blot.

Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	- 1 -
CHAPITRE 1 : MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 7 -
LE TISSU OSSEUX.....	- 9 -
<i>Les différents types de tissu osseux.....</i>	- 10 -
<i>La matrice osseuse.....</i>	- 13 -
<i>Les différents types cellulaires du tissu osseux.....</i>	- 14 -
LA FORMATION ET LA CROISSANCE OSSEUSE.....	- 18 -
<i>L'ossification endochondrale</i>	- 19 -
<i>L'ossification intra-membranaire</i>	- 20 -
LE REMODELAGE OSSEUX ET LA CONSOLIDATION DES FRACTURES	- 21 -
<i>Le cycle du remodelage osseux.....</i>	- 21 -
<i>Réparation spontanée</i>	- 23 -
LES PERTES DE SUBSTANCES OSSEUSES	- 24 -
<i>Les traumatismes</i>	- 24 -
<i>Les pathologies osseuses non traumatiques.....</i>	- 25 -
LES TRAITEMENTS ACTUELS DE PERTES DE SUBSTANCES OSSEUSES	- 27 -
<i>Les greffes osseuses biologiques.....</i>	- 27 -
<i>Les substituts osseux synthétiques</i>	- 31 -
L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE.....	- 32 -
<i>Les cellules de l'ingénierie tissulaire</i>	- 33 -
<i>Les substituts osseux synthétiques</i>	- 39 -
<i>Les BCP comme support de cellules</i>	- 44 -
<i>Les limites actuelles de l'ingénierie tissulaire osseuse.....</i>	- 47 -
<i>Les nouvelles approches de l'ingénierie tissulaire osseuse</i>	- 49 -
REVUE : BIOMIMETIC MATERIALS AND APPROACHES FOR BONE TISSUE ENGINEERING – STATE OF THE ART AND FUTURE TRENDS.....	- 51 -
CHAPITRE 2 : TECHNIQUES ET MATERIELS UTILISES LORS DE CETTE THESE	93 -
LES BIOMATERIAUX	- 95 -
<i>Les céramiques de phosphate de calcium biphasées</i>	- 95 -
<i>Les billes de verres</i>	- 96 -
<i>Caractérisation des biomatériaux.....</i>	- 97 -
LES CELLULES	- 99 -
<i>Les cellules souches mésenchymateuses</i>	- 99 -
<i>Caractérisation des cellules.....</i>	- 101 -
<i>Multipotence des cellules souches mésenchymateuses</i>	- 102 -
CULTURE DES CSM SUR LES BIOMATERIAUX	- 106 -
<i>L'ensemencement des CSM sur les céramiques phosphocalciques biphasées.....</i>	- 106 -
<i>Les billes de verres</i>	- 108 -
<i>Etude de la prolifération.....</i>	- 108 -
<i>Effet des différents modes de culture sur la différenciation des CSM.....</i>	- 109 -
<i>Etude <i>in vivo</i></i>	- 118 -
OBJECTIFS DE LA THESE	- 123 -
CHAPITRE 3 : ASSOCIATION CSM/BCP POUR LA REGENERATION OSSEUSE AU NIVEAU D'UN DEFAUT CRITIQUE	- 125 -
INTRODUCTION A LA PROBLEMATIQUE	- 127 -
<i>Article 1 : Healing of Long-Bone Defects in Metatarsus of Sheep using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells</i>	- 131 -
DISCUSSION.....	- 161 -

CHAPITRE 4 : AMELIORATION DU MILIEU DE CULTURE DES CSM : EFFET <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	- 165 -
INTRODUCTION A LA PROBLEMATIQUE	- 167 -
<i>Article 2 : Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum.</i>	- 169 -
DISCUSSION.....	- 185 -
CHAPITRE 5 : IMPORTANCE DE LA CONFORMATION 3D DES CSM POUR LEUR DIFFERENCIATION <i>IN VITRO</i> ET LA FORMATION OSSEUSE <i>IN VIVO</i>.	- 189 -
INTRODUCTION A LA PROBLEMATIQUE	- 191 -
<i>Article 3 : 3D Environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation for Bone tissue Engineering.</i>	- 193 -
<i>Article 4 : Interest of a biomimetic Approach Combining Ceramic and Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering</i>	- 203 -
DISCUSSION.....	- 251 -
DISCUSSION GENERALE	- 257 -
CONCLUSION GENERALE	- 263 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 267 -

Introduction générale

Au cours du siècle dernier, les progrès de la médecine et des sciences modernes ont permis d'augmenter régulièrement l'espérance de vie de l'être humain. Néanmoins, aussi bénéfique que soit cet accroissement de la longévité, il a entraîné l'émergence de pathologies diverses telles que les affections ostéo-articulaires. L'évolution des maladies et du nombre de personnes atteintes par ce type d'affections en fait une des préoccupations majeures de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Selon cette organisation, plusieurs millions de personnes dans le monde souffrent de problèmes ostéo-articulaires. Afin de traiter un certain nombre de ces affections, notamment au niveau osseux, des avancées cliniques telles que la régénération ou la substitution osseuse ont pu être développées. Par exemple, la reconstruction osseuse à partir d'os autologue est utilisée dans 80 % des indications cliniques nécessitant un apport osseux car elle permet d'aider à la consolidation et de combler des pertes osseuses avec une bonne efficacité. Malgré tout, cette technique requiert une intervention au niveau d'un second site opératoire et ne procure qu'une quantité limitée de greffon osseux. Pour pallier ces lacunes, de nouvelles approches sont apparues au cours des dernières décennies dans le domaine des biomatériaux et de l'ingénierie tissulaire osseuse. Ces approches ont pour but de restaurer le tissu osseux lésé afin de restituer à l'organe sa fonctionnalité originelle. Pour ce faire, des supports synthétiques destinés à mimer au mieux les caractéristiques du tissu osseux naturel et guider sa régénération ont été développés et étudiés. Ces substituts osseux synthétiques ont permis de pallier certains des inconvénients des greffes osseuses, notamment la mise à disposition d'une grande quantité de matériel implantable sans intervention chirurgicale supplémentaire. Parmi ces matériaux synthétiques, les céramiques phosphocalciques biphasées (BCP) représentent un biomatériau de choix car aisément produites en grande quantité avec une composition très proche de la phase minérale naturelle de l'os. De plus, ces céramiques offrent des propriétés biologiques attrayantes telles que la biocompatibilité, la bioactivité, l'ostéoconduction et l'ostéoinduction, ce qui en fait des substituts osseux de premier ordre. Cependant, ces matériaux ne sont pas satisfaisants pour certaines applications cliniques telles que le comblement de défauts osseux de grandes tailles ou de défauts complexes et ils ne permettent pas une régénération rapide et efficace. Pour résoudre ces problématiques importantes, l'ingénierie tissulaire osseuse propose d'associer les substituts synthétiques avec des cellules osseuses ou ostéoprogénitrices telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules représentent la phase organique des hybrides cellules/matiériaux conçus pour reproduire et substituer les greffes osseuses biologiques. Les CSM possèdent une grande plasticité et peuvent ainsi se différencier vers des lignées

cellulaires variées comme les neurones, les myocytes, les adipocytes, les chondroblastes et, de manière plus intéressante pour cette thèse, les ostéoblastes.

Cette approche combinatoire, cellules et matériaux, a pu montrer son potentiel dans différentes études *in vitro* ou après implantation chez différentes espèces animales. Néanmoins, son efficacité clinique reste encore à démontrer.

C'est pourquoi l'objectif de cette thèse a été de s'intéresser à l'étude et la compréhension de différents modes d'association de cellules mésenchymateuses avec des substituts osseux céramiques. Tout d'abord, en évaluant l'efficacité de cette association dans un modèle animal proche de la situation clinique. Puis, en étudiant diverses approches pour comprendre les mécanismes induisant la différenciation cellulaire et ainsi pouvoir l'améliorer. Plus particulièrement, l'obtention d'un phénotype ostéoblastique mature par l'utilisation de facteurs solubles ainsi que l'effet de la conformation tridimensionnelle des cellules et de leur microenvironnement ont été étudiés dans la perspective d'obtenir un substitut osseux mimant étroitement les phénomènes de régénération osseuse et permettant une meilleure formation osseuse.

De manière plus concrète, dans un premier chapitre bibliographique de cette thèse, scindé en deux parties, nous analysons la structure du tissu osseux et ses caractéristiques pour présenter les bases nécessaires aux différentes approches de ce travail. Nous nous penchons également sur les méthodes actuelles qui s'emploient à réparer le tissu osseux et les méthodes en cours de développement visant à les substituer ou les améliorer. Par la suite dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO), nous nous focalisons plus particulièrement sur les matériaux synthétiques utilisés pour substituer la matrice minérale osseuse puis sur les cellules et les différentes méthodes possibles pour associer les cellules aux matériaux. La seconde partie de ce chapitre présente une vision plus large des matériaux synthétiques et introduit certains des concepts les plus innovants de l'ingénierie tissulaire osseuse. Les points évoqués dans ce premier chapitre ont été rassemblés dans une revue intitulée «Bone Tissue Engineering using Biomimetic Materials and Approaches – State of the Art and Future Trends » et soumise à publication au journal « Advanced biomaterials ».

Dans le deuxième chapitre, les objectifs de cette thèse sont définis, et les différents matériaux et méthodes utilisées pour la réalisation des expériences décrites dans cette thèse sont présentés.

Le troisième chapitre relate les résultats concernant la réparation de défauts osseux de taille critique chez la brebis à l'aide de granules de céramique phosphocalciques. Ces substituts synthétiques sont couramment utilisés en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale pour le comblement de petits volumes. Pour les défauts osseux importants, ces matériaux sont plus fréquemment utilisés en association avec de l'os autologue. Durant ces travaux, les effets des granules de BCP seules ou associées de façon ex tempore avec des CSM sont comparés dans le cadre de la reconstruction de tissu osseux en site orthotopique. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'une approche traditionnelle de l'ingénierie tissulaire avec notre propre biomatériau sur la régénération osseuse et d'étudier l'effet de l'ajout de cellules autologues sur la formation osseuse. Les résultats de ce chapitre sont présentés dans l'article intitulé « Healing of Long-Bone Defects in Metatarsus of Sheep using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells » soumis à « Journal of Orthopaedic Research ».

Dans le quatrième chapitre, nous étudions l'impact de différents milieux de culture sur la différenciation des CSM et sur la formation osseuse dans le but d'améliorer les techniques actuelles d'ingénierie tissulaire osseuse. Dans un premier temps, des travaux *in vitro* de différenciation des CSM ont été réalisés afin de déterminer les meilleures conditions de différenciation propice à l'induction vers la lignée ostéoblastique. Ceci a permis de définir un milieu de culture novateur permettant l'obtention rapide d'ostéoblastes matures. Dans un second temps, la fonctionnalité de ces ostéoblastes dérivés des CSM et cultivés sur des céramiques phosphocalciques a été évaluée *in vivo*. L'ensemble de ces travaux est décrit dans l'article intitulé « Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum » publié par le journal « Tissue Engineering Part C Methods ».

Le cinquième chapitre poursuit cette démarche d'amélioration des conditions de culture des CSM en s'intéressant non plus au milieu de culture mais à l'environnement physique des cellules. L'importance à la fois des matériaux et du milieu de culture des CSM est indéniable pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Pour cela, en vue de nous rapprocher plus finement de l'environnement osseux, nous avons développé de nouvelles méthodes de culture des cellules sur des particules de BCP. Ces particules de BCP ovoïdes et de petite taille permettent aux cellules d'adopter une conformation tridimensionnelle (3D) et de synthétiser de la matrice extracellulaire dans une structure plus proche de celle survenant lors de la réparation osseuse. Dans une première étude, nous développons la mise au point de cette culture 3D et ses effets *in vitro* sur la différenciation ostéoblastique des CSM. La deuxième

étude se focalise plus spécifiquement sur la compréhension des phénomènes engendrés par cette culture 3D et le potentiel de ces hybrides cellules/particules de BCP pour la formation osseuse *in vivo* en comparaison à d'autres matériaux synthétiques. L'ensemble de ces résultats est regroupé dans deux articles, le premier intitulé « 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering » est publié dans « Journal of Materials Science: Materials in Medicine » et le second intitulé « Interest of a Biomimetic Approach Combining Ceramic and Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering » est soumis au journal « *Tissue Engineering* ».

Chapitre 1 : Mise au point bibliographique

Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé, comme tout tissu conjonctif, de cellules enchaînées dans une matrice extracellulaire très abondante. Contrairement aux autres tissus conjonctifs, le tissu osseux possède une matrice extracellulaire minéralisée. C'est cette minéralisation qui confère à la matrice une rigidité permettant au squelette d'assurer sa fonction biomécanique (soutien et protection des organes). Mais cette fonction purement mécanique n'est pas sa seule charge, l'os possède également une fonction métabolique car il est le principal réservoir de l'organisme pour le calcium (99 %), le phosphore (75 %), le sodium (90 %) et le magnésium (50 %) et il en régule l'homéostasie [1]. Le reste du calcium est sous forme circulante ou assimilé par les cellules (0,5 %). Quant au phosphore, principal support de l'énergie (ATP), après l'os c'est au sein des cellules qu'il est le plus abondant (24 %). Cette homéostasie est rendue possible par la capacité de ce tissu à être en perpétuel remaniement. En effet, de l'embryon jusqu'à la fin de la vie, l'os est en permanence résorbé par les ostéoclastes et produit par les ostéoblastes [2]. Ce métabolisme permet au tissu osseux de libérer ou stocker ces sels minéraux [3] indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. L'os, enfin, joue un rôle hématopoïétique puisqu'il contient la moelle osseuse. La moelle osseuse grâce à la moelle rouge située dans la partie spongieuse de l'os, produit les différents types de cellules sanguines que sont les érythrocytes, les thrombocytes et les leucocytes dérivés des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Une CSH qui se divise va donner naissance à une nouvelle CSH afin de maintenir le pool de cellules ainsi qu'à une cellule fille progénitrice capable de se différencier dans les trois types de cellules sanguines. La moelle osseuse contient également les cellules souches mésenchymateuses (CSM) capables de produire différentes lignées cellulaires (ténocytes, myoblastes, adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes). Ces cellules sont fondamentales pour la formation, la cicatrisation et le remodelage du tissu osseux. Le dernier rôle du tissu osseux, récemment mis en avant, est l'homéostasie énergétique. En effet, le tissu osseux qui ne dépense que très peu d'énergie semblerait jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique par son interaction avec l'insuline [4]. Très récemment il a été montré que l'insuline via des récepteurs à l'insuline présents à la surface des ostéoblastes stimulait leur différenciation ainsi que la production d'ostéocalcine qui en retour régulait la sensibilité à l'insuline et sa sécrétion pancréatique [5]. Le tissu osseux permet d'assurer la croissance du corps et des organes, il a l'incroyable capacité de consolider spontanément après fracture avec une restitution *ad integrum* de sa structure, ce qui n'est le

cas pour aucun autre tissu mou conjonctif, comme par exemple les ligaments, dont la cicatrisation ne peut restituer l'ensemble des qualités mécaniques originelles. Néanmoins, lors de pertes de substances, le tissu osseux n'est pas apte à se régénérer spontanément, il est donc nécessaire d'intervenir afin de combler ces pertes de substance et ainsi préserver l'intégrité du tissu osseux qui est un élément indispensable aux fonctions motrices et métaboliques du corps humain.

Les différents types de tissu osseux

Le squelette humain est composé d'environ 270 os à la naissance et en comprend en moyenne 206 à l'âge adulte après fusion de certains d'entre eux [6]. On en distingue trois types principaux : les os longs (fémurs, radius, cubitus, etc.), les os courts (phalanges, etc.) et les os plats (crâne, scapula, os coxal etc.). Le tissu osseux peut également être classé selon la disposition de ses fibres de collagène. Le premier tissu osseux à se former est le tissu fibreux (ou primaire) correspondant à l'élaboration rapide et désorganisée des fibres de collagène. Ce tissu présent chez l'embryon et le jeune enfant est voué à être rapidement remplacé au cours du développement par le tissu osseux lamellaire (ou secondaire). Néanmoins, on peut retrouver le tissu osseux primaire chez l'adulte au cours de la réparation osseuse après une fracture ou dans certaines pathologies osseuses (tumeurs, dysplasie). Ce tissu fibreux est remplacé par le tissu lamellaire composé de fibres de collagènes qui servent de support aux sels de calcium aboutissant à la formation de lamelles rigides. En fonction de l'agencement de ces lamelles, on peut distinguer : l'os cortical (ou compact) qui représente 80 % de la masse osseuse, l'os trabéculaire (ou spongieux) représentant 10 % et l'os périostique (ou périoste) [7].

L'os cortical

L'os cortical, relativement épais, est l'enveloppe extérieure de l'os qui protège la partie interne principalement constituée d'os trabéculaire et de moelle osseuse (figure 1). L'os cortical est constitué de fines fibres parallèles de collagène de type I qui fixent les sels de calcium aboutissant à la formation d'une architecture lamellaire. Les fibres de collagène ont une orientation différente d'une lamelle à une autre ce qui renforce la résistance mécanique de l'os cortical. Ces lamelles (10 à 13,5 μm) sont très bien organisées, parallèles et cylindriques, elles cloisonnent les canaux de Havers contenant les vaisseaux sanguins et les nerfs. Cet ensemble de lamelles, dont le nombre varie entre 8 et 15, entourant un canal Harversien

constitue l'élément de base de l'os cortical et est appelé le système de Havers (ou ostéon ou ostéone). C'est à l'intérieur de ces lamelles minéralisées que se trouvent emprisonnés les ostéocytes. Les vaisseaux sanguins empruntant les canaux Haversiens sont reliés entre eux par des vaisseaux transversaux (canaux de Volkmann) qui forment un réseau vasculaire très ramifié permettant la survie des ostéocytes et des cellules environnantes. Ces canaux représentent la seule porosité de l'os cortical qui est très faible (5 à 10 %) [8-10]. L'os cortical, très structuré et très dense, confère à l'os sa rigidité et sa résistance face aux contraintes mécaniques qui lui sont appliquées.

L'os trabéculaire

L'os trabéculaire est un tissu ayant une architecture spongieuse constituée de fibres de collagène plus ou moins orientées de la même façon et formant des lamelles osseuses (généralement peu nombreuses) associées en travées (figure 1). Comme décrit précédemment pour l'os cortical, ce sont ces lamelles qui contiennent les ostéocytes. L'os trabéculaire forme un réseau tridimensionnel que l'on retrouve principalement au niveau des os courts, des os plats (diploé) et au niveau de l'épiphyse des os longs. Cet os est formé par de nombreuses trabécules séparant de volumineuses cavités irrégulières très largement interconnectées. C'est dans ces cavités que se trouvent les vaisseaux sanguins et très souvent la moelle osseuse rouge hématogène (formation des cellules sanguines). La présence de cette moelle rouge rend l'os trabéculaire métaboliquement plus actif et fait qu'il est plus souvent remodelé que l'os cortical. Bien que l'os trabéculaire soit de même composition que l'os cortical, celui-ci est beaucoup plus poreux. Les nombreuses cavités qui forment cet os lui donnent son nom d'os trabéculaire (ou spongieux). Cette porosité représente de 50 à 90 % du volume et fait de lui un os beaucoup moins dense et donc beaucoup plus fragile que l'os cortical [8, 9].

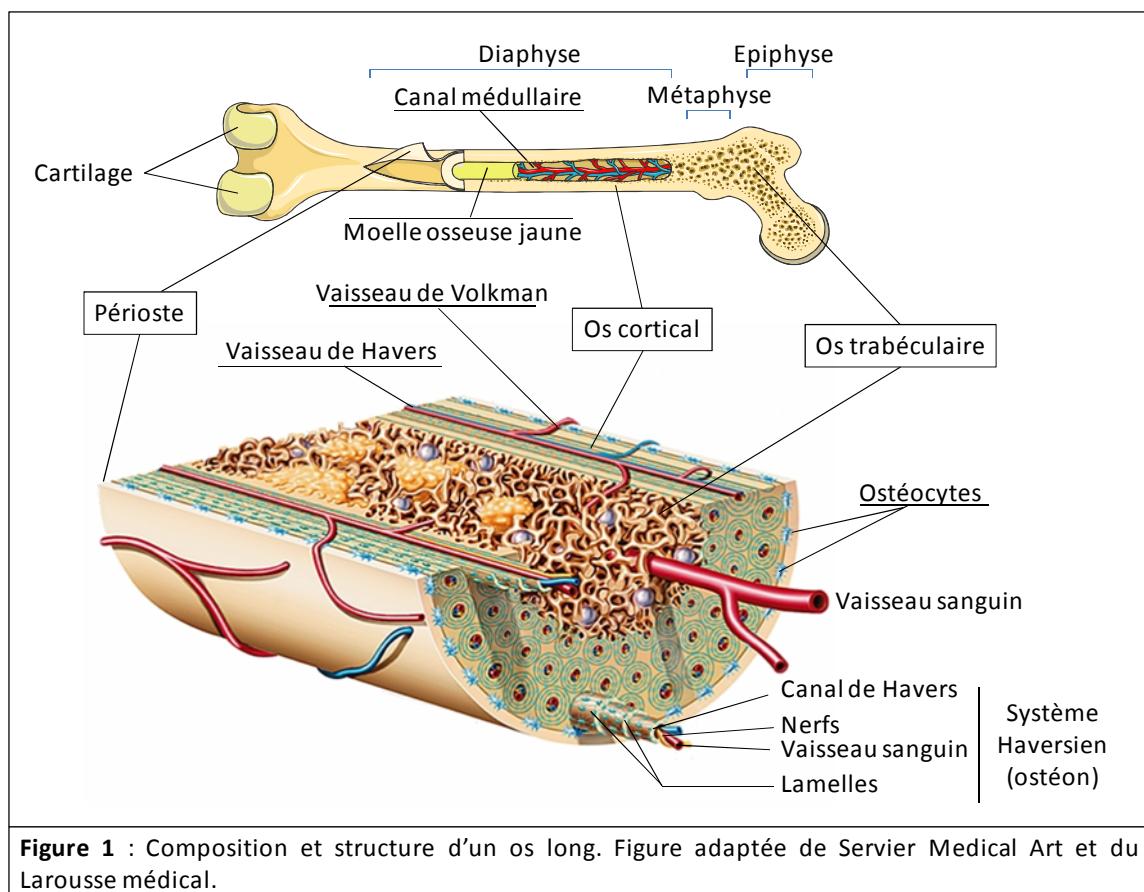
Le périoste

Le périoste revêt la surface extérieure des os sauf au niveau des zones articulaires et d'insertion des tendons et des ligaments (figure 1). Il est constitué de lamelles superposées et assure la croissance des os en épaisseur par apposition de nouveau tissu osseux. Le périoste se compose d'une couche externe fibreuse (principalement constituée de fibres de collagènes) supportant vaisseaux et nerfs, d'une couche médiane fibroélastique et d'une couche interne (le cambium) composée de cellules ostéoprogénitrices. Lorsque le cambium est actif, il est composé d'une couche d'ostéoblastes appliqués à la surface de l'os et entourée de cellules ostéogènes encastrées dans un réseau de fibres de collagènes. Avec l'âge le périoste devient

dur, fibreux et de ce fait devient moins actif. Il perd ainsi sa capacité à engendrer de nouveaux ostéoblastes, ce qui explique la difficulté de guérison des fractures osseuses chez les personnes âgées. Le périoste est riche en vaisseaux sanguins qui permettent l'apport de nutriments indispensables à la réparation osseuse.

L'endoste

La surface interne de l'os cortical et celle des travées de l'os spongieux sont tapissées par une membrane, appelée endoste, formée d'une fine membrane de tissu conjonctif vascularisée composée dans sa majorité de fibres de collagène. Cette membrane contient des ostéoclastes et des cellules ostéogènes actives (ostéoprogéniteurs) ou quiescentes (cellules bordantes) capables de se différencier en ostéoblastes. Cette membrane sépare le tissu osseux de l'espace médullaire où se trouve la moelle. La partie externe de l'os (périoste) et la partie interne de l'os (endoste) contribuent grandement au contrôle de la croissance et du remodelage osseux.



La matrice osseuse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, composé d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante et de cellules. La MEC de l'os est constituée de deux phases, une phase minérale représentant environ 70 % du poids sec de l'os et une phase organique qui représente un peu plus de 20 % [11]. Enfin, l'eau, principalement sous forme liée, est un élément important qui représente 20 à 25 % de la masse osseuse totale.

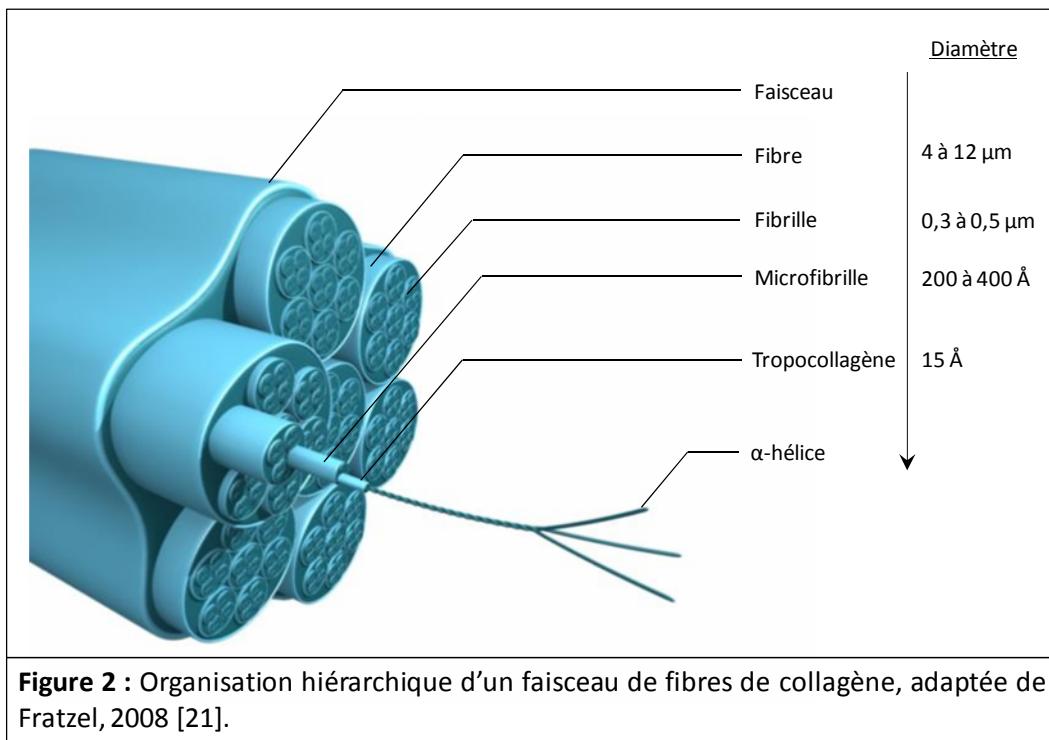
La phase minérale du tissu osseux

La phase minérale est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite $[(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)]$ et de carbonate de calcium provenant de la précipitation de sels minéraux tels que le calcium et le phosphate. Ces cristaux sont fermement attachés aux fibres de collagènes mais on les retrouve également à l'intérieur de celles-ci sous la forme de petites aiguilles hexagonales [12]. Après la minéralisation primaire qui suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes (tissu ostéoïde), le nombre et la taille des cristaux vont croître lentement au cours d'un processus de minéralisation secondaire [13]. Les ions calcium et phosphate à la surface des cristaux (plus accessible) participent aux échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec la circulation sanguine, ce qui est crucial à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. C'est cette phase minérale qui confère à l'os son incroyable résistance aux contraintes [1]. Plus précisément, selon le module de Young, les valeurs moyennes obtenues pour de l'os cortical sont de 17 GPa et de 1 à 14 GPa pour de l'os trabéculaire [14]. La résistance en compression des os est aux alentours de 195 MPa et de 135 MPa en tension [15]. Concernant les lamelles au sein des ostéons cette valeur est de 22 GPa [3]. Cette phase minérale confère à l'os sa rigidité mais c'est son organisation spatiale qui permet à l'os d'être un matériau à la fois léger et extrêmement résistant.

La phase organique du tissu osseux

La phase organique de la matrice est majoritairement constituée de fibres de collagène de type I (80-90 %) (figure 2). Elle comprend également des protéines non collagéniques comme les protéoglycans, l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine [16, 17], la sialoprotéine osseuse [18] et des glycoprotéines (par ex. la thrombospondine) [19]. Ces protéines, en plus de nombreux facteurs de croissance secrétés par les ostéoblastes, jouent un rôle fondamental dans la minéralisation de la matrice et dans la régulation du remodelage du tissu osseux [20]. La phase organique (et notamment les fibres de collagène) confère à l'os

son élasticité et sa capacité à résister aux contraintes (pression, torsion, étirement, *etc.*) imposées par la pesanteur et les déplacements.



Les différents types cellulaires du tissu osseux

Deux principaux types de cellules se trouvent dans le tissu osseux, les cellules ostéoformatrices (ostéoblastes) et les cellules résorbant l'os (ostéoclastes). Les cellules ostéoformatrices dérivent des CSM [22, 23] alors que les ostéoclastes eux dérivent des CSH monocytaires [24, 25]. Nous aborderons plus en détail les CSM dans la partie concernant l'ingénierie tissulaire osseuse. Les cellules ostéoformatrices englobent les ostéoblastes et les cellules qui en dérivent : les cellules bordantes et les ostéocytes. Parmi ces cellules, seuls les ostéocytes se trouvent à l'intérieur de la matrice osseuse. Les autres cellules ostéoformatrices ainsi que les cellules résorbant l'os se trouvent au niveau des surfaces des os où se produit le remaniement osseux.

Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices disposées en monocouche à la surface interne et externe du tissu osseux en développement. Ce sont des cellules cuboïdales de 20 µm de diamètre avec un noyau de taille importante situé à l'opposé de la paroi cellulaire au contact de l'os. Les ostéoblastes possèdent de nombreux prolongements qui leur permettent

d'être en contact avec d'autres ostéoblastes ou des ostéocytes proche de la surface. Ces liaisons permettent le contact entre ces cellules via des jonctions communicantes (gap) pour la diffusion de signaux et de nutriments [26]. Au niveau de la zone de contact avec l'os, l'ostéoblaste va déployer un nombre important de prolongements cytoplasmiques pouvant s'ancrer profondément entre les fibres de collagène. Le rôle de l'ostéoblaste au sein du tissu osseux est double : il est responsable de la formation osseuse [27] mais également de l'activation de la résorption via l'induction de la différenciation de cellules progénitrice hématopoïétiques en ostéoclastes. En effet, l'ostéoblaste peut synthétiser et sécréter des facteurs tels que le RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) ou encore interagir directement avec les cellules progénitrices pour induire leur différenciation en ostéoclastes. En ce qui concerne la formation osseuse, l'ostéoblaste va dans un premier temps élaborer de l'os immature en synthétisant principalement du collagène de type I (Coll) mais également des protéines non collagénique (ostéocalcine, sialoprotéine osseuse, ostéopontine, ostéonectine), des glycosaminoglycans et des protéoglycans (décorine, biglycan). Cette matrice de protéines compose le tissu ostéoïde. La minéralisation de ce tissu immature va rapidement être initiée et facilitée grâce à l'action spécifique de certaines protéines non collagénique. Ainsi, l'ostéopontine lie les minéraux sous forme de cristaux aux cellules osseuses [28], l'ostéonectine est nécessaire à la minéralisation du fait de son affinité pour le collagène de type I et le calcium [29], l'ostéocalcine permet la fixation du calcium à la substance fondamentale (gel amorphe formé d'eau, de sels minéraux, de protéines et de molécules dans lequel baignent les fibres et se déplacent les cellules mobiles) [16, 17], la sialoprotéine osseuse induit la nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite [18] tandis que la thrombospondine est nécessaire à l'attachement des cellules osseuses à la MEC. Cette activité de synthèse protéique élevée des ostéoblastes est supportée par la présence, dans leur cytoplasme cellulaire, de nombreux organites tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi et un ergastoplasme rugueux très développé [30]. De plus, le cytoplasme renferme des vésicules de calcium contenant de fortes concentrations de phosphatase alcaline et de minéraux qui permettront la minéralisation (chez l'homme en moyenne 10-20 jours après le dépôt de la matrice organique) aboutissant à la formation de l'os mature [31, 32]. La minéralisation dépend d'une part de la présence d'une structure matricielle extracellulaire et d'autre part d'une concentration adéquate en minéraux. Les cristaux d'hydroxyapatite qui se déposent sur et entre les fibres de collagène assurant ainsi leur cohésion donnent à l'os sa résistance aux contraintes.

Après un certain nombre de divisions, la plupart des ostéoblastes vont mourir par apoptose du à un excès de glucocorticoïdes [33]. Dès qu'ils commencent à synthétiser de la matrice, les ostéoblastes cessent de se diviser. Au fur et à mesure que la matrice est synthétisée et minéralisée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et s'aplatissent. Une petite fraction des ostéoblastes sera incorporée dans le tissu ostéoïde et se différenciera en ostéocytes. Les ostéoblastes restant à la surface dériveront en cellules bordantes.

Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des cellules provenant de la différenciation terminale d'ostéoblastes qui se sont laissé « emmurer » au sein de la matrice extracellulaire osseuse calcifiée [34]. Ils se trouvent alors enfermés à l'intérieur de lacunes périostéocytaires appelées ostéoplastes. En moyenne, 10 à 20 % des ostéoblastes vont dériver en ostéocytes. Le passage de l'ostéoblaste vers l'ostéocyte se fait sous l'action notamment de la matrix metalloproteinase de type 2 (MMP-2) et de la dentin matrix protein-1 (DMP-1) et se caractérise par la diminution de certains marqueurs tels que le ColI, la phosphatase alcaline non tissu-spécifique (ALPL) et l'augmentation d'autres marqueurs comme la DMP-1, la matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) et la sclérostine. Incapables de proliférer, les ostéocytes perdent une grande partie de leurs organites [35] mais demeurent néanmoins le type cellulaire prépondérant au sein de l'os mature (90 % des cellules). Les ostéocytes possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques fins et très longs [36] qui leur permettent d'être reliés entre eux par le biais des jonctions communicantes (gap). Ces prolongements se propagent dans un réseau de canalicules très fourni et ils permettent une communication entre les ostéocytes mais également avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse [37]. Les ostéocytes, immobilisés dans la matrice osseuse, survivent grâce aux substances nutritives apportées par le sang et qui atteignent les ostéocytes par diffusion, soit via les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit par diffusion entre les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par les jonctions gap [38]. Les ostéocytes assurent la transmission des signaux mécano-sensoriels et interviennent dans les échanges entre les cellules et leur microenvironnement [39] ce qui permet de maintenir le fragile équilibre entre formation et résorption osseuse. En effet, les ostéocytes régulent la formation osseuse par la sécrétion de sclérostine qui est un de leurs marqueurs spécifiques [40, 41]. La sclérostine est un antagoniste des voies Wnt et contrôle négativement l'activité des ostéoblastes [42]. Il semblerait également que la mort de ces cellules par apoptose soit le facteur déclenchant

l’ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent la mise en place du processus de résorption [43].

Les cellules bordantes

Les cellules bordantes, comme les ostéocytes, dérivent des ostéoblastes. Ce sont des cellules aplatis avec une activité métabolique très réduite (cytoplasme pauvre en organites) recouvrant la majeure partie des surfaces osseuses [44]. Chez l’adulte ces ostéoblastes au repos recouvrent les os quiescents (non soumis au remodelage), le reste étant recouvert par les ostéoblastes actifs. Cependant, les cellules bordantes sous l’effet de stimuli peuvent se multiplier et ont la capacité de se dédifférencier pour retrouver un phénotype d’ostéoblaste actif [45]. Ces cellules lorsqu’elles sont au repos ne possèdent aucune activité de synthèse mais ont comme principale fonction d’assurer la communication entre la surface osseuse, l’environnement cellulaire et les ostéocytes emprisonnés dans la matrice osseuse [46, 47]. Ces cellules ont également un rôle dans les premières phases de la résorption osseuse, en effet, sous l’effet de certains signaux, elles se détachent de la surface osseuse laissant place à une zone exposée accessible à l’ancrage des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont donc un rôle important dans le cycle du remodelage osseux.

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules capables de résorber l’os. Ce sont des cellules géantes (jusqu’à 100 µm), hautement mobiles, plurinucléées (jusqu’à 50 noyaux) de la famille des macrophages. L’ostéoclaste est une cellule étalée sans polarité membranaire particulière au repos ou en migration, mais qui en acquiert une lorsqu’elle est active. Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de CSM, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique. Les CSH vont donner naissance à des cellules mononucléées circulantes qui sous l’action du M-CSF (Macrophage Monocyte-Colony Stimulating Factor) vont proliférer. Cette prolifération va maintenir un pool important de cellules mononucléées appartenant à la lignée des monocytes/macrophages et considérées comme les précurseurs des ostéoclastes [48-51]. Ces précurseurs ostéoclastiques mononucléés sont ensuite attirés par chimiotactisme vers un site de résorption où ils vont s’ancrer à la matrice osseuse pour se différencier, sous l’action du M-CSF et de RANKL, en ostéoclastes mononucléées [52, 53]. Ces ostéoclastes mononucléées, toujours sous l’effet du M-CSF et de RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives mais peuvent le devenir sous l’effet de RANKL [54]. Certains monocytes et macrophages matures sont également capables de se

dédifferentier pour dériver en ostéoclastes matures en présence de M-CSF et de RANKL. Une fois activés, les ostéoclastes acquièrent une polarité verticale [55], les noyaux se trouvant à l'opposé de la surface osseuse tandis que la zone au contact de la matrice développe des replis membranaires, appelés bordure en brosse [25]. Ces expansions cytoplasmiques digitiformes renferment des filaments d'actine et de myosine au niveau desquels s'effectuent les échanges lors de la dégradation de la matrice osseuse. Les protéines d'adhésion (notamment l'ostéopontine) permettent l'ancrage des ostéoclastes et forment au niveau de la bordure en brosse un espace étroit et hermétique entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse qui correspond au compartiment de résorption (lacune d'Howship) [56]. Au niveau de cette lacune, l'ostéoclaste sécrète de l'acide citrique et carbonique par l'expulsion d'ions H⁺ pour acidifier localement le milieu et maintenir une acidité dans la lacune (pH < 4,5) grâce à des pompes situées au niveau de la membrane de la brosse. L'acidité ainsi obtenue favorise la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite libérant des minéraux (calcium et phosphore) et permet la mise à nu de la matrice organique. Les ostéoclastes vont ensuite dégrader cette matrice organique en sécrétant des enzymes lysosomales telles que la TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase) ou la cathepsine K (dégradation des protéoglycans) et en sécrétant des collagénases [57, 58]. Les ostéoclastes du fait de leur activité métabolique élevée possèdent des organites en grand nombre. Ils ont un appareil de Golgi très développé et de nombreuses mitochondries péri-nucléaires. Les ostéoclastes sont ainsi capables d'assurer la résorption du tissu osseux en agissant successivement sur la dissolution des minéraux osseux et la digestion de la matrice organique.

La formation et la croissance osseuse

La formation osseuse (ostéogenèse) intervient lors du développement de l'organisme (de l'embryon à l'âge adulte) induisant la croissance en longueur et en épaisseur des os. À l'âge adulte, l'ostéogenèse se produit lors de la consolidation osseuse au cours du remaniement ou lors de la réparation du tissu osseux après une lésion. La formation osseuse peut s'effectuer de deux manières différentes, soit par un processus d'ossification endochondrale (à partir de tissu cartilagineux préexistant) soit par un processus d'ossification intramembranaire (à partir d'une membrane fibreuse).

L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale débute au stade fœtal et forme la majorité du squelette (os longs, côtes, colonne vertébrale, certains os cranofaciaux). Elle se déroule en deux étapes successives : une première étape de destruction de la matrice de cartilage hyalin préalablement formée puis dans un deuxième temps son remplacement par du tissu osseux (figure 3A). Au niveau de la matrice cartilagineuse, les chondrocytes vont se multiplier avant de s'hypertrophier. Dans cette zone hypertrophique, les sels de calcium précipitent et forment un cartilage calcifié. Les chondrocytes incorporés dans cette matrice calcifiée qui ne laisse plus diffuser les nutriments, dégénèrent, ne sécrètent plus d'angio-inhibiteur et finissent pas mourir. Le cartilage se lyse, créant des lacunes ouvertes vers la diaphyse dans lesquelles des bourgeons vasculaires vont pénétrer, apportant des ostéoclastes qui vont accélérer le processus de dégradation du cartilage et augmenter la taille des lacunes (figure 3B). Parallèlement, les cellules souches mésenchymateuses, elles aussi apportées par la vascularisation, vont se différencier en ostéoblastes qui vont permettre la formation d'un tissu osseux en remplacement du cartilage en destruction [59]. Les ostéoblastes vont tapisser la paroi des lacunes avec des lamelles de substance osseuse au sein desquelles ils vont être emprisonnés et dériver en ostéocytes. Ensuite, les ostéoclastes vont rapidement creuser la cavité médullaire au centre de la diaphyse, où se logera un tissu conjonctif qui deviendra la moelle jaune. Cette cavité permettra également l'invasion de vaisseaux sanguins. L'ossification endochondrale qui se produit dans le cartilage de croissance, aux extrémités des diaphyses des os longs, est à l'origine de la croissance en longueur des os [60]. Quand le cartilage de croissance disparaît vers l'âge de 18-21 ans, les épiphyses et diaphyses fusionnent, signant la fin de la croissance.

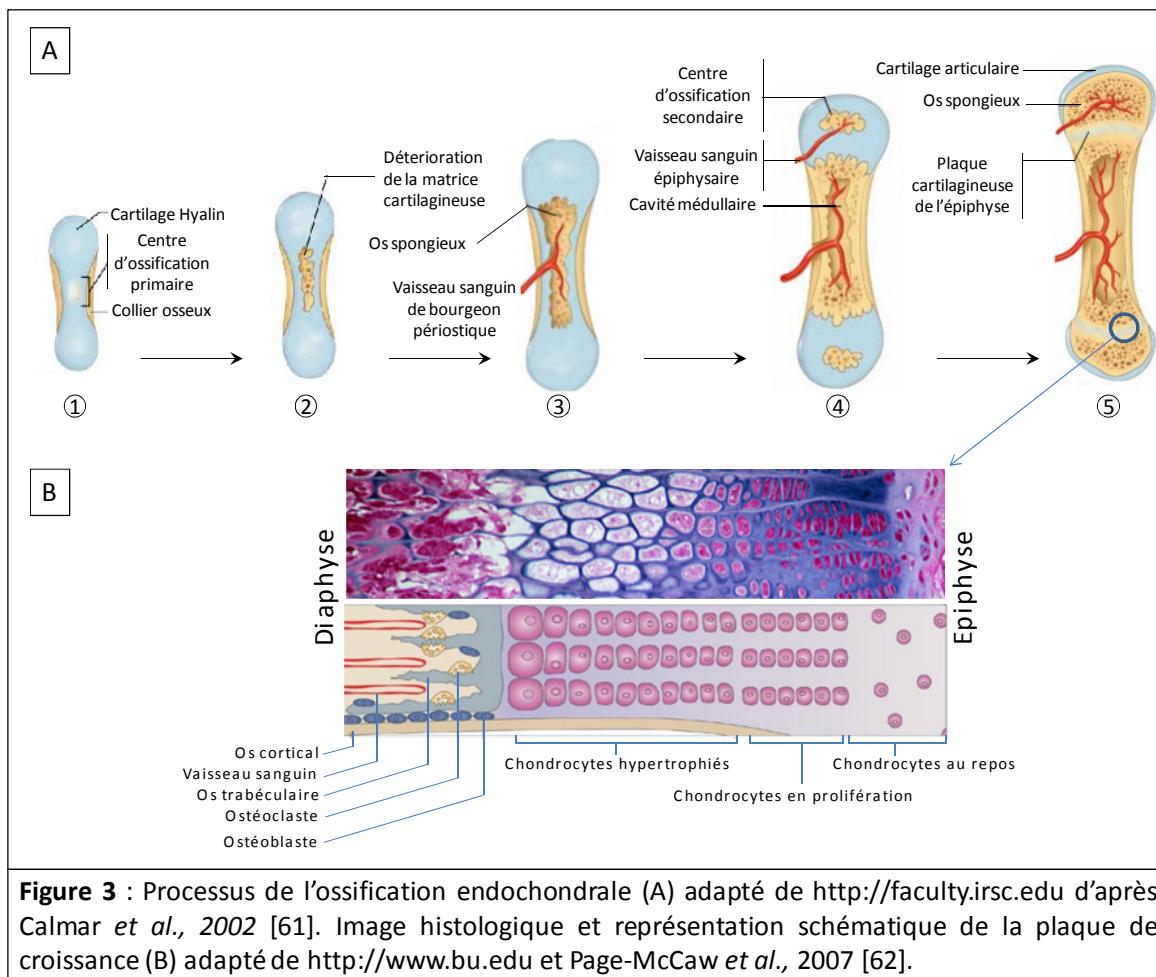


Figure 3 : Processus de l'ossification endochondrale (A) adapté de <http://faculty.irsc.edu> d'après Calmar *et al.*, 2002 [61]. Image histologique et représentation schématique de la plaque de croissance (B) adapté de <http://www.bu.edu> et Page-McCaw *et al.*, 2007 [62].

L'ossification intra-membranaire

Pendant la croissance, l'ossification intra-membranaire a pour origine la différenciation de cellules souches mésenchymateuses embryonnaires qui vont directement se différencier en cellules capables de former du tissu osseux sans passer par une première phase cartilagineuse. C'est le cas pour les os plats tel que la plupart des os de la voûte crânienne ou de la face. Les cellules mésenchymateuses vont proliférer et se condenser au niveau de zones richement vascularisées du tissu embryonnaire puis se différencier en préostéoblastes puis en ostéoblastes capables de synthétiser le tissu ostéoïde qui sera progressivement minéralisé. Les premiers centres d'ossification intramembranaire sont assez petits et ont la forme de poutres formant une charpente (travées osseuses). Chacune des travées contient en son centre des ostéocytes et ostéoblastes en surface produisant du tissu ostéoïde. La croissance osseuse se fait par apposition de matériel à la surface des travées. La croissance de ces travées fait qu'elles se rejoignent entre elles, emprisonnant nerfs et vaisseaux sanguins qui permettront le renouvellement de la moelle osseuse hématopoïétique [63]. Dans les os plats, à mi-distance

des 2 surfaces, se trouve une cavité (diploé). L'os formé au niveau de ces sites d'ossifications est de l'os fibreux qui au court du développement sera totalement remodelé et remplacé par de l'os lamellaire mature.

Le remodelage osseux et la consolidation des fractures

Contrairement aux arthropodes recouverts d'un exosquelette de calcaire de silicate très résistant mais sans possibilité de croissance, la nature a doté l'homme d'un squelette composé d'un calcaire beaucoup plus malléable possédant une grande capacité d'adaptation.

Notre squelette est perpétuellement remodelé par le biais d'un processus faisant intervenir deux activités opposées qui se complètent : la formation et la résorption osseuse [64]. Les os sont formés de millions d'unités fonctionnelles mobiles de remodelage progressant dans le tissu osseux et renouvelant ainsi 25 % de l'os trabéculaire et 3 % de l'os cortical par an. Ces unités fonctionnelles ont un cycle qui débute avec les ostéoclastes pour dégrader l'os puis se poursuit avec les ostéoblastes qui reforment l'os dégradé. Ce remaniement permanent du tissu osseux permet à l'os de s'adapter en taille et en forme aux nouvelles contraintes liées à l'augmentation en volume des organes qu'il doit protéger (cerveau, viscère, *etc.*) et à son rôle de soutien et lui permet également de remplir son rôle métabolique (libération et stockage des sels minéraux). Au cours de la croissance de l'os en longueur et en épaisseur, l'équilibre entre la résorption à l'intérieur de l'os et l'ostéogenèse en périphérie est en faveur de l'ostéogenèse. A l'âge adulte, les deux processus sont en équilibre et lors du vieillissement la résorption a tendance à prédominer, contribuant à l'ostéoporose. Chez l'adulte, le remodelage osseux peut aussi être guidé par l'adaptation aux contraintes mécaniques, en renforçant les travées de l'os trabéculaire et de l'os cortical dans les zones soumises à des forces de compression (loi de Wolff décrite en 1892) [65, 66]. Le remodelage est caractérisé par une succession de quatre phases parfaitement définies : l'activation, la résorption, l'inversion et enfin la formation [67]. Après cette dernière phase de formation, une période de quiescence précède l'engagement du tissu osseux dans un nouveau cycle de remodelage.

Le cycle du remodelage osseux

Le cycle débute par la phase d'activation caractérisée par la rétraction des cellules bordantes à la surface du tissu osseux sous l'effet de facteurs inducteurs de la résorption (hormone parathyroïdienne, vitamine D3, prostaglandine E2, *etc.*) laissant l'os accessible aux

pré-ostéoclastes ou ostéoclastes [68]. Les ostéoblastes environnants par sécrétion de cytokines (RANKL) vont alors favoriser la différenciation et l'activation des préostéoclastes en ostéoclastes matures. Les ostéoclastes différenciés et activés vont alors adhérer à la surface osseuse puis la dégrader (phase de résorption), libérant des bone morphogenetic protein (BMPs) et d'autres facteurs de croissance enchâssés dans la matrice et susceptibles d'activer les cellules responsables de la formation osseuse [69]. La phase d'inversion suit la phase de résorption, correspondant au moment où la profondeur maximale d'érosion est atteinte. Les ostéoclastes se détachent de la surface osseuse érodée et meurent par apoptose [70] laissant leur place à des macrophages qui vont alors lisser le fond de la lacune et phagocytter les débris. La dernière phase du remodelage est la phase de formation d'un nouveau tissu osseux qui se déroule en deux temps. Dans un premier temps, les facteurs de croissance libérés par les ostéoclastes vont stimuler la différenciation de précurseurs ostéogéniques en ostéoblastes [71] responsables de la production de la matrice extracellulaire (figure 4). Cette étape sera suivie d'une étape de minéralisation de cette matrice grâce à la phosphatase alcaline (ALPL), secrétée par les ostéoblastes, qui va permettre de concentrer localement les ions calcium et phosphate. Le tissu osseux est donc le théâtre d'une activité cellulaire importante et permanente essentielle au maintien et au remodelage de la masse osseuse.

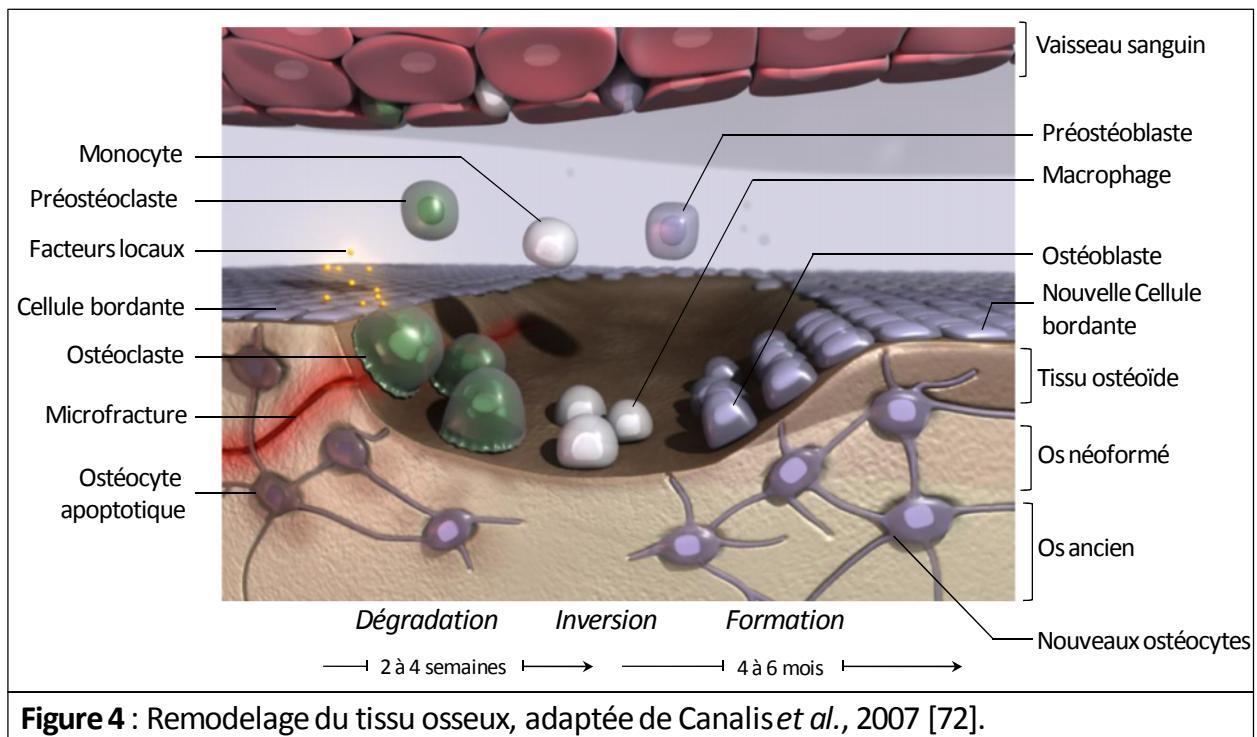


Figure 4 : Remodelage du tissu osseux, adaptée de Canalis *et al.*, 2007 [72].

Réparation spontanée

Grâce à cette capacité de remodelage, l'os est capable de se réparer spontanément [73], notamment après une fracture, sans qu'il y ait de cicatrices résiduelles [11]. La fracture s'accompagne de ruptures des vaisseaux intraosseux responsables d'un hématome auquel se mélange la moelle présente dans l'os. L'hémostase (arrêt de l'hémorragie) va se faire spontanément et cet hématome va coaguler, formant un caillot. Les plaquettes du caillot vont libérer des facteurs de croissance responsables de l'angiogénèse et de la différenciation des CSM en ostéoprogéniteurs puis en ostéoblastes. Pendant la première semaine, une réaction inflammatoire aiguë va permettre aux macrophages de résorber les débris et tissus nécrosés et de mettre en place un tissu de granulation avec des néovaisseaux. Cette réaction permet également l'apport d'ostéoclastes qui vont éroder les surfaces osseuses au niveau du foyer de fracture. Les cytokines et facteurs de croissance libérés par les fragments osseux nécrosés, les plaquettes du caillot et les cellules de la zone fracturée vont stimuler la prolifération des cellules progénitrices déjà présentes et en attirer d'autres par chimiotactisme. La revascularisation de cette zone va progresser permettant d'apporter l'oxygène et les nutriments essentiels à la régénération du tissu. Quant aux cellules ostéoprogénitrices, elles représentent la clef du succès de la réparation. Dès la deuxième semaine, elles vont permettre la formation d'un tissu conjonctif remplacé par la suite par un tissu cartilagineux formant un cal cartilagineux (ou cal mou) commençant à engluer le foyer de fracture. Parallèlement, les cellules ostéoprogénitrices du périoste et de l'endoste environnant prolifèrent et se différencient en ostéoblastes qui vont remplacer l'ébauche cartilagineuse du cal par du tissu ostéoïde rapidement minéralisé, aboutissant à un cal osseux (ou cal dur) englobant la zone de fracture et ayant à terme une structure et une résistance identiques à l'os normal (figure 5). Selon le volume et la forme de l'os la consolidation est acquise en quelques semaines à quelques mois. Le cal osseux est ensuite remodelé par les ostéoclastes pour restaurer la forme originelle de l'os fracturé [61]. Ces différents événements cellulaires sont sous la dépendance de facteurs moléculaires impliqués dans la formation des os au cours du développement (en particulier, le TGF- β , les BMPs et les IGFs).

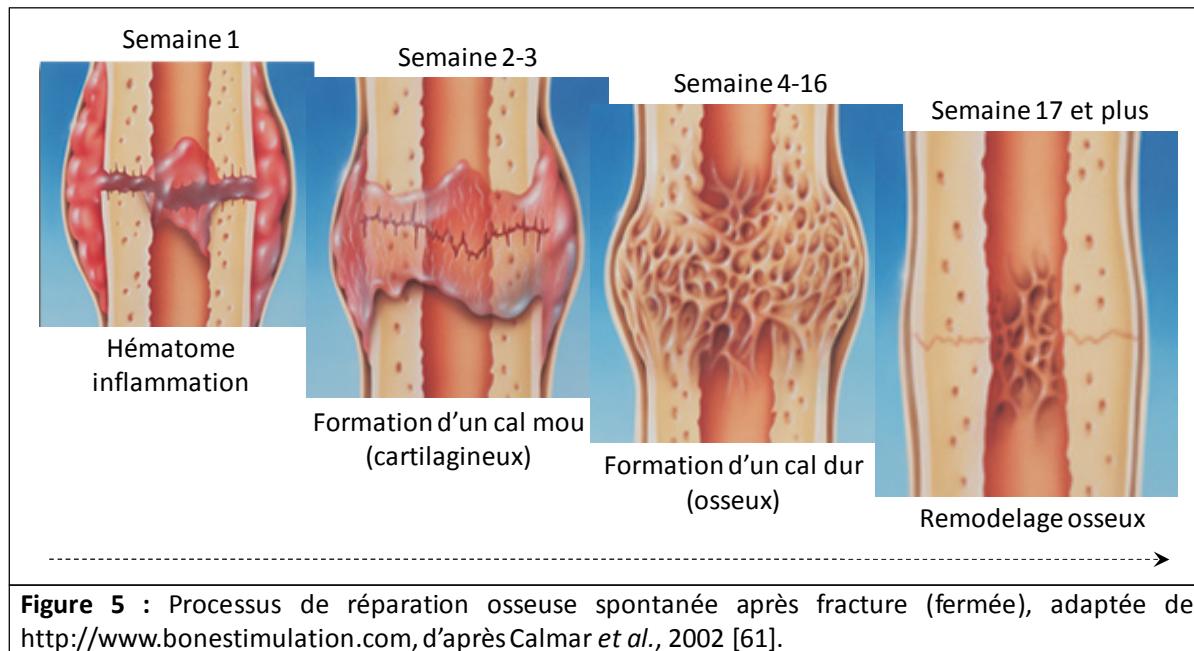


Figure 5 : Processus de réparation osseuse spontanée après fracture (fermée), adaptée de <http://www.bonestimulation.com>, d'après Calmar *et al.*, 2002 [61].

Malgré l'extraordinaire adaptabilité de l'os, sa parfaite régénération spontanée est longue et ne survient sans problèmes que pour des fractures fermées sans écart interfragmentaire supérieur à 2-3 mm. Lors de pertes de substance osseuse ou en cas de fractures consolidant lentement il est parfois indispensable d'intervenir chirurgicalement pour accélérer la consolidation.

Les pertes de substances osseuses

Certains traumatismes, certaines maladies (tumeurs, infections) ou certains gestes chirurgicaux (résection pour cause de tumeurs ou d'infections, descellements de prothèse) entraînent des pertes de substance osseuses trop importantes pour permettre une régénération spontanée.

Les traumatismes

L'application de contraintes dépassant la résistance de l'os entraîne une fracture. Si la fracture n'est que peu ou pas déplacée, une simple immobilisation peut suffire pour obtenir la consolidation osseuse. Si le déplacement est plus important, une ostéosynthèse est nécessaire pour remettre les fragments en contact et stabiliser la fracture [74]. Cela est vrai pour une certaine taille de fractures et un espace interfragmentaire supérieur à 2-3 mm peut compromettre la consolidation [75-77]. Les retards de consolidation et les pseudarthroses sont plus fréquents sur les os longs (fémur, tibia) que sur les os plats car ils sont soumis à des

contraintes plus importantes et sont moins bien vascularisés. Ils nécessitent en conséquence une intervention chirurgicale [78-80]. En cas de perte de substance osseuse circulaire sur un os long, une intervention avec greffe osseuse sera toujours nécessaire pour assurer la consolidation. En cas de lésion de la peau et des muscles, il faut souvent associer à la greffe osseuse un geste de couverture du foyer de fracture par un lambeau musculaire car il est nécessaire pour la consolidation osseuse d'avoir autour de la fracture des parties molles bien vascularisées.

Le comblement des pertes de substances osseuses ou l'apport de greffes osseuses peut être nécessaire lors de certaines interventions. Les changements de prothèses articulaires (hanches, genoux, épaules) peuvent s'accompagner de pertes de substances osseuses de plusieurs centimètres. Compte tenu du nombre croissant de prothèses posées, le nombre de remplacements va augmenter dans les années à venir. Souvent, une greffe osseuse est également nécessaire dans la chirurgie du rachis pour fusionner 2 vertèbres afin de les fixer en bonne position [81, 82]. Les prothèses de hanche représentent la majorité des actes de poses de prothèses orthopédiques. Concernant le rachis, la chirurgie est réalisée à la suite d'un traumatisme, d'une dégénérescence ou d'une malformation du tissu osseux rachidien. Ces interventions chirurgicales au niveau du rachis sont fréquentes et représentent plus de la moitié des interventions de chirurgie orthopédique en Europe.

Les traumatismes représentent une part importante des actes chirurgicaux en orthopédie, mais un nombre non négligeable d'interventions concerne des lésions d'autres origines.

Les pathologies osseuses non traumatiques

Les tumeurs osseuses, qu'elles soient malignes primitives (ostéosarcomes) [83] ou secondaires (métastases) peuvent parfois nécessiter l'exérèse de grands volumes osseux [84]. Pour les tumeurs bénignes, habituellement un simple curetage suivi de la mise en place d'un greffon suffit. Pour les tumeurs malignes, la combinaison de la chimiothérapie d'induction, de la chirurgie et d'une chimiothérapie adjuvante est nécessaire [85]. Cependant, la combinaison de ces techniques est associée à de nombreux effets secondaires.

A l'âge de 20 ans, notre capital osseux, en augmentation depuis la naissance, est finalement constitué. Après quelques années de stabilité, la masse osseuse diminue. Avec le vieillissement, les mécanismes de résorption l'emportent sur ceux de la formation. En plus de

la diminution normale et physiologique de la masse osseuse, celle-ci peut être accentuée par certains déséquilibres métaboliques ou des développements pathologiques. Dans ces cas il ne s'agit plus de pertes de substances osseuses localisées, mais de diminution de la masse osseuse ou d'une anomalie de la trame osseuse plus ou moins diffuse.

Parmi ces pathologies, l'ostéoporose [86] fait partie des plus connues car elle représente la maladie osseuse liée au vieillissement la plus fréquente. Mis à part quelques cas observés chez l'homme, cette maladie est majoritairement féminine. Elle se caractérise par une perte de masse osseuse et une altération architecturale du tissu osseux aboutissant à une fragilisation du squelette dans son ensemble et donc à une probabilité de fracture accrue [87]. En France, l'ostéoporose est responsable à elle seule de plus de 150 000 cas de fractures. Parmi ces fractures, 20 % des personnes qui en sont victimes décèderont dans l'année et 70 % de ces personnes ne recouvreront pas leur état d'autonomie initial. Les données des 10 dernières années montrent un doublement des fractures liées à l'ostéoporose et les prévisions effectuées par les spécialistes sur les années à venir sont peu encourageantes.

Certaines pathologies, certes plus rares, n'en sont pas moins très handicapantes pour les patients et nécessitent une prise en charge importante. Les maladies génétiques rares à caractère autosomique dominant sont caractérisées dans 90 % des cas par une anomalie de production du collagène de type I au niveau quantitatif ou qualitatif. Ces maladies osseuses, comme l'ostéogenèse imparfaite (ou maladie des os de verre), induisent une fragilisation de l'os qui entraîne des fractures spontanées à répétition associées dans les formes les plus graves à d'importantes déformations. Concernant l'ostéogenèse imparfaite, une étude de Horwitz *et al.* en 1999 a montré que l'implantation de moelle osseuse allogénique permettait la formation d'un nouveau tissu osseux dense et la diminution de la fréquence des fractures [88].

D'autres maladies congénitales dues à des facteurs génétiques ou mutagènes donnent lieu à des malformations osseuses (hypertrophie, atrophie, déformations, *etc.*) [89, 90]. Certaines de ces pathologies peuvent provoquer une absence localisée de tissu osseux, principalement au niveau de la boîte crânienne. Ces défauts osseux sont alors comblés par les tissus périphériques comme dans le cas des fentes faciales.

Le nombre croissant d'interventions concernant le tissu osseux a permis d'éprouver les traitements actuels, soulignant les bénéfices et les lacunes de chacun d'entre eux et ouvrant ainsi la voie au développement de nouvelles approches.

Les traitements actuels de pertes de substances osseuses

Pour pallier à la perte importante de substance osseuse, les techniques couramment utilisées consistent à apporter du matériel au niveau du défaut osseux. Ces matériaux de comblements vont permettre de consolider la partie osseuse défaillante et de guider la régénération osseuse. Ces matériaux peuvent se présenter sous la forme de greffons d'origine biologiques ou de substituts osseux synthétiques [91]. Chez l'homme, le traitement de référence reste depuis de nombreuses années la greffe de tissu osseux autologue. Cependant, du fait des limites de cette technique, d'autres approches innovantes basées sur l'utilisation de matériaux synthétiques ont émergés ces dernières années [92].

Les greffes osseuses biologiques

De nos jours, les greffes osseuses biologiques représentent la part la plus importante des greffes réalisées en chirurgie osseuse. Elles sont très employées du fait de leurs propriétés biologiques intéressantes. Il existe différents types de greffe : la greffe autologue (prélevée sur le patient lui-même), la greffe allogénique (provenant d'un autre patient) et la xénogreffe (provenant d'une autre espèce). Celles-ci ont été décrites et grandement développées durant la seconde moitié du 19^{ème} siècle par un chirurgien français reconnu comme étant « le père de la chirurgie ostéo-articulaire et réparatrice », Louis Xavier Edouard Léopold Ollier [93]. Avec le recul, nous savons aujourd'hui que suivant le type de greffons les propriétés biologiques vont être différentes. Par exemple, l'autogreffe présente des propriétés ostéoconductrices (guide et soutien la formation osseuse), ostéoinductrices (induit la formation osseuse par stimulation biochimique des cellules de l'hôte) et ostéogéniques (capable de former de l'os par l'apport d'élément tel que les ostéoprogéniteurs). Le greffon allogénique quant à lui n'est pas ostéogénique et n'est que très légèrement ostéoinducteur. La xénogreffe n'est pratiquement plus utilisée car ses propriétés biologiques sont très limitées, en effet, le xénogreffon n'est ni ostéoinducteur, ni ostéogénique et possède une ostéoconduction très limitée [94].

L'autogreffe osseuse

La greffe autologue est la référence absolue pour la reconstruction et le comblement de défauts osseux depuis de très nombreuses années. La première greffe osseuse autologue documentée a été réalisée en 1821 par un médecin allemand, Philipp von Walter. De nos jours, l'autogreffe reste la référence des greffes osseuses lorsque celle-ci est réalisable, notamment pour des raisons de compatibilité immunologique [95]. En pratique, la greffe

autologue consiste à prélever de l'os sur le patient au niveau d'un second site opératoire que l'on va placer au niveau du défaut osseux afin de le combler. En fonction du site de prélèvement, les autogreffes vont présenter différentes caractéristiques. Par exemple, un prélèvement d'os trabéculaire de par sa porosité sera plus rapidement revascularisé et donc plus rapidement intégré qu'un prélèvement d'os cortical mais moins résistant mécaniquement [96]. Le chirurgien choisira la zone de prélèvement en fonction des besoins que requiert le site receveur. Malgré tout, indépendamment de la zone de prélèvement, les autogreffes possèdent des caractéristiques similaires. Elles sont ostéogéniques car elles apportent des éléments intrinsèques tels que les cellules ostéoprogénitrices et les facteurs de croissance capables de former de l'os [97]. Les autogreffes sont également ostéoconductrices car capables de guider et de supporter la déposition d'un nouveau tissu osseux. Enfin, ces greffons autologues sont ostéoinducteurs car la présence de facteurs de croissance et de protéines apportés par les greffons induit la différenciation des cellules souches de l'hôte en ostéoprogéniteurs susceptibles de former un nouveau tissu osseux.

Le fait d'utiliser un tissu très proche de celui que l'on souhaite remplacer en termes de structure, de propriétés mécaniques et de composition présente de nombreux avantages tels que la rapidité d'intégration, le rétablissement de la fonction de l'organe et le maintien de l'intégrité tissulaire. Cependant, malgré les progrès de la médecine, l'utilisation des greffes autologues se trouve confrontée à de nombreuses limites. Une des principales limites étant l'intervention chirurgicale au niveau d'un second site opératoire entraînant des complications dans 10 à 30 % des cas. Cette seconde intervention provoque une importante morbidité au niveau du site donneur et une perte sanguine importante [98]. Une autre réserve est faite quant à la quantité d'os prélevable, en effet, dans le cas de pertes importantes, l'autogreffe peut s'avérer insuffisante. Il est communément admis que la quantité d'os prélevable se limite à 20-40 cm³ au niveau d'une crête iliaque postérieure. Ce volume peut être augmenté en multipliant les sites de prélèvements mais cela reste une limite importante à l'utilisation des autogreffes. De plus, l'intervention d'un second (ou de plusieurs) site opératoire prolonge l'intervention et les risques d'infections [99-101]. Enfin, l'intervention, même si elle est réalisée rapidement, ne permet pas une survie cellulaire importante [102]. Malgré la réaction inflammatoire qui se produit au niveau du site traité, la revascularisation est lente et les cellules du greffon vont mourir à moins qu'elles ne se trouvent à moins de 1 mm d'un vaisseau sanguin [103]. Pour cela, des techniques de vascularisation des greffons ont été envisagées pour réparer des défauts osseux de grande taille. Le prélèvement de lambeau libre

vascularisé de fibula est utilisé depuis les années 1975 pour la greffe osseuse [104]. Le déplacement de la fibula avec ses vaisseaux qui peuvent être branchés sur les vaisseaux sanguins présents au niveau du site receveur permet de contourner le problème de la nécrose du greffon du à l'absence de néo-vascularisation à un stade précoce [105]. C'est actuellement une procédure standard pour la reconstruction de défaut segmentaire après un traumatisme, la résection de tumeurs [106, 107] ou dans le cas de pseudarthroses congénitales [108, 109]. Cette technique permet une consolidation plus rapide. De plus, la fibula est capable de prendre en quelques années le diamètre d'un fémur ou d'un tibia. Toutefois, cette technique nécessite une bonne expérience technique et provoque une morbidité au niveau du site donneur.

Une alternative peut être utilisée pour le comblement des pertes osseuses diaphysaires des os longs. Il s'agit de la technique d'Ilizarov [110]. Elle consiste à faire une ostéotomie de la diaphyse à distance de la perte de substance et à faire glisser progressivement, en quelques semaines, le cylindre diaphysaire isolé vers la perte de substance pour la combler. Le défaut osseux créé au niveau de l'ostéotomie se comblant progressivement par un cal osseux spontané. Cette technique séduisante est cependant longue (plusieurs semaines), contraignante pour le malade et nécessite souvent des greffes osseuses complémentaires.

L'allogreffe osseuse

Dans certains cas, l'âge du patient, la localisation de la perte osseuse ou le volume de greffon nécessaire ne permettent pas l'utilisation d'une greffe autologue. Les chirurgiens ont alors recourt à la greffe autologue seule ou en association avec des greffons autologues [111]. Le tissu osseux autologue peut provenir d'un donneur à l'occasion d'opérations chirurgicales ou être prélevé lors de prélèvements multi-organes. La quantité d'os disponible est donc beaucoup plus importante que pour la greffe autologue, sans que cela nécessite un recourt à un second site opératoire. Néanmoins, l'utilisation des allogreffes reste loin derrière celle des autogreffes du fait des risques de réactions immunogènes et de transmissions de maladies.

Une des premières allogreffes osseuses a été réalisée en 1881 par le médecin écossais William McEwen, dans le cadre de la reconstruction d'un os du bras. Des années plus tard, avec l'avènement des techniques de congélation durant les années 50, l'utilisation des allogreffes osseuses s'est intensifiée. En effet, afin de pallier les problèmes liés aux transmissions virales, de nombreuses méthodes de préparation et de conservation de ces greffons se sont développées. Grâce à cela, des banques osseuses ont pu être créées rendant le

matériel osseux directement disponible pour le praticien. Cependant, ces techniques (thermiques, chimiques, stérilisation, *etc.*) visant à rendre ces greffons aptes à l'implantation altèrent les propriétés ostéoconductrices et ostéoinductives [112, 113]. De ce fait, les chirurgiens reviennent actuellement à l'utilisation de greffons cryopréservés.

Une autre utilisation clinique de ces greffons est réalisée sous la forme de matrices osseuses déminéralisées (DBM). Les DBM sont utilisées depuis la fin du 19^{ème} siècle [114] mais l'amélioration des techniques de préparation a permis d'élargir leur panel d'utilisation à partir des années 70 [115]. La déminéralisation des greffons autologues consiste à éliminer la partie minérale pour ne conserver que la charpente protéique constituée essentiellement de collagène et contenant de nombreux facteurs de croissance tels que les BMPs. Grâce à cela, l'allogreffe osseuse possède des propriétés ostéoinductrices [116, 117] mais elle perd ses propriétés mécaniques et est très rapidement résorbée par l'organisme.

Un des principaux problèmes liés à l'utilisation des allogreffes est que les greffons sont acellulaires et de ce fait présentent des propriétés biologiques limitées. A cause de cela, ces greffons sont plus rapidement résorbés que les greffons autologues. Associé à une consolidation plus lente, ces facteurs augmentent les risques de fractures secondaires [118]. Enfin, malgré toutes les précautions prises lors de leur préparation, ces greffons présentent des propriétés biologiques variables avec un risque de rejet et de transmission virale persistant ainsi qu'un risque infectieux (7 à 15 %) dépendant des méthodes de stérilisation et de conservation [119-121].

Malgré tout, ces manipulations par cryogénérisation ou irradiation ont permis d'éliminer les bactéries et virus possiblement présents dans ces greffons et ainsi d'en limiter fortement les transmissions sans trop affecter les propriétés biologiques faisant de ce type de greffe une alternative intéressante à l'utilisation des autogreffes [122, 123]. Ces greffons peuvent notamment être utilisés en association avec des greffons autologues pour le comblement de grandes pertes osseuses (exérèse de tissu tumoral [124]).

La xénogreffe osseuse

Afin de contourner certains problèmes advenant lors de l'utilisation d'auto- ou d'allogreffes, des techniques utilisant des greffes obtenues à partir d'autres espèces animales ont été développées.

De fortes présomptions existent quant à la pratique de la chirurgie osseuse par d'anciennes civilisations (jusqu'à 3000 ans avant notre ère) et plus particulièrement par les Incas au XIII^{ème} siècle qui auraient utilisés des plaques d'or comme substitut osseux [125, 126]. Mais c'est en 1668 que des documents relatent la première greffe osseuse biologique. C'est le Hollandais Job Janszoon van Meekeren qui en est à l'origine et qui serait parvenu à combler le défaut crânien d'un soldat en y greffant un morceau de crâne de chien [126]. Le patient aurait apparemment toléré la greffe. Cependant, l'Eglise l'ayant exclu du fait de l'utilisation d'un fragment animal, il aurait exigé qu'on le lui retire, mais un peu tard, l'os s'étant déjà ressoudé. Cette anecdote souligne l'intérêt porté par l'homme depuis de longues années vis-à-vis de l'utilisation de greffes animales. Mais depuis cette époque de nombreuses tentatives ont provoqué de fortes réactions immunologiques rendant les xénogreffes impropres à une utilisation clinique. Malgré les efforts pour traiter cet os hétérologue [127], les quelques essais effectués des années 60 aux années 90 ont largement échoué. Ces greffons dits de « première génération » ne sont plus utilisés actuellement, cependant l'amélioration des techniques de préparation a permis la fabrication de nouveaux xénogreffons actuellement utilisés en clinique [128-130]. En contrepartie, comme pour les allogreffes, les traitements effectués diminuent significativement leurs propriétés biologiques. De plus, les problèmes liés aux risques de transmission virale, à la non-compatibilité biologique et aux réactions inflammatoires [131, 132] font de ces xénogreffes des matériaux utilisés de façon sporadique.

Les différentes greffes osseuses biologiques présentées ci-dessus montrent de nombreux avantages, faisant de ces greffes le matériau de choix pour les interventions chirurgicales humaines (80 à 90 % des interventions). L'autogreffe, quant elle est possible, reste l'intervention de première intention (plus de 50 % des cas) et peut être associée dans certain cas à des greffons autologue ou hétérologue. Malgré cela, qu'elles soient auto-, allo- ou xéno-, ces greffes biologiques ont montré leurs limites et ont poussé la recherche à trouver de nouveaux substituts osseux d'origine synthétique.

Les substituts osseux synthétiques

Les matériaux synthétiques sont généralement décrits comme des matériaux non viables interagissant avec les milieux biologiques [133]. Les projets focalisés sur l'utilisation de substituts osseux synthétiques sont très abondants dans le monde. Depuis quelques décennies déjà, de nombreux matériaux ont été développés tels que les alliages de métaux, les polymères, les hydrogels ou encore les céramiques phosphocalciques. Ce sont ces dernières,

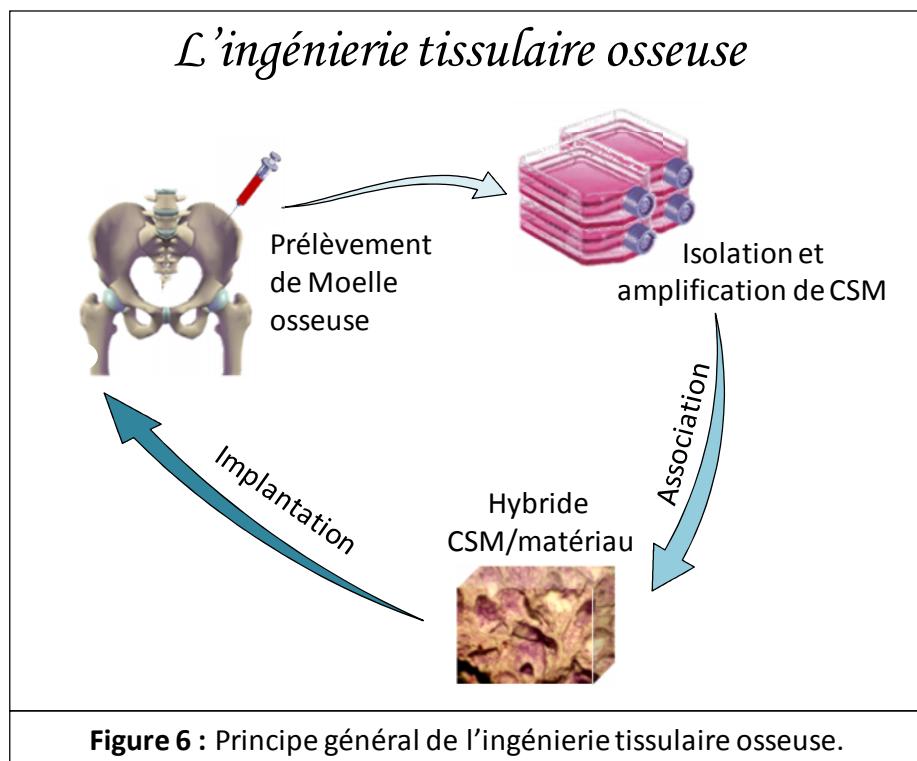
les céramiques synthétiques composées de calcium et de phosphates, comme par exemple les matériaux à base d'hydroxyapatite, qui sont les plus utilisés [134]. Ces substituts sont principalement utilisés dans le cadre de comblement de défauts osseux. Durant cette thèse nous avons principalement utilisé ce type de céramiques phosphocalciques, c'est pourquoi dans la suite de ce manuscrit nous nous arrêterons plus longuement sur ces matériaux afin d'en approfondir la description. Cependant, actuellement aucun de ces matériaux n'a pu montrer de capacités de régénération osseuse capables d'égaler celles de l'autogreffe. Dans ce contexte, de nombreux efforts ont été déployés afin de fabriquer de nouveaux matériaux mimant la structure et la composition osseuse.

C'est dans ce climat d'innovations associé à la découverte des incroyables capacités des cellules souches qu'a émergé l'ingénierie tissulaire osseuse. Cette nouvelle discipline a évolué depuis les années 60 et intègre désormais les dernières avancées en terme de biologie, d'ingénierie et de médecine [135]. Elle a pour objectif d'associer des biomatériaux synthétiques capables de procurer à des cellules souches un support sur lequel elles puissent proliférer mais également se différencier en ostéoprogéniteurs. Cette combinaison permet de former une charpente hybride apte à se conformer étroitement aux propriétés physiologiques et mécaniques du tissu osseux au niveau du site à reconstruire, impliquant dans la mesure du possible avec un abord chirurgical minimal, voir même percutané.

L'ingénierie tissulaire osseuse

L'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) n'est pas une simple discipline mais un regroupement de disciplines couvrant de nombreux domaines tels que la biologie, la biochimie, l'ingénierie et la médecine [135]. Ces disciplines essaient d'interagir entre elles dans le but de reproduire le plus finement possible un tissu osseux, si possible de volume important, qui puisse parfaitement être intégré par l'organisme et ce de façon pérenne.

Pour cela, l'ITO dispose de différents outils qu'elle essaie de combiner afin d'obtenir un matériau de choix. La base de l'ITO est faite de l'association d'une matrice synthétique servant de support à des cellules ostéocompétentes (figure 6). Chaque élément essayant de pallier les lacunes de l'autre.



Les cellules de l'ingénierie tissulaire

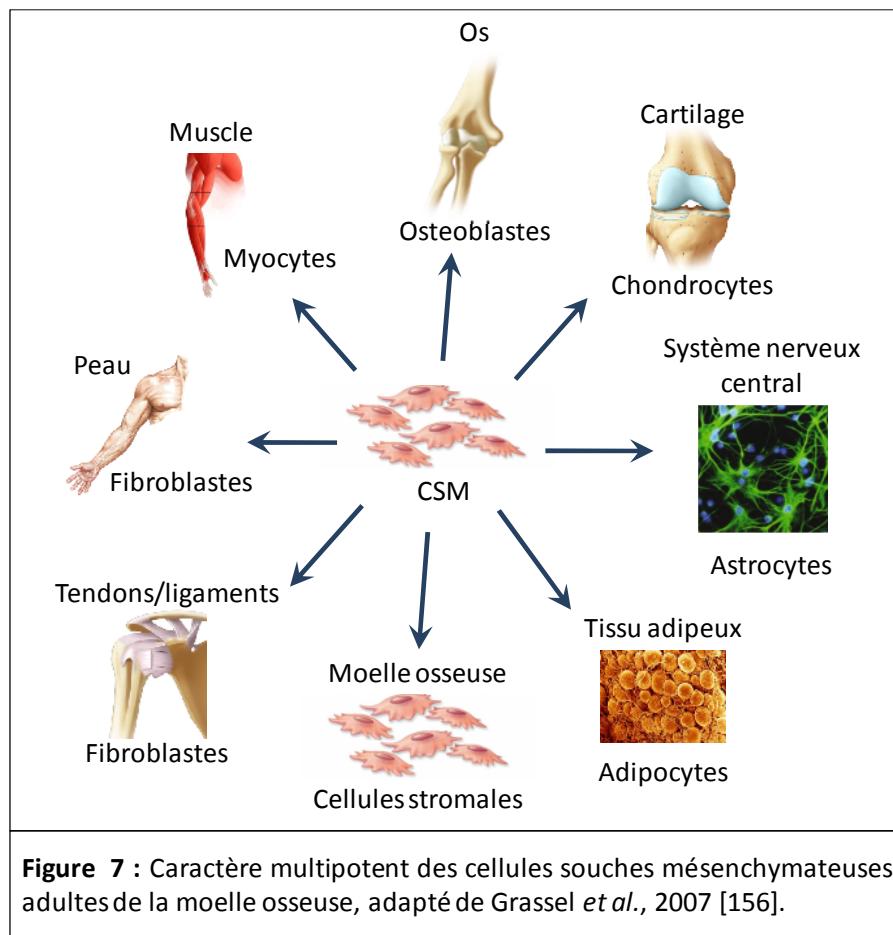
Les cellules les plus utilisées dans le cadre de l'ITO sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM), également appelées « cellules stromales mésenchymateuses multipotentes ». Ce sont ces cellules que nous avons utilisées lors de ces travaux et c'est pourquoi nous allons en approfondir la description.

Les cellules souches mésenchymateuses

Les CSM sont naturellement présentes dans la moelle osseuse qui en est la principale source. La moelle osseuse est facilement prélevable, par exemple au niveau de la crête iliaque, mais il a été démontré que pour un jeune adulte ce prélèvement hétérogène contenait uniquement de 0,001 % à 0,03 % de CSM parmi les cellules mononucléées et que ce pourcentage diminue avec le vieillissement (à partir de 35 ans) [136-138]. Compte tenu du très faible nombre de CSM au sein de la moelle, il est inutile d'augmenter le volume de prélèvement en espérant augmenter de façon intéressante la proportion de CSM. Un nombre important de CSM étant indispensable pour l'ITO, il a donc fallu trouver une autre approche permettant de les isoler et de les amplifier de façon convenable. C'est dans les années 70 que pour la première fois Friedenstein et ses collaborateurs ont pu isoler des CSM de la moelle osseuse et ont pu les caractériser comme étant des cellules progénitrices du tissu squelettique

[139, 140]. Il a été montré que ces cellules possédaient une forte propension à s'autorenouveler (clonogénique) et qu'elles étaient multipotentes, caractéristique à la base du développement de l'ITO. Cette multipotentialité leur permet de se différencier vers plusieurs phénotypes cellulaires (au moins myoblastes, tenocytes, adipocytes, chondroblastes et ostéoblastes) (figure 7). Des travaux portant sur la clonogénicité de ces cellules ont pu mettre en évidence que les CSM forment des colonies, chacune dérivant d'un seul progéniteur. En fonction du stade de différenciation du progéniteur, les CSM composant ces colonies vont avoir une taille, une morphologie et une capacité à se différencier distinctes, formant une population hétérogène [141]. Une étude plus récente a pu mettre en évidence que les différentes populations de CSM n'étaient pas toutes aptes à s'engager vers l'ensemble des lignées cellulaires, mais qu'elles étaient plus naturellement orientées vers le phénotype ostéoblastique [142]. Ces propriétés font des CSM d'excellentes candidates pour l'ITO. Avec l'augmentation de l'utilisation des CSM, il a donc fallu les définir selon des critères bien spécifiques afin d'éviter les dérives. En 2006, la société internationale pour la thérapie cellulaire a donc défini les CSM par : leur adhérence au plastique dans des conditions standard de culture, une expression d'antigènes de surface spécifique (CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, CD79α- et HLA-DR-) et la capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes [143]. En plus de ces propriétés, elles sont facilement isolables par leur capacité d'adhésion à partir d'un volume restreint de moelle osseuse, elles possèdent une grande capacité de prolifération et conservent leur potentiel durant de longues périodes d'expansion et après cryopréservation [144, 145]. Tout de même, il est important de noter que le nombre de divisions et de passages jouent sur le potentiel de ces CSM à proliférer et que cette capacité de prolifération diminue également avec l'âge du patient [146]. Ces cellules conservent malgré tout leur potentiel ostéogénique [147]. De plus, une étude récente a montré l'occurrence d'aneuploïdie au niveau de CSM après une longue période d'expansion sans que celles-ci ne se transforment [148] et l'utilisation de CSM après amplification *in vitro* est autorisée pour la réparation de défauts cartilagineux [149, 150].

La moelle osseuse est le site de prédilection pour le prélèvement des CSM, cependant d'autres sites hébergeant des CSM ont été découverts : le cartilage, la synovie, les muscles squelettiques, les dents de lait, les péricytes vasculaires, le tissu adipeux, et sans doute d'autres encore à découvrir [151-153]. Des travaux ont toutefois établi que la moelle osseuse demeurait, pour des raisons à la fois pratiques et scientifiques, le site de prélèvement le plus pertinent [154, 155].



La différenciation ostéoblastique des CSM

Les CSM expriment à leur surface un nombre important de protéines parmi lesquels on trouve des molécules d'adhésion cellulaire (intégrines) et des récepteurs aux facteurs de croissance [157-161]. Ce panel important de protéines à leur surface rend les CSM très réceptives à différents facteurs biologiques. De ce fait, *in vitro*, il est possible d'orienter ces CSM vers un phénotype donné en supplémentant le milieu de culture contenant du sérum, principalement issu de veau fœtal, avec des facteurs de croissance bien définis.

Au cours de la différenciation ostéoblastique, de nombreux gènes vont être exprimés menant à la synthèse de protéines essentielles à la différenciation des CSM en ostéoblastes mais également essentielles à la formation et la minéralisation de la MEC. La phase précoce de cette différenciation est caractérisée par l'expression de Runt-related gene 2 (Runx2) et de la bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). Puis la maturation des cellules est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques associés à la production de matrice tels que la phosphatase alcaline non tissu-spécifique (ALPL), le collagène de type I (ColI) ou encore l'ostéopontine (OPN). Les ostéoblastes matures quant à eux expriment des marqueurs tardifs

tels que la sialoprotéine osseuse (BSP), ostérix (Osx), l'ostéocalcine (OCN) ou l'ostéonectine (OSN).

Runx-2, également nommé core binding factor *alpha-1* (Cbfa-1), est un facteur de transcription puissant inducteur de la différenciation ostéoblastique [162-164]. Runx2 possède un domaine de liaison à l'ADN capable de se fixer et d'activer les promoteurs de nombreux marqueurs ostéoblastiques tels que le ColI, l'OPN, la BSP, l'OCN et Osx [165, 166]. Au cours de la différenciation, des facteurs de croissance vont être sécrétés, parmi eux, les BMPs (et notamment la BMP-2) sont les plus puissants inducteurs de l'ostéogenèse. La BMP-2 agit notamment sur les facteurs de transcription majeurs de la différenciation comme Runx2 et Osx [167]. La BMP-2 inhibe l'adipogenèse et stimule l'ostéogenèse en augmentant (via Runx2 ou Osx) l'expression des marqueurs ostéoblastiques (ALPL, ColI, BSP, OCN) [168-173]. La BMP-2 et Runx2 de par leur action et leur interaction sont ainsi des protéines clefs pour l'induction de la différenciation ostéoblastique.

L'ALPL et le ColI sont des marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique exprimés par les préostéoblastes. Ces deux protéines jouent un rôle essentiel dans la formation d'une matrice extracellulaire minéralisée. Le ColI compose majoritairement cette MEC [174] qui va ensuite être minéralisée notamment par l'ALPL [175]. L'ALPL va en effet générer du phosphate inorganique permettant la formation de cristaux d'apatite et la minéralisation du ColI [176-178]. La minéralisation de la MEC va être supportée par la synthèse de protéines plus tardives exprimées par les ostéoblastes plus matures comme par exemple la BSP qui initie la minéralisation par la nucléation de cristaux d'apatite [18, 179-181] et l'ostéonectine qui facilite la liaison du calcium au collagène [182]. Quant à l'OCN, l'un de ses rôles serait d'inhiber la minéralisation par son affinité avec l'apatite qui réguleraient la nucléation des cristaux d'apatite [183, 184] mais son rôle reste controversé [185, 186].

Dans le cadre de l'ITO, l'utilisation de la dexamethasone (dex), du β -glycérophosphate (β -gly) et d'acide ascorbique (a.a.) permet d'engager les CSM dans la voie ostéoblastique [187-190]. Cette association de facteurs est la plus anciennement et la plus fréquemment utilisée pour induire la différenciation ostéoblastique des CSM [191, 192]. Néanmoins, le mode d'action de la dex est variable en fonction de l'espèce utilisée [193], de l'état initial des cellules et du microenvironnement [194]. De plus, il est nécessaire d'en utiliser des doses pharmacologiques pour différencier les CSM humaines [195]. Il est possible de substituer la dex par d'autres molécules ostéoinductrices comme la prostaglandine E2

[196] ou la 1,25-dihydroxyvitamine D3 [197]. Cependant, comme nous le décrirons plus précisément dans le chapitre 4 de ce manuscrit, les ostéoinducteurs de substitution les plus utilisées sont les BMPs. Ces molécules sont physiologiques, contrairement à la dex qui est une hormone glucocorticoïde de synthèse. L'utilisation de sérum de veau est également au centre de débats de par son potentiel immunogène et sa composition non définie mais il reste un élément de référence pour l'amplification des cellules [198]. Dans le cadre des applications cliniques, le sérum de veau est substitué par le sérum du patient dans les derniers temps de culture mais il a été montré que l'âge du donneur pouvait influer sur la différenciation ostéoblastique [199]. Des sérum synthétiques ont également été développés à des fins cliniques avec une composition bien définie et une absence d'immunogénicité. Ces sérum ont déjà été utilisés sur des modèles animaux d'ingénierie tissulaire osseuse [200].

Les facteurs ostéogéniques peuvent également être remplacés par l'utilisation de cultures spécifiques comme la culture dynamique (diffusion de milieu de culture) [201], la présence de peptides RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) [202], la stimulation mécanique [203, 204] ou encore la culture tridimensionnelle. Cette dernière faisant partie intégrante de cette thèse sera détaillée dans le chapitre 5.

L'utilisation des CSM en clinique

La découverte des CSM et de leur potentiel *in vitro* a incité les chercheurs à pousser plus loin les études basées sur leur utilisation. Des études précliniques sur différents modèles animaux ont alors été réalisées et les résultats prometteurs obtenus ont encouragé les scientifiques et les médecins à réaliser les premières études cliniques. Les premiers travaux chez l'homme ont porté sur l'utilisation de moelles osseuses autologues injectées en percutanées au niveau de fractures non consolidées du tibia. Une étude datant de 1991 a pu confirmer un bénéfice certain de l'injection moelles osseuses autologues sur la consolidation osseuse [205]. Plus tard aux alentours des années 2000, Horwitz *et al.* ont réalisé des études utilisant à nouveau de la moelle osseuse totale mais cette fois allogénique, afin de traiter de jeunes enfants atteints d'ostéogenèse imparfaite [88, 206]. Durant ces études il a été montré que la transplantation de moelles osseuses allogéniques totales permettait de rapidement (3 mois) augmenter la masse osseuse, d'augmenter la vitesse de croissance et permettait de diminuer la fréquence des fractures. Ces études sont très prometteuses quant à l'utilisation de CSM allogéniques en ingénierie tissulaire. Plus récemment en 2005, Hernigou et son équipe ont évalué les effets d'une concentration de moelle osseuse totale sur la consolidation de

fracture tibiale [207]. Leurs travaux montrent de meilleurs résultats lors d'utilisation de moelles osseuses concentrées par rapport à des moelles non concentrées mais également des résultats intéressants sur la corrélation entre la consolidation osseuse et la proportion de CSM présentes dans le greffon. Les données obtenues lors de ces essais cliniques pilotes soulignent l'intérêt que peuvent avoir les CSM pour le développement de nouvelles thérapies appliquées à l'os. Le potentiel de ces CSM pour la régénération osseuse est double car ces cellules se différencient préférentiellement vers le phénotype ostéoblastique [142]. De plus, aucune réponse immunitaire significative ne semble induite chez l'homme quant les CSM sont utilisées de façon allogénique [208, 209]. Malgré tout, en fonction des conditions de prélèvements, d'isolation et de préparations des CSM, les résultats peuvent être très variables. Il est donc essentiel d'approfondir les recherches dans ces différents domaines afin de standardiser et d'optimiser les protocoles qui déboucheront aux essais cliniques. Dans cet objectif, de nombreuses études sont actuellement menées afin de trouver les meilleures procédures d'isolation et d'expansion des CSM. Une étude de 2010 réalisée par Grisendi *et al.* a mis en évidence qu'il était possible d'obtenir environ 30 millions de CSM (au passage 4) à partir d'un prélèvement de 20 ml de moelle osseuse après un peu plus de 30 jours de culture [210]. D'autres études réalisées par Sensebé *et coll.* ont montré qu'il était possible de produire un nombre important de CSM pour des utilisations cliniques. Ces travaux ont montré qu'à partir d'un prélèvement de 60 millions de cellules mononucléées cultivées dans un milieu supplémenté avec du fibroblast growth factor 2 (FGF2), il était possible d'obtenir entre 200 millions et 1 milliard de CSM après 28 jours. Après cette période d'expansion, les CSM avaient conservé leur phénotype, leurs capacités de différenciation et ne présentaient pas de transformation [211, 212].

L'utilisation de la moelle osseuse totale ou de CSM isolées se heurte cependant à certaines limites. Une récente étude de Wright consistant à injecter de la moelle osseuse au niveau de kyste osseux n'a pas montré de résultats probants, signifiant que la moelle osseuse échoue à induire une réparation osseuse dans une cavité [213]. C'est pourquoi, dans le but de pallier à ce problème, des matériaux synthétiques ont été développés. Ces matériaux ont pour objectif de permettre le comblement de grands défauts osseux et de procurer des propriétés mécaniques immédiates au tissu lésé, ce qui est impossible avec l'implantation de moelle osseuse ou de cellules seules.

Les substituts osseux synthétiques

Les substituts osseux synthétiques sont des outils indispensables à l'ingénierie tissulaire. En effet, associer avec des cellules ostéoprogénitrices ils forment des complexes possédant de nombreuses qualités requises à la substitution des greffes biologiques actuellement utilisées. Les substituts osseux servent non seulement de support aux cellules mais peuvent également apporter d'autres caractéristiques, en particulier des propriétés mécaniques. Ils ont de plus l'avantage d'être disponibles en grande quantité pour un moindre coût et de ne pas provoquer de réactions immunogènes une fois implantés.

De nombreux matériaux ont été développés dans le cadre de l'ITO avec des avantages et des inconvénients propres à chacun. Parmi ces matériaux, les polymères et les hydrogels de par leurs injectabilités se sont montrés très intéressants pour le comblement de défauts de forme complexes. Des études ont pu montrer l'intérêt de tels matériaux dans la réparation osseuse [214, 215]. Toutefois, ces matériaux possèdent de très faibles propriétés mécaniques et ne peuvent remplacer les matériaux solides tels que les biocéramiques phosphocalciques.

Les biocéramiques phosphocalciques

Les biocéramiques phosphocalciques sont des matériaux solides à base d'hydroxyapatite (HA), de phosphate tricalcique beta (β -TCP) ou d'un mélange de ces deux éléments formant le phosphate de calcium biphasé (BCP). Ce sont les matériaux les plus utilisés comme support cellulaire pour la fabrication de greffons osseux dans le cadre de l'ITO (figure 8) [97, 118, 216].

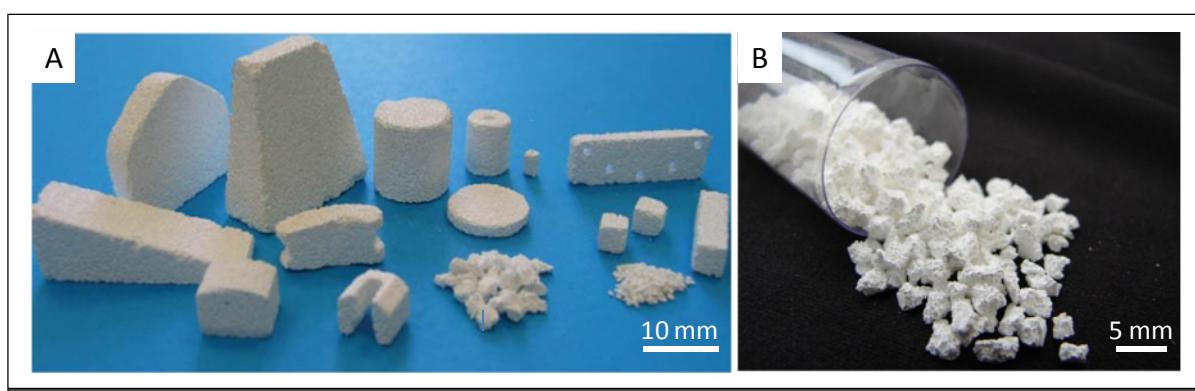


Figure 8 : Les céramiques phosphocalciques, principale source de substituts osseux synthétiques. (A) différentes formes peuvent être usinées pour répondre aux besoins des chirurgiens. (B) une forme granulaire peut s'adapter à un nombre important de défauts. D'après <http://www.biomatlante.com>.

L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est une céramique de phosphate de calcium qui représente le principal composant minéral de l'émail dentaire, de la dentine et de l'os. L'hydroxyapatite phosphocalcique $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, dont le rapport calcium/phosphate est de 1,67, appartient à la famille cristallographique des apatites. Cette hydroxyapatite synthétique présente une très forte similitude structurelle avec l'hydroxyapatite naturel de l'os. Elle est très peu soluble et son taux de dégradation très faible *in vivo* est dépendant du pH mais aussi de facteurs physicochimiques dont la porosité, les contraintes mécaniques subies et la composition chimique.

Le phosphate tricalcique beta

Le phosphate tricalcique β $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ fait partie d'une famille de composés dont le rapport calcium/phosphate est égal à 1,5. Le β -TCP est fragile et peu résistant, ce qui le restreint, concernant son utilisation clinique, à des zones non portantes et soumises à de faibles contraintes mécaniques. C'est notamment pour cela qu'il est très souvent associé à l'HA pour former des matériaux biphasés. Comme pour l'HA, la dégradation du β -TCP *in vivo* est dépendante de sa porosité, des contraintes subies et de sa composition. Cette dégradation se produit par deux phénomènes que sont la dissolution et la résorption par phagocytose, ce qui la rend plus rapide que l'HA.

L'association de l'HA avec le β -TCP permet de former un troisième composé appelé phosphate de calcium biphasé [217]. Cette association permet de combiner les qualités mécaniques de l'HA et la propriété de résorption du β -TCP tout en jouant sur le ratio HA/ β -TCP pour en adapter son utilisation. Le β -TCP étant plus soluble que l'HA, la vitesse de résorption du BCP sera donc dépendante de sa proportion en β -TCP. Lors de cette thèse, les matériaux utilisés sont des BCP composés de 20 % d'HA et de 80 % de β -TCP, c'est pourquoi nous allons détailler sa fabrication ainsi que ses différentes propriétés biologiques.

Les phosphates de calcium biphasés

Caractéristiques physico-chimiques

Les BCP sont généralement fabriqués à partir de la compaction d'une poudre sous un effet de pression associé à un frittage (processus thermique) à une température proche de 1100°C [218]. Ils sont fabriqués sous différents aspects de forme, de taille et de porosité. Les BCP peuvent en effet être produits sous forme de particules (micromètre), de granules

(millimètre) ou sous forme de blocs de plus grandes tailles. La plupart des BCP utilisés actuellement sont les BCP macroporeux sous forme de blocs ou de granules. Ce sont ces types de matériaux granulaires que nous avons utilisés lors des études exposées dans le chapitre 3. Ces BCP possèdent une importante macroporosité (pores $> 100 \mu\text{m}$) avec si possible une bonne interconnexion entre pores permettant une diffusion homogène des fluides dans tout le matériau. La taille, la forme et le nombre de pores ainsi que l'interconnexion peuvent être contrôlés grâce aux différentes substances porogènes (naphtalène, sucre, peroxyde d'hydrogène, bille de polystyrène, *etc.*) additionnées avant frittage et qui vont former des cavités par leur combustion. Les paramètres liés à la porosité sont très importants et vont être responsables de la bonne intégration du greffon grâce aux passages des fluides biologiques, à l'invasion cellulaire, à sa vascularisation et à l'apposition de nouveau tissu osseux. La température de frittage va également intervenir au niveau de la microporosité de surface (pores $< 10 \mu\text{m}$). A la surface des BCP, cette microporosité va avoir un rôle au niveau de l'adhésion cellulaire, de l'adsorption protéique et du phénomène de dissolution/précipitation. Le phénomène de dissolution qui se produit à la surface du BCP permet une libération locale d'ions très utile pour les échanges ioniques avec le milieu extracellulaire et les cellules. L'augmentation de la concentration d'ions à la surface des BCP provoque ensuite la précipitation d'une apatite biologique tout en séquestrant des protéines d'intérêt comme nous le décrirons plus tard.

Les structures macro- et microporeuse des BCP est essentielle à leurs activités biologiques. Elles conditionnent leur solubilité et donc leurs interactions avec le milieu biologique. Une étude précédente a décrit l'importance de la taille des macropores pour la formation osseuse. Ces travaux concluent que la taille optimale des macropores doit être comprise entre 300 et 400 μm [96]. Mais plus encore que la taille des pores, l'interconnexion de ces pores est un acteur majeur de la diffusion des fluides biologiques et est donc cruciale pour l'acheminement des protéines et des nutriments nécessaires à l'attraction et la survie cellulaire [219]. Il en découle la nécessité d'une importante porosité avec une interconnexion suffisante permettant la néoformation osseuse, à la fois à la surface du matériau mais aussi en son centre.

La microporosité semble jouer un rôle crucial dans l'adhésion, la différenciation des cellules souches et la prolifération des cellules ostéogéniques. Ces phénomènes pourraient provenir du fait que la microporosité permet, à la surface du matériau, l'adsorption et la concentration de protéines clefs de l'induction de l'ostéogenèse (par ex. : BMPs) [220-223].

Des études ont pu montrer le bénéfice de cette microporosité pour la formation osseuse *in vivo* par rapport à des revêtements phosphocalcique plus dense [224].

L'association HA et β -TCP fait que le BCP qui en résulte possède les qualités de ces deux éléments et explique le potentiel ostéoinducteur supérieur de celui-ci par rapport aux deux phases prises séparément. En jouant sur le ratio HA/ β -TCP, on peut moduler la vitesse de dégradation du BCP en fonction des besoins du site receveur. Cette biodégradation *in situ* est totale après quelques mois lorsque l'on utilise le β -TCP seul. C'est pour cela que le BCP qui est plus adaptable au niveau de ses caractéristiques physicochimiques est préféré à l'HA ou au β -TCP en tant que substitut osseux.

Si la composition du matériau est essentielle à sa bonne intégration au niveau du site lésé elle n'est pas sa seule variable. En effet, la taille, la forme de l'implant modifient ses propriétés biologiques. Habibovic *et coll.* a notamment pu démontrer que plus la taille de l'implant était grande plus il y avait d'os néoformé [225]. Ceci semble indiquer que la taille est importante pour l'ostéogénèse mais une retenue est faite quant à son réel impact sur la formation de quantité plus importante d'os. En effet, les détracteurs de cette hypothèse soulignent d'autres paramètres qui ont peu-être été éludés trop rapidement tels que la stabilité de l'implant et sa propension à concentrer plus de facteurs ostéogéniques. Ceci pourrait expliquer l'absence de formation osseuse par ostéoinduction lors de l'implantation de BCP seul au niveau de sites ectopiques chez le petit animal. En effet, l'implantation chez des animaux tels que les souris ou les rats est limitée par leur taille et fait qu'ils ne peuvent supporter de matériaux trop volumineux [226-229].

Caractéristiques biologiques

Les BCP sont amenés à subir conjointement des contraintes mécaniques, chimiques, mais également biologiques *in situ*. C'est pourquoi ces matériaux doivent présenter certaines caractéristiques pour la bonne réussite de la greffe à moyen et plus long terme. L'abondance d'études effectuées avec les BCP a permis de développer au cours des années des matériaux possédants des caractéristiques biologiques intéressantes très similaires à celles que procurent les greffes osseuses biologiques. Ces biomatériaux sont à la fois :

- ✓ **biocompatibles** car ils ne provoquent pas de réaction immunogène *in situ* et de ce fait, permettent une évolution normale des tissus adjacents.
- ✓ **bioactifs** car, de par leur composition, ils provoquent un phénomène de dissolution partielle ou de dégradation dans le milieu. Ceci permet la libération d'ions qui vont

finir par produire localement une saturation d'ions minéraux qui vont alors permettre la précipitation d'une apatite biologique à la surface du BCP. Ce phénomène de dissolution/précipitation est responsable d'une partie de l'adsorption des protéines et de la formation d'une couche d'apatite à l'origine de l'adhésion des cellules ostéoblastiques.

- ✓ **ostéoconducteurs** car ils permettent de guider la repousse osseuse à partir des berges du défaut [230]. Grâce à leurs propriétés physicochimiques, les BCP sont colonisés par les cellules de l'hôte qui vont y adhérer, proliférer et se différencier pour ainsi permettre l'apposition d'un nouveau tissu osseux. De nombreux types cellulaires peuvent être apportés par les fluides biologiques ainsi que la néovascularisation qui se met progressivement en place. Les cellules colonisatrices peuvent être des monocytes, des macrophages, des cellules géantes multinucléées, des ostéoclastes, des ostéoblastes, des ostéoprogéniteurs ainsi que des cellules souches (CSM, CSH) susceptibles de se différencier au contact du matériau. La coopération de toutes ces cellules va permettre d'engager l'ostéogenèse et la résorption du BCP à sa surface et à l'intérieur de ses macropores, et ce, dès le 7^{ème} jour suivant l'implantation. Les monocytes/macrophages et cellules géantes multinucléées résorbent le BCP tandis que les ostéoclastes résorbent l'os néoformé par les ostéoblastes en plus du BCP [218, 231-234]. Ces données suggèrent que la dissolution/résorption du BCP serait antérieure au phénomène d'adhésion et de différenciation des ostéoblastes précédant la formation osseuse [231, 235].
- ✓ **ostéoinducteurs** car le BCP permet via la différenciation des cellules de l'hôte la formation d'un tissu osseux au niveau d'un site ectopique (peau, muscle) [133, 236]. Il semblerait que cette propriété ostéoinductive soit liée à la microporosité de surface. Les macropores favorisent la diffusion des fluides et ainsi l'intrusion des cellules et de la vascularisation, quant aux micropores ils favorisent l'adsorption protéique. Des études récentes ont pu révéler que le phénomène de dissolution/précipitation à la surface des BCP était capable d'adsorber des protéines ostéogéniques telles que les BMPs ce qui favoriserait l'ostéoinduction [133, 237, 238]. Cependant, les BMPs ne sont pas les seuls facteurs entrant en compte pour qu'un matériau soit ostéoinducteur. Une autre possibilité pour expliquer l'ostéoinduction serait que la dissolution du BCP engendrerait la libération de particules qui pourraient être captées par les cellules environnantes (macrophages, cellules géantes, lymphocytes) et les activeraient. Ces cellules une fois activées libéreraient des médiateurs cellulaires (cytokines, protéines)

impliqués dans l'ostéogenèse et le remodelage osseux. Ces médiateurs libérés dans l'environnement pourraient donc attirer des cellules souches circulantes ou ostéoprogénitrices et induire leur différenciation en ostéoblastes. Cette cascade d'évènements ressemble étroitement au déroulement de la consolidation après fracture. En effet, les nombreux débris présents après une fracture sont dégradés en premier lieu par les macrophages, qui sont les cellules les plus abondantes lors de l'infiltration, et par les ostéoclastes [239-242]. Ensuite les macrophages phagocytent les particules et libèrent de nombreux médiateurs cellulaires qui vont recruter des cellules souches et les différencier [243-245] ainsi que favoriser l'angiogénèse [246, 247]. Ces cellules souches une fois différencierées vont se lancer dans la synthèse d'une matrice extracellulaire aboutissant à la formation d'un nouveau tissu osseux.

Les BCP de par leurs propriétés biologiques représentent donc un support de choix pour les cellules souches mésenchymateuses.

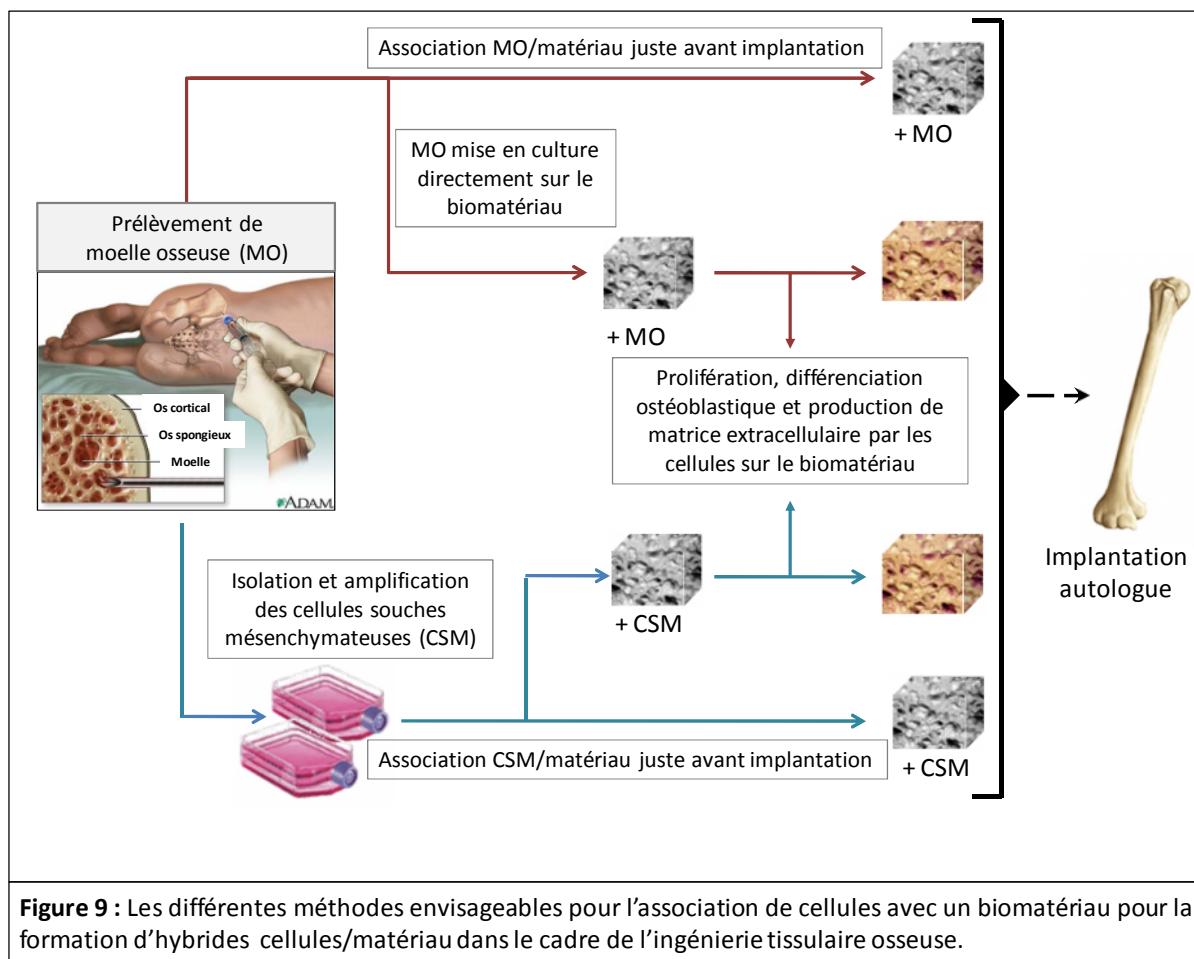
Les BCP comme support de cellules

Les BCP avec leur composition très proche de celle de l'os naturel offrent un support propice à la culture des cellules. Ces matrices synthétiques offrent un environnement idéal la prolifération et la différenciation. En effet, ce matériau prometteur est utilisé depuis de nombreuses années en association avec des cellules de moelle pour augmenter le potentiel régénératif des biocéramique en termes de temps et de volume [248]. Des études *in vitro* ont permis de comprendre certains mécanismes se produisant lors de cette association mais la meilleure façon d'évaluer le potentiel ostéogénique de ces matériaux hybrides demeure l'implantation *in vivo* ectopique et orthotopique. L'implantation ectopique de ces hybrides peut se faire en premier lieu chez le petit animal puis chez des animaux modèle d'intérêt clinique au niveau de défaut osseux critiques. De précédentes publications ont pu prouver l'efficacité du BCP en tant que support pour la moelle osseuse totale, les CSM et les ostéoblastes que ce soit *in vitro* ou *in vivo* [249-254]. Cependant, en fonction de la composition des BCP et notamment du ratio HA/β-TCP il semblerait que les effets sur les cellules soient différents. Plus spécifiquement, des travaux semblent montrer un potentiel ostéogénique plus important pour les BCP présentant un ratio de respectivement 20 et 80 % de HA et de β-TCP [255].

Les méthodes d'association cellules/BCP

Différentes stratégies ont été développées au cours des années afin de trouver la meilleure méthode d'association entre la matrice (BCP) et les cellules. L'ensemencement des cellules sur la matrice de BCP peut être envisagé de 4 manières différentes (figure 9) :

- ✓ une association extemporanée du biomatériau avec de la moelle osseuse autologue totale (celle-ci pouvant être concentrée ou non) suivie de l'implantation immédiate *in situ*.
- ✓ une période de culture *in vitro* de la moelle osseuse au contact du biomatériau avant d'effectuer l'implantation *in situ*.
- ✓ une période de culture *in vitro* de la moelle osseuse sur plastique afin de sélectionner et d'amplifier les CSM contenues dans la moelle avant une association extemporanée avec le biomatériau puis implantation *in situ*.
- ✓ une période de culture *in vitro* de la moelle osseuse pour isoler et amplifier les CSM qui vont être par la suite cultivées un certain temps au contact du biomatériau afin de former un hybride « préosseux » avant l'implantation *in situ*.



L'atout de la première possibilité est de pouvoir se dérouler rapidement en peropératoire, toutes les étapes étant simples à réaliser au sein du bloc opératoire et ne nécessitant aucun équipement lourd particulier. Cependant, elle présente une limite importante qui est l'obtention d'une très faible quantité de cellules ostéocompétentes dans la moelle ponctionnée et donc au niveau du greffon. Malgré tout, quelques résultats précliniques ont permis d'apporter les preuves de l'efficacité de cette technique [256]. La concentration de la moelle permet de multiplier par 5 à 10 fois le nombre de cellules mononucléées mais ceci nécessite un équipement particulier et parfois la sortie du bloc opératoire sans pour autant apporter un nombre de CSM notablement supérieur compte tenu de leur faible nombre de départ dans la moelle osseuse.

Afin d'augmenter plus significativement le nombre de cellules, les deuxième et troisième méthodes se sont basées sur la culture de moelle, qu'elle se fasse directement sur le biomatériau ou sur plastique. La deuxième méthode ne permet pas d'isoler rapidement les CSM de la moelle mais elle a l'avantage d'apporter de nombreux éléments nutritifs et facteurs de croissance contenus dans la moelle et susceptibles d'être adsorbés par la matrice. Un désavantage de cette technique est le faible taux de cellules qui vont adhérer sur la matrice pour ensuite la coloniser. En conséquence, une colonisation homogène à la fois à la surface mais aussi à l'intérieur des pores du biomatériau nécessite un temps considérable. La méthode consistant à cultiver la moelle sur du plastique spécialement traitée pour la culture cellulaire permet une meilleure adhésion des cellules et une sélection des CSM par lavage des cellules non adhérentes. C'est cette méthode que nous avons choisi d'employer lors de la première étude que nous décrirons dans le chapitre 3 de ce manuscrit. En fonction du nombre de jours de culture et de passages effectués, le nombre de cellules pourra être important. Cette méthode permet de s'affranchir du biais apporté par la nature aléatoire du nombre de cellules dans un prélèvement et permet d'ensemencer des CSM de façon homogène. Cependant l'adhésion de ces cellules au biomatériau, sera étroitement liée au temps de contact lors de l'association en peropératoire. Pour des périodes de culture courtes (2-3 jours) il n'est pas nécessaire d'ajouter du milieu de culture contenant du sérum de veau. Cependant, l'obtention d'un nombre conséquent de cellules nécessite que celles-ci prolifèrent et donc une période de culture beaucoup plus longue (10-15 jours). Il est donc indispensable lors de cette période d'apporter les éléments nécessaires à leur survie en rafraîchissant le milieu de culture avec un milieu supplémenté en sérum de veau. Ce sérum étant lié à des risques de transmission virale ou des réactions immunitaires, il est possible de le substituer par le sérum autologue du

patient [257] ou par un milieu dépourvu en sérum [198]. Ceci est également vrai en ce qui concerne la quatrième étape qui nécessite elle aussi des temps de culture assez longs.

La dernière méthode est basée sur une culture cellulaire *in vitro* en deux temps. La première étape sur plastique permet la sélection et l'amplification des CSM se trouvant dans la moelle osseuse. La deuxième étape de culture des CSM sur le biomatériau permet une bonne colonisation de celui-ci et la synthèse de matrice formant un hybride « préosseux ». C'est cette méthode que nous avons utilisée pour la plupart des travaux réalisés durant cette thèse et qui sera plus amplement détaillée dans les chapitres 4 et 5. En effet, cette méthode permet l'obtention d'une grande quantité de CSM et permet, contrairement à l'utilisation de moelle totale, de contrôler le nombre de cellules ensemencées sur le biomatériau. Elle laisse également le choix de pouvoir différencier les cellules par l'ajout de facteurs ostéogéniques à la fois lors de la première étape mais également lors de la seconde. Enfin, la formation d'une matrice extracellulaire après plusieurs jours de culture permet de produire un environnement plus propice pour les cellules implantées et plus compatible avec le site d'implantation. Plusieurs études basées sur l'utilisation de cette méthode ont pu relater son efficacité [200, 258-261].

Les limites actuelles de l'ingénierie tissulaire osseuse

Malgré de bons résultats obtenus au cours des abondantes expériences menées *in vitro* et *in vivo*, l'ingénierie tissulaire osseuse se heurte à d'importantes limites pour entrer en thérapeutique clinique. L'une de ces limites concerne l'obtention d'un nombre suffisant de cellules ostéocompétentes au niveau du biomatériau pour que la greffe soit suffisamment efficace. Les CSM au sein de la moelle étant présentes dans des proportions infimes, il est donc essentiel de pouvoir les isoler et les amplifier dans de bonnes conditions afin de maintenir leur potentiel ostéogénique. Cela inclut une amplification rapide et efficace pour que ces cellules conservent leur multipotence mais également afin d'obtenir un greffon dans les plus brefs délais dans le but d'intervenir rapidement chez le patient. Une autre limite concerne les propriétés biologiques de ces cellules et le patient lui-même. En effet, le prélèvement, le génotype, l'âge du patient et le nombre de passages influent sur les cellules et peuvent diminuer leur potentiel de prolifération et de différenciation [144, 262, 263].

Au-delà de l'amplification des CSM, l'adhésion, la prolifération et enfin la différenciation sont des étapes critiques pour l'aboutissement de l'ITO. La matrice doit permettre l'adhésion

cellulaire de façon efficace, que l'association soit faite extemporanément ou au cours d'une culture *in vitro*. Cette capacité à permettre l'adhésion est également cruciale *in vivo* pour que les cellules de l'hôte colonisent le greffon et qu'il soit parfaitement intégré. Liés au nombre de cellules, des facteurs souvent éludés sont les interactions cellulaires entre elles et avec la matrice extracellulaire. Ces interactions sont dépendantes de l'homogénéité de la distribution cellulaire et vont être très importantes à la fois pour la prolifération mais également pour la différenciation cellulaire. Il a été démontré que la culture *in vitro* classique ne permettait pas une colonisation uniforme sur des biomatériaux macroporeux car elle ne facilite pas les échanges en nutriments et en oxygène au cœur du biomatériaux [264-270]. Une possibilité pour résoudre ce problème serait de cultiver les cellules dans un système permettant la circulation du milieu de culture au sein même de la matrice. Cette méthode de culture dite dynamique a fait l'objet de plusieurs investigations et semble être bénéfique pour la prolifération et la différenciation cellulaire [201, 271-275]. Des études réalisées par Braccini et son équipe ont mis en évidence que la perfusion du milieu de culture maintenait les caractéristiques clonogénique des CSM cultivées sur une matrice pendant la période d'expansion et permettait de s'affranchir de la culture statique. Ils ont également montré une relation existante entre le nombre de CSM clonogénique et l'ostéogenèse *in vivo* [276, 277]. Ces résultats semblent indiquer qu'il est important de disposer de CSM clonogéniques, c'est-à-dire capables de proliférer et de former des colonies indiquant le rôle crucial de la prolifération pour la formation osseuse *in vivo* et sans doute l'importance des interactions cellules/cellules qui en découlent.

Les résultats encourageants obtenus *in vitro* puis *in vivo* avec divers modèles animaux précliniques ont mené à des essais cliniques chez l'homme. Cependant, aucun succès réellement convaincant n'est apparu si l'on s'en réfère à la formation osseuse et la reproductibilité des essais cliniques [278-282]. Ces études prouvent la difficulté que rencontre actuellement l'ITO pour obtenir une technique reproductible avec des modèles *in vivo* prédictifs et transposables à l'homme. Malgré tout, les modèles animaux restent indispensables et sont une preuve de concept indéniable de l'efficacité ou non d'une méthode. L'optimisation de paramètres incluant la pureté, la densité, la différenciation cellulaire, la survie cellulaire postimplantatoire ainsi que les propriétés physicochimiques des matériaux est indispensable pour faire avancer l'ITO vers la prochaine étape que représente l'application clinique humaine.

Les nouvelles approches de l'ingénierie tissulaire osseuse

Les raisons pour lesquelles les CSM associées à des biomatériaux ont des difficultés à produire de l'os au niveau d'un défaut osseux humain restent floues. Une cause possible réside dans l'environnement procuré aux cellules implantées est distant de leur environnement naturel. *In vivo*, les cellules sont encastrées dans un microenvironnement tridimensionnel complexe qui leur procure un support mécanique, des sites d'adhésion et des signaux biologiques contrôlant l'expression génique et protéique. A contrario, bien que des équipes aient tenté de mimer cet environnement 3D, la variété de matériaux produits à partir de polymères ou de céramiques demeure, comme le plastique de culture, une surface 2D à l'échelle cellulaire. Les hydrogels quant à eux, permettent de reproduire cet environnement 3D au niveau cellulaire mais souffrent d'un manque de signaux pouvant interagir avec les cellules et ils ne possèdent pas de résistance mécanique adaptée à l'ingénierie osseuse. Une autre explication provient du fait que les chercheurs se sont focalisés sur la fabrication de matrice ressemblant à l'os mature. En effet, cette démarche est plus orientée vers la fabrication d'un produit fini plutôt que vers la volonté de reproduire la formation et la réparation osseuse survenant naturellement *in vivo*. Ainsi, les céramiques servent d'abondante matrice synthétique pour la culture de CSM ou d'ostéoblastes, à l'inverse de la nature qui synthétise de l'os par forte densité cellulaire et très peu de matrice durant l'embryogenèse ou la réparation osseuse. Tout au long de ces étapes, l'organisme va faire proliférer puis différencier les cellules souches pour aboutir à la formation d'un tissu 3D approprié. L'ITO pourrait bénéficier de l'utilisation d'une approche semblable. En d'autres termes, comprendre la complexité des interactions cellules/cellules survenant dans la formation osseuse et ainsi mimer le processus d'ostéogenèse avec de nombreuses cellules et une faible matrice les supportant pourrait être une voie intéressante pour amener les cellules à proliférer, synthétiser leur propre matrice et se différencier en un tissu osseux bien ordonné.

BCP et culture tridimensionnelle

Les matrices macroporeuses de BCP représentant une structure plane (tout au mieux courbe) à l'échelle de la cellule, de nouvelles matrices ont été développées afin de fournir aux cellules un environnement 3D plus naturel. Pour cela, en lieu et place des matériaux macroporeux de taille millimétrique, de petites particules micrométriques ont été utilisées. L'utilisation de petites particules, de formes ovoïdes et denses permet l'obtention d'une porosité inversée au regard de la cellule. En effet, contrairement aux BCP macroporeux qui

possèdent une porosité interne, les particules de BCP offrent une porosité externe avec un plus large degré de liberté pour la colonisation cellulaire autour de particules non liées entre elles. En particulier, l'orientation des surfaces sur lesquelles les cellules peuvent se fixer est plus variée que dans le cadre d'une porosité interne. Ce grand degré de liberté permet une excellente prolifération des cellules, une très forte interaction entre elles et s'ensuit la formation d'une abondante MEC synthétisée par ces cellules [283, 284]. Cette MEC permet la formation en quelques jours d'un hybride cellules/BCP solide et malléable. Ce microenvironnement 3D synthétisé par les cellules est composé principalement de collagène de type 1 et semble induire une différenciation ostéoblastique spontanée sans ajout de facteurs ostéogéniques externes. Cette caractéristique spécifiquement liée au microenvironnement est étudiée plus en détail dans le chapitre 5 de cette thèse.

Revue : Biomimetic Materials and Approaches for Bone Tissue Engineering – State of the Art and Future Trends

La revue que nous avons écrite est basée sur la description des différents matériaux et approches biomimétiques utilisés dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse. Cette revue a permis de présenter les différents matériaux avec leurs points forts et leurs points faibles. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les matériaux les plus utilisés actuellement, à savoir les hydrogels, les polymères et les céramiques phosphocalciques. La dernière partie de cette revue expose les différents paramètres qu'il faut étudier pour faire progresser l'ingénierie osseuse actuelle et les techniques innovantes en cours de développement qui pourraient être l'avenir de l'ITO.

Bone Tissue Engineering using Biomimetic Materials and Approaches – State of the Art and Future Trends

Thomas Cordonnier^{1,2}, Jérôme Sohier¹, Philippe Rosset^{2,3}, Pierre Layrolle^{1,*}

¹Inserm, U957, Laboratory for Bone Resorption Physiopathology and Primary Bone Tumors Therapy, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

²EA3855, Laboratory of Hematopoiesis, François Rabelais University, Tours, France

³ Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital, François Rabelais University, Tours, France.

* corresponding author: Prof. Pierre Layrolle, PhD, Inserm U957, Faculty of Medicine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France. E-mail: pierre.layrolle@inserm.fr, Tel: +33 2 72 64 11 43

Submitted to Advanced biomaterials

03-Sept-2010

Abstract

Bone tissue engineering is extremely promising for regenerating large bone defects in orthopedic or maxillofacial surgery. It consists of harvesting, culturing and differentiating human mesenchymal stem cells in combination with scaffolds. Different cell sources, such as bone marrow or adipose tissue, have been studied. Biomaterials resembling bone extracellular matrix have been used for scaffolding cells. However, these macroporous calcium phosphate ceramics or biodegradable polymers are two dimensional structures at the cellular level and have low osteogenesis properties *in vivo*. In this paper, several biomimetic approaches involving hydrogels or particles for 3-dimensional cell cultures are reviewed. High numbers of cells for low amounts of material induced abundant extracellular matrix formation *in vitro* and relatively large amounts of bone tissue formation *in vivo*. In addition, the 3D culture of several cell populations should make it easier for bone tissue constructs to vascularize, thus lifting the limits of current clinical applications.

Keywords

Bone tissue engineering, biomimetic scaffolds, mesenchymal stem cells, macroporous biphasic calcium phosphate, biodegradable polymers, hydrogels, 3-dimensional culture.

Introduction

As the population ages, surgeons are finding it increasingly difficult to successfully treat certain bone diseases and complications such as osteosarcoma (1) and osteoporosis (2,3). Similarly, large bone tissue defects resulting from non-healing trauma fractures, revisions of orthopedic prostheses, osteonecrosis of the femoral head, spine fusion, and maxillofacial and dental reconstructions are not currently treated with a perfect success rate (4-6). In order to manage these clinical indications, surgeons use autologous bone grafts as a preference. Bone autografts contain the patient's own bone-growing cells and proteins, which provide a framework for new bone to grow into. Most often, surgeons slice the harvested bone into small chips to fill the defect volume. Today, this gold standard technique has satisfying clinical results. However, it adds another surgical site (e.g. the iliac crest), often resulting in additional pain and complications, as well as being limited in quantity (about 20 cm³). Another standard technique is used for repairing critical-sized bone defects. This technique, first described by Taylor *et al.* (7) in 1975, is based on free vascularized fibular grafting. Nowadays, it is a standard salvage procedure for reconstructing a segmental defect after bone tumor resection (8,9) or congenital pseudarthrosis (10,11). This vascularized grafting procedure attempts to counteract the negative effect of bone necrosis due to the absence of neo-vascularization at an early stage in a massive autograft. Nevertheless, this technique requires extended anesthesia, particular technical skills for the surgeons, the sacrifice of blood vessels and donor site morbidity. Allogenic bone grafts, such as demineralized bone matrix from tissue banks, may be the solution for these hurdles, but carry the risk of immunological rejection or disease transfer (12).

As both autografts and allografts have drawbacks, scientists have long searched for materials that could be used in place of transplanted bone (13-15). Although most synthetic bone substitutes possess some of the positive properties of autografts, none yet have all the benefits of the patient's own bone. For instance, calcium phosphate bioceramics do not, on their own, have sufficient osteogenic properties to allow the bone to reconstruct over large defects (16). Given these limitations and the increasing number of bone grafting procedures, surgeons are looking for more advanced therapies such as tissue engineering (17-19). Tissue engineering combines mesenchymal stem cells (MSC), synthetic scaffolds and molecular signals (growth or differentiation factors) in order to form hybrid constructs. In a classical approach, bone tissue engineering consists of harvesting bone marrow from a patient, amplifying those cells by *in vitro* culture to a sufficient number and then seeding them on to a suitable synthetic

scaffold prior to implantation into the same patient (17,20). The principle of bone tissue engineering is shown in Figure 1. Despite the promises, there are a limited number of clinical studies, involving few patients, which have used the bone tissue engineering approach (21-24). In these studies, porous calcium phosphate ceramics were used as scaffolds for the MSCs. Autologous human MSCs were seeded and cultured on to porous calcium phosphate ceramics in osteogenic media (dexamethasone, ascorbic acid, β -glycerophosphate). Then, the hybrid materials were implanted in long bone or jaw defects. However, the clinical outcomes were inconsistent, with low efficacy in bone regeneration (4). The reasons behind this limited clinical success may be the fact that scientists have developed materials that resemble mature bone tissue but that do not mimic its formation or the healing that occurs naturally in the body. There is therefore a need to explore new biomimetic approaches in bone tissue engineering. After providing some insight into bone tissue in general, this paper reviews biomimetic materials and approaches that could be successfully applied to clinical situations as a means of regenerating large bone defects.

1) The model: bone tissue

Bone is an active and highly vascularized tissue which is able to heal and remodel itself considerably (25). The main roles of bone are to provide support for the body, serve as a mineral reservoir, support muscular contractions and protect the internal organs (25,26). The skeleton is composed of long bones (femur, tibia), short bones (wrist, ankle) and flat bones (skull vault, irregular bones). Two architectural forms can be found: trabecular, or spongy, bone (about 20% of all bone) and cortical, or compact, bone (80 %). Cortical bone has low porosity (5 to 10 %) (27) which provides it with greater solidity - about 20 times - than the tensile strength of trabecular bone which has porosity of 50 to 90 % (28,29). Trabecular bone is commonly found in the metaphysis of long bones and in the vertebral bodies. Another important function of bone tissue is to host the marrow, mainly in the flat or trabecular epiphysis of long bones. Bone marrow contains a high proportion of mesenchymal and hematopoietic stem cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that contribute to the formation and healing of connective tissues including cartilage, bone, muscles, skin, etc. Hematopoietic stem cells (HSC) are precursors of the blood cell lineages such as monocytes, lymphocytes, and osteoclast cells that resorb the bone tissue matrix. The number of MSCs in bone marrow is usually comprised between 10,000 to 100,000 cells per million nucleated cells, mainly depending on the age of the patient. In summary, bone is a remarkably strong and flexible tissue that remodels itself perpetually. These properties are

provided by the activity and interaction of three cell types originating from the bone marrow reservoir: osteoblasts (bone formation), osteocytes (calcification, calcium homeostasis) and osteoclasts (bone resorption) (30-32). The cooperation of these multiple cells is essential for bone health as it makes possible the constant fabrication and degradation of this complex tissue. The balance between bone formation and resorption is controlled by signalling molecules and biomechanical forces. Quantitatively, cells do not represent a high volume percentage of bone tissue, which is mainly composed of a mineral phase (hydroxyapatite-like calcium phosphate) representing 65-70% of the matrix and an organic phase (collagen, glycoproteins, proteoglycans, sialoproteins, bone “gla” proteins) which comprises the remaining 25-30% of the total matrix (25). Unlike mature bone, osteogenesis is characterized by relatively high cell content with numerous osteoprogenitors, whereas the extracellular matrix is low at the early stage of bone tissue formation. Similarly, bone healing after a fracture event mobilizes a high number of cells (including progenitor cells) and growth factors, as well as the initiation of an inflammatory response.

2) Sources of stem cells for bone tissue engineering

For bone tissue engineering, MSCs are the most abundant progenitor cells used in association with biomaterials. These stem cells are present notably in bone marrow but in a limited quantity and need to be isolated and amplified. MSCs were isolated from bone marrow for the first time by Friedenstein *et al.* in 1976 and, since then, have been considered as the progenitor cells of skeletal tissues (33). MSCs are clonogenic (self-renewing) and multipotential cells that are capable of differentiating into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, tenocytes, myoblasts, etc. Adult stem cells are responsible for tissue maintenance, regeneration and repair. MSCs can be isolated from a small volume of bone marrow and then expanded into large numbers thanks to their high capacity for proliferation. They also maintain their functionality after culture expansion and cryopreservation (34). When MSCs are seeded or cultured on to a porous bioceramic scaffold, the resulting hybrid constructs form mineralized bone tissue with a hematopoiesis-supportive stroma after subcutaneous implantation in immunocompromised mice for 4-8 weeks (35). As a result, bone marrow is thought to be a readily available and abundant source of MSCs for bone tissue engineering and regenerative medicine applications.

Alternatively, recent studies have shown that liposuction aspirates contain pluripotent adipose tissue-derived stem cells (ATSC) that can differentiate into various mesodermal cell types, including osteoblasts, myoblasts, chondroblasts, and preadipocytes (36,37). The ease of

harvesting these cells for clinical applications is attractive for researchers. However, there are few data regarding the osteogenic potential of ATSC *in vivo* (38). Further investigations must be carried out to evaluate the potential of these cells for bone tissue engineering.

Other recent advances in stem cells have shown that it is possible to reset the fate of cells through epigenetic reprogramming. Several research teams have confirmed that cells are capable of regaining a pluripotent phenotype. Retroviral induction of 4 transcription factors (Oct-4, Sox-2, c-Myc, Klf-4) in fibroblasts was effectively able to reprogram them into pluripotent cells called induced pluripotent stem cells (iPS) (39-41). However, despite this interesting approach, several problems remain. Reprogramming efficiency must be improved and, especially when it comes to human applications, the use of retroviruses must be substituted and tumor formation has commonly been observed after implantation in immunodeficient mice. With regard to bone tissue engineering, the capacity of these iPS to generate mature osteoblastic cells that ultimately form new bone *in vivo* has yet to be determined.

The use of progenitor cells that are able to differentiate into several types of tissue is an interesting approach which makes it possible to mimic natural bone development. For instance, during bone development or bone healing, several growth factors are released by the organism. These different growth factors (e.g. BMPs) are responsible for committing mesenchymal stem cells to an osteoblastic lineage. For a biomimetic approach, progenitor cells must be cultured in the presence of these factors. These factors can be directly supplemented in the culture medium or released by a scaffold. A large number of studies have focused on a single growth factor approach with a supra-physiological dose added to the medium. However, several growth factors are released locally at different times and doses during the tissue healing process (42-44). In addition, exogenous administration of the potent factors involved in osteogenesis, such as BMPs, may be associated with problems such as heterotopic bone formation. In this context, using scaffolds capable of controlled growth factor release could be a pertinent approach that mimics natural events.

3) Biomimetic scaffold materials

With the progress made in the understanding of the osteoblastic differentiation of progenitor cells, biology has created a number of possibilities for engineering new scaffolds. The ideal scaffold should be a carrier for cells and growth factors, and should also induce bone formation with surrounding tissue after implantation. In addition, the hybrid construct should

have sufficient initial mechanical properties for load-bearing applications, be degradable in synchronicity with new bone formation and have degradation products that are biocompatible. As a result, such a perfect biomaterial has not yet been produced and remains an ideal still plagued with difficulties. Given this, scientists have attempted to mimic the chemical and physical structure of mature bone intensively. The basis is that the scaffold should have a specific structure with interconnected pores measuring 100 to 500 μm in diameter so as to favor body fluid permeability, cell colonization, neo-vascularization and bone tissue formation (45-47). Nevertheless, achieving high porosity and permeability as well as sufficient mechanical strength and a pace of degradation compatible with neo-tissue formation for synthetic scaffolds remains a challenge. Depending on the clinical targets, different biomaterials such as calcium phosphate (CaP) ceramics, bioresorbable polymers or functionalized hydrogels can be used to hold cells and regenerate bone.

a) Bioceramic scaffolds

Bioceramics such as hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (TCP) or biphasic calcium phosphate (BCP, a mixture of HA and TCP) resemble the mineral phase of bone in terms of their composition. Since the 70s, these materials have been widely used in clinical practice for bone substitution and regeneration (48) because of their biocompatibility (49), ability to bind proteins and cells strongly (50,51) and to conduct bone ingrowth (16,49). Various shapes can be achieved and manufacturers have attempted to mimic the structure of trabecular bone using porous bioceramics (Figure 2a). Ceramics are very similar to the inorganic component of natural bone, which accounts for their biocompatibility. In addition, the composition and microstructure of bioceramics leads to the dissolution and reprecipitation of biological apatite on their surface following implantation. This mechanism, known as bioactivity, encourages both osteoprogenitor cells to attach and bone extracellular matrix to be produced on the surface of the bioceramics, as shown in Figure 2b. As a result, bioceramics are osteoconductive and can guide bone tissue ingrowth through their porosity. Pore interconnection is thus of primary importance for providing large surface areas for cell colonization and allowing blood vessels and bone growth to develop within the scaffold. Many studies have shown the favorable properties of porous HA for cell adhesion and osteoblastic commitment in contrast to non-porous HA (52,53). This benefit has been attributed to pore size, distribution and surface chemical properties and microstructures (54,55). For instance, a porosity of 200 μm seemed to show a greater MSC osteoblastic differentiation than a 500 μm porous HA scaffold (56). This phenomenon may be due to the

lack of cell confluence and cell-cell interactions resulting in wider pores for the cells to colonize. In the same vein, cells do not easily reach confluence over an entire macroporous scaffold *in vitro* due to non uniform seeding and poor interconnected porosity. These drawbacks may explain why ectopic bone formation is limited to the outer pores in hybrid constructs, as shown in Figures 2c and 2d.

Other studies have shown that progenitor cells seeded on to ceramic scaffolds are able to differentiate into an osteoblastic lineage without osteogenic factors (57,58). This phenomenon could be due to the chemical groups present at the surface of the biomaterials, which may induce osteogenesis. Particularly, it has been shown that the chemical groups –NH₂ and –SH were able to induce osteoblastic differentiation (59,60). Although the importance of surface chemical properties is now known, the mechanism of action remains unclear. A specific surface may induce defined protein adsorption leading to an associated commitment of progenitor cells (61,62). As an example, osteocalcin and bone sialoprotein are able to bind calcium and phosphate, which induce or improve mineralization (63-66). Li *et al.* have indicated that microstructured calcium phosphate materials might concentrate more proteins (including bone-inducing proteins) thanks to an increased surface area, therefore inducing osteoprogenitor cells into osteogenic cells (67). Furthermore, the microporosity of the bioceramic may help nucleation for biological apatite precipitation. However, another study has demonstrated that HA sintered at the same temperature as BCP had a higher surface area but induced less bone than BCP, which could indicate that the TCP phase had an effect on bone induction (68). This was further suggested in a recent *in vitro* study on 2D TCP discs that demonstrated a slight increase in gene expression for certain osteoblastic markers over time (69). Osteoblastic induction of progenitor cells through these TCP discs could be because they dissolve quickly and release rapidly the calcium and phosphorus ions (70,71) involved in osteoblastic proliferation and matrix mineralization (48,72,73). This release associated with microporosity could help the CaP dissolution-reprecipitation process on the scaffold surface and could be coupled with coprecipitation of relevant proteins such as BMPs (74,75), as well as encouraging the recruitment of osteoprogenitor cells (68).

In spite of numerous advantages, the regenerative properties of bioceramics remain insufficient for the reconstruction of large bone defects. Furthermore, bioceramics are poorly degraded after implantation by dissolution or cell activity and not ultimately substituted by bone tissue. HA is known to be barely resorbable, although TCP degrades faster. In order to further modulate degradation and dissolution rates, TCP can be combined with HA in various ratios to form BCP. Nevertheless, these BCP ceramics still remain in the body for several

months, while bone healing takes only a few weeks. In a truly biomimetic approach, the bioceramic scaffolds should degrade commensurately with bone formation or be remodeled by osteoclastic activity. Moreover, a great challenge for bone tissue engineering remains the ability for a bioactive scaffold to control chemical and physical properties at a length level from microns to centimeters and at a time level from seconds to weeks (degradation and factor release).

b) Biodegradable polymer scaffolds

Unlike synthetic ceramics, biodegradable polymers do not reproduce the mineral component of bone structurally. However, the use of polymers as support for bone formation has been driven by their considerable versatility with regard to composition and associated biodegradability as well as their ability to incorporate and release signaling molecules. Of the variety of polymers used in bone tissue engineering, most attention has focused on poly(α -hydroxy) esters such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA) and their copolymer poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) (76-78). Their main advantage lies in major biocompatibility, inducing only very mild inflammation. Furthermore, their bulk degradation, produced either by hydrolysis and/or enzymatic digestion, can be precisely tailored to between 1 month and 5 years, and the degradation products are part of the metabolic pathways. This latter point theoretically makes it possible to match bone formation with the natural removal of the polymer. Another significant advantage of poly(α -hydroxy) esters is their ability to serve as delivery systems for the biological cues involved in bone formation processes. In particular, members of the BMP family have often been associated with PLGA scaffolds (79,80) to improve bone tissue neo-formation. By carefully selecting the dose and release profile of the growth factor, the natural mechanisms and metabolic pathways involved in bone formation and healing can be mimicked (81). The possibility of incorporating vascular growth factors such as VEGF into polymer scaffolds is also a strategy for promoting capillary blood vessel formation within the bone defect (82,83). Other types of polymers that are of interest are polyanhydride (84,85) and poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) copolymers (86,87). Like poly(α -hydroxy) esters, they have very good biocompatibility, controlled biodegradability, and provide the possibility of tailoring the release of specific growth factors.

As the polymers are relatively easy to formulate, it has been possible to develop various types of architecture, with the aim of offering the best environment for cell proliferation, vascular

ingrowth and new bone formation. Reproducing trabecular bone structure with regard to elevated porosity and permeability has always been the aim of researchers. However, many manufacturing techniques such as solvent casting and particulate leaching (88), gas foaming (89,90) or phase separation (91-94) result in sponge-like structures with poor interconnectivity. These anisotropic scaffolds were nevertheless shown to be useful for ectopic (85,86) or orthotopic bone formation (95-97). Polymer scaffolds with high porosity have space for cell infiltration and extracellular matrix (ECM) formation (98). When high permeability is achieved, nutrient influx and waste or degradation product removal is made easier. Polymer scaffolds meeting these criteria have recently been prepared by means of rapid prototyping techniques (99). This approach makes it possible to shape a bone defect both macroscopically and reliably, while finely controlling scaffold porosity and permeability. A good example of such manufacturing systems is 3D printing based on solid free-form fabrication (Figure 3a), which produces highly porous and permeable isotropic structures through the successive deposition of polymeric fibers (100,101).

However, at the cell level, polymers with sponge-like or 3D printed structures represent a 2-dimensional environment. The natural interactions between cells and ECM are effectively not present in scaffolds with intrinsic dimensions of several hundred microns. As previously described, bone ECM is composed of a 3-dimensional network of mineralized collagen fibers with diameters of around 300 nm (102). Mimicking this fibrillar structure using nanometer-sized polymer fibers may provide osteoprogenitor cells with a familiar environment for bone tissue formation. These biomimetic nanometer-sized polymer fibers may be used as a template for the proliferation of cells and the production of a new ECM prior to mineralization and remodeling into bone tissue. Such polymer fibers have been prepared by electrospinning. This technique applies a very strong electric field to a polymer solution, dispensed by a fine needle. The resulting fine polymer thread is collected as a non woven structure of entangled nanofibers (Figure 3b). To reproduce the natural mineralization of collagen fibers, the nanofibers can be associated with ceramic particles (103,104) or covered with a calcium phosphate layer (105,106). *In vitro* results have demonstrated the advantages of such structures for bone engineering. For instance, hMSCs seeded on to nanofibrillar scaffolds can proliferate while retaining their osteoblastic differentiation potential (107). However, the cell permeability of electrospun polymer nanofibers is limited to the outer surface and there are only a few studies that report *in vivo* bone formation in the literature (108-111).

Another avenue for research is improving cell adhesion on polymers. The methodology involves grafting RGD sequences known as cell binding sites into natural fibrin and collagen matrices. Radio frequency plasma treatments have also been used to improve protein adsorption and thus promote the adhesion of cells on to polymer-treated surfaces.

c) Hydrogel scaffolds

Instead of mimicking mature bone architecture or collagen fibers, tissue engineering research has recently attempted to create artificial extracellular matrices that reproduce the native cell micro-environment encountered in the early stages of tissue development. Hydrogels used for mammalian cell cultures range from purely natural (e.g. collagen, fibrin, hyaluronic acid) to purely synthetic (e.g. poly(ethylene glycol)) sources. Hydrogels are attractive materials for tissue engineering because they can homogeneously suspend cells while allowing rapid diffusion of nutrients and metabolites. Furthermore, hydrogels provide a 3D environment with high water content (80-99%) causing little irritation during degradation. Ideally, the hydrogel should form a temporary mechanical support for the cells and degradation should keep pace with ECM production. Their viscoelastic properties render them suitable for cartilage regeneration and evaluations for bone tissue engineering have been conducted (112-114). However, hydrogels have weak mechanical properties which limit them to non-weight bearing sites. To improve the mechanical properties of these kinds of material, composites that combine the toughness of the polymer phase with the compressive strength of an inorganic phase have been produced (115-117). However, in spite of promising results, the mechanical properties of current composites are still less than those of natural bone tissue. Hydrogels based on extracellular matrix components (e.g. collagen, hyaluronic acid, fibrin) provide an interactive substrate for the cells because they can adhere, migrate, proliferate and even degrade the hydrogel through enzymatic activity. However, there are potentially risks in using natural hydrogels from allogenic (human) or xenogenic (animal tissue) sources, in particular, immunogenic reactions or disease transmission. Furthermore, the composition, mechanical properties and degradation rates of natural hydrogels are difficult to control. Polysaccharides such as agarose, alginate, hyaluronic acid, chitosan and hydroxylpropylmethyl cellulose are also interesting candidates for cell encapsulation. However, the level of interaction that they offer cells is often limited by the lack of cell adhesion sites and cell-controlled degradation. Overall, these hydrogels exhibit only a limited number of features of the natural ECM and their properties could be improved by introducing

cell binding, degradation sites or growth factors to their structure. Nevertheless, chemical modifications to hydrogels are limited by their insolubility in organic solvents.

A few years ago, Hubbell *et coll.* grafted chemical moieties to polyethylene glycol polymers (118). They demonstrated the ability of these hydrogels to be modified in order to possess cell adhesion sites, viscoelastic properties and cell-controlled degradability. In order to improve and control degradability *in vivo*, enzyme specific degradation sites were integrated into the polymer's backbone (119). These sites controlled the overall degradation rate of the hydrogels while allowing cell migration and new ECM deposition. Stupp *et coll.* designed biomimetic peptides that self-assembled into supramolecular structures under physiological conditions (120,121). Hydrogels formed by cross-linking hydrophilic polymer chains have also been developed as three-dimensional cell culture environments. These hydrogels cross-link into 3D networks in response to changes in temperature, pH, ionic environment, or via chemical moieties, enzymatic reaction or UV light (122-125). The ability to control the synthesis of hydrogels is attractive for building complex 3D structures that mimic those of tissues. For instance, Ladet *et al.* have recently reported the design and manufacture of multilayered polysaccharide-based hydrogels with highly controlled physical properties (126). Injectable bone fillers using silanized-cellulose hydrogels combined with solid calcium phosphate particles that gel *in situ* at physiological pH have also been developed (127,128). These pH-sensitive cross-linking hydrogels may be used as artificial extracellular matrix for culturing various cell types (129,130). However, the overall absence of cell binding sites in most synthetic hydrogels limits their applications in bone tissue engineering (131).

4) Bone tissue engineering

a) Current approach

As mentioned above, bone tissue engineering is an interdisciplinary field that attempts to create biological hybrid constructs composed of cells and scaffolds for bone repair. In this approach, one of the most important elements is the ability to evaluate and predict the capacity of the constructs to form and heal bone. In order to assess this bone-forming capacity, the constructs are usually implanted in ectopic (e.g. subcutis, intra muscular) sites of immunocompromised animals such as nude mice and rats. Thereafter, these constructs are implanted in critical-sized bone defects in large animals to demonstrate efficacy prior to being considered in clinical trials.

Different methods have been used to associate cells and scaffolds for bone tissue engineering. A first approach consisted of isolating mesenchymal stem cells from fresh bone marrow,

culturing and differentiating these cells on plastic and seeding them on scaffolds immediately prior to implantation (132-135). A second method was based on the culturing of MSCs on scaffolds under osteogenic conditions for several days prior to implantation in bone defects (21,136). Both strategies have proven efficacy in pre-clinical models but are not optimal in clinical settings. There are a number of reasons that might explain the non reproducibility of these therapeutic approaches. The osteogenic potential of mesenchymal stem cells is dependent on the bone marrow harvesting technique, genotype and age of the patients, as well as on the culture methods (137). The adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of MSCs on scaffolds are also described as critical steps for the development of bone tissue engineering. Previous studies have shown better osteoinduction results with cells cultured on scaffolds for a few days than with cell-seeded scaffolds implanted immediately (42-44). This suggests that the number of adherent cells, their osteogenic differentiation and the extracellular matrix and bone growth factors produced during culture are of importance (138,139). The capacity of scaffolds to support cell adhesion is also crucial *in vivo* for both colonization by the host cells and complete integration of the constructs. In addition to the number of adherent cells on scaffolds, cell-cell and cell-matrix interactions must also be taken into account. These different interactions depend in particular on homogeneous cell distribution over the scaffold. Several studies have demonstrated that classic static cultures limit the uniform colonization in porous scaffolds because of limited diffusion of nutrients and oxygen, and limited elimination of metabolites (140-144). On the contrary, dynamic culture with perfusion medium leads to improved cell seeding and nutrient supply (145). This culture condition, which aims to mimic natural flow in the bone micro-environment, is beneficial for both cell proliferation and osteogenesis, and makes uniform cell colonization of the scaffolds possible (146,147). Recently, Braccini *et al.* (148) demonstrated that a perfusion culture could maintain the clonogenic characteristics of MSCs during expansion, which could be beneficial for bone formation, as there is evidence of a relationship between the number of clonogenic MSCs and capacity for bone formation (149). These results seem to indicate that a clonogenic population that can proliferate and form colonies *in vitro* is an important element for obtaining more bone formation *in vivo*. In addition, our results show that cells in proliferation medium may induce more bone formation than cells in classic osteogenic medium (Figure 2e).

Despite the number of promising results in animal models, no convincing successes have been obtained in human clinical trials with regard to bone formation and reproducibility (21-23,150-152). These studies confirm the difficulty of obtaining a reproducible technique using

animal models that can be predictive and transposable to human clinical situations. Many researchers believe that it is mainly the cells implanted that are responsible for bone formation but that the nature of the scaffolds, as well as the ECM produced *in vitro* and the host cells recruited from implantation sites, must be taken into consideration. For instance, a recent study has shown that devitalized cell constructs are not osteoinductive despite an abundant ECM produced *in vitro* (138). Overall, many factors remain to be taken into consideration for bone tissue engineering prior to being used in clinical applications. Optimizing parameters such as cell purity, density, osteogenic differentiation, the physical and chemical properties of scaffolds and osteoinduction should be determined using human MSCs in small animal models. However, constructs with human cells cannot be used in animal pre-clinical studies because of immunogenic reactions which limit the validation of the hypotheses.

b) Three-dimensional culture

The reasons why MSCs fail to produce bone in a human bone defect, while these same cells produce bone in an ectopic environment in rodents, are still unclear. One clue for this discrepancy could reside in the engineered environment provided for cells that is different from their natural environment in the body. *In vivo*, cells are in a complex 3D micro-environment where the ECM provides mechanical support, cell adhesion sites, and biological cues that control gene and protein expression. In contrast, although researchers have attempted to mimic this 3D environment, the various types of synthetic porous scaffolds manufactured from either polymers or ceramics remain, like plastic culture plates, a 2D surface at the cell level. Hydrogels, on the other hand, are closer to a natural cell environment, but often lack specific cues allowing them to interact with cells. They also do not possess enough mechanical strength for bone tissue engineering. Another discrepancy can be found in the fact that scientists have been primarily focused on developing materials that mimic mature bone tissue, thus looking more at 'the end product' than at its formation and healing. For instance, degradable polymers or ceramics have been processed into porous materials to resemble trabecular bone in both composition and structure, and the cells were then seeded and cultured on to these artificial ECM. However, nature proceeds in reverse during embryogenesis or bone tissue healing when a high density of progenitor cells and a low extracellular matrix content are initially present. Bone tissue engineering might benefit from a similar approach. In other words, understanding the complex cell-cell interactions involved in bone formation and mimicking the osteogenesis process with high cellular content and low supportive structure could be an effective way of differentiating the cells into a complex

three-dimensional tissue. Calcium phosphate particles that provide inverted porosity with more degrees of freedom for cell colonization, cell-cell interactions, ECM production and tissue formation can be used in this respect (153,154). As shown in Figure 4, the use of BCP particles measuring 140-200 μm in diameter for culturing hMSC effectively resulted in abundant extracellular matrix production and formed a solid complex of cells and particles within 2-3 days. Furthermore, this cell-synthesized 3D micro-environment, mainly composed of type 1 collagen, seemed to induce early and high expression of osteoblastic markers, without external osteogenic stimulation. On the contrary, gene expression patterns for cells in monolayer cultures are not typical of cells in their natural 3D micro-environment (155). Recent studies have confirmed the importance of an appropriate 3D environment for cell culture with a view to mimicking natural events (156,157). The authors have shown that cell viability and functions were improved by their binding to large proteins (collagen, laminin and fibronectin). All these studies comparing several substrates in order to identify the specific effect of the cell-synthesized 3D environment have proven the key role played by the 3D micro-environment in osteoblastic differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo*. Cells embedded in this matrix sense the mechanical strength through the interactions between integrins at the cell surface and binding sequences of the ECM. The binding elements are essential for cell migration and functions as well as for their capacity to cleave the ECM and deposit newly-formed ECM components. For instance, Howe *et coll.* (158) demonstrated that the integrin-binding events were critical for cell adhesion and played a role in most cell processes. Chen *et al.* (159) also demonstrated that extracellular matrix made by bone marrow cells could facilitate the expansion of progenitor cells and prevent their osteoblastic differentiation. On the other hand, Bitar *et al.* (160) demonstrated the importance of a dense collagenous matrix for providing a natural environment for osteoblastic differentiation. In the same study, the authors demonstrated that cell-cell interactions could inhibit proliferation and enhance osteoblastic differentiation via gap junctions at a high cell density. All these results show that the 3D environment makes it possible to reproduce natural processes that occur *in vivo*. In other words, MSCs in a 3D environment synthesized an abundant ECM. In turn, the ECM, mainly composed of type I collagen, encourages the proliferation and migration of the MSCs. At high cell confluence and high ECM density, the osteoblastic differentiation of MSCs contributes to the mineralization of the collagen.

Bone tissue engineering should benefit from these studies demonstrating that hybrid constructs mimicking the natural 3D environment are more potent than traditional porous scaffolds. Providing the cells with a high degree of freedom as well as high cell/material

ratios would certainly improve seeding uniformity, cell proliferation, ECM production, cell-cell interactions and osteogenic differentiation *in vitro*, as well as nutrient supply and vascularization *in vivo*. Nevertheless, the boundary between osteoprogenitor proliferation and differentiation has not yet been clearly established and remains to be defined.

c) Cell-sheet approach

In spite of numerous scaffold-based approaches, none has yet become a new gold standard for bone regeneration. Handling difficulties when filling bone defects, poor mechanical properties or low biodegradability, inadequate mimicking of natural bone tissue and production costs have oriented researchers toward new directions. Recently, the idea has emerged that uses the MSCs' ability to differentiate into a wide range of tissues in order to form bone without a support scaffold. Cells seeded at a high density on to plastic effectively reach confluence rapidly and produce an ECM to form cell-sheets after weeks of culture. Thanks to adapted techniques, such as thermoresponsive polymer grafted on to culture dishes, these cell-sheets can be easily detached without enzymatic treatment (161-163). Alternatively, a cell-scraper is sufficient to obtain these cell-sheets with supra-confluent cells (164-166). Once obtained, the cell-sheets cultured in a classic osteogenic medium can be rolled up to form a 3D construct. Recent studies have shown that these cell-sheet constructs formed in osteogenic medium had ALP activities and high osteocalcin content, indicating MSC differentiation into osteoblastic lineage (164,165,167). More interestingly, cell-sheets associated with scaffolds (165,166) or cell-sheet constructs alone (164,167) were capable of forming new bone tissue when implanted subcutaneously into an ectopic or orthotopic site. This study underlines the potential of MSCs alone - producing their own 3D matrix without a supportive scaffold - to be used in hard tissue repair. Nevertheless, bone tissue was obtained after 6 weeks with cell-sheets and after only 4 weeks when the cell-sheets were associated with an HA scaffold. Recently, the same team has investigated the advantages of cell-sheets in helping non-union fractures to heal (167). When implanted around an osteotomy site, the cell-sheets were able to survive and formed a callus which allowed a bone bridge to form across the site of the defect. This new direction in bone tissue engineering is attractive with regard to the use of purely biologic elements and the easily produced biomaterial. Using only progenitor cells to generate tissue is a good biomimetic approach as it reproduces the natural process used to create and regenerate tissues in the body. However, further experiments must be carried out to confirm the potential of cell-sheets. Furthermore, the osteogenic culture medium must be substituted

by an analog that is more similar to body fluids before cell-sheets can be used in clinical applications.

5) Future trends

The advantages and disadvantages of the various approaches to bone tissue engineering have been assessed by many researchers in the field. In addition to the complex issues associated with reproducing a specific bone environment during embryogenesis or repair, important hurdles need to be overcome, such as the lack of vascularization, especially when reconstructing large-sized defects. If transporting oxygen, nutrients, growth factors and waste materials is possible by molecular diffusion over short distances ($\leq 200 \mu\text{m}$), it rapidly decreases until becoming null at greater distances (168). Therefore, a rapid and abundant vascularization network is essential if grafts are to avoid implanted-cell necrosis and the formation of acellular regions, and to allow new bone formation (169,170).

Several isolated or combined approaches can be considered as a means of improving vascularization. Constructs can be implanted into a highly vascularized site (171) or an artery can be derivated on the implant (172) as a preliminary step prior to removal and implantation in the site of interest. However, this technique results in two surgery sites, and harvesting the newly-vascularized graft is difficult without damaging the preformed vascular network. Nevertheless, Pelissier *et al.* (173) have demonstrated the beneficial effect of combining a vascular element with osteogenic cells on neovascularization and osteogenesis when implanted in an ectopic site. Another way to induce neovascularization is to use angiogenic factors such as VEGF, PDGF or FGF (174). These angiogenic factors could be incorporated into the scaffolds and released over time to promote neovascularization (175). Using this type of approach has resulted in improved neovascularization and new bone formation (82,176,177). However, there are still problems involved in incorporating the growth factors in bioactive form into the scaffolds and releasing them at the most appropriate dosages and profiles.

More recently, there have been promising results showing the beneficial effect of using endothelial progenitor cells in regenerative medicine (178). In the same vein, another approach based on *in vitro* co-culture has been developed, demonstrating the stimulation of osteoprogenitor cell differentiation by means of direct contact with endothelial cells (179). Progenitor cells have been shown to be a promising source of cells, and particularly MSCs, able to differentiate into endothelial cells (180-182). Co-culture was also achieved on

scaffolds and has produced interesting results for the *in vitro* pre-vascularization of biomaterials (183) and for promoting the formation of blood vessels *in vivo* (184). It has effectively been reported that construct survival and vascularization was improved *in vivo* when a co-culture was applied *in vitro* (184). In this study, the authors produced a multi-cell culture and seeded myoblasts, embryonic fibroblasts and endothelial cells together on a porous scaffold. Another work reported the formation of a prevascular network using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) co-cultured with human osteoprogenitor cells (185).

These recent advances in bone tissue engineering are in agreement with the concept of mimicking events that occur in the natural bone-healing process. With this in mind, scientists have investigated the possibility of co-culturing osteoblast and osteoclast cells in an attempt to mimic natural bone remodeling. For instance, the ability of conjointly seeded osteoblasts and osteoclasts to proliferate on different scaffolds has recently been demonstrated (186). Domaschke *et al.* (187) have shown that co-culturing osteoblast/osteoclast cells on mineralized collagen I scaffolds leads to the degradation of this scaffold by the osteoclasts and thus provides room for the osteoblasts to invade and synthesize the new bone matrix. Another study co-culturing osteoblasts and pre-osteoclasts has shown that the differentiated osteoblasts were able to promote osteoclastic differentiation of the pre-osteoclasts *in vivo* (188). These results point to a new direction, in which stem cells differentiated into osteoblasts, osteoclasts, endothelial cells and other cell lineages recreate all together the complex cell-cell interactions occurring in natural bone for clinical applications.

Apart from cell-cell communication between several lineages, the micro-environment, and particularly the surface of the scaffold, appears to be of primary importance for cells and consequently for bone tissue engineering. It has been well documented that the surface properties of scaffolds, such as topography, composition and surface energy, play a crucial role in cell behavior (189-191). Engler *et al.* have shown that varying the stiffness of the matrix could direct naïve MSCs toward neurons, myoblasts and osteoblasts (192). Furthermore, they demonstrated a more relevant effect of matrix stiffness compared to soluble induction factors. In another study, Dalby *et al.* demonstrated that MSCs were influenced by topography at a nanometric level (193). The results of this study have shown that nanodisplaced topography may significantly increase osteoblastic differentiation, even without osteogenic factors. Adult stem cells reside in specific niches in the body that control their survival, proliferation, self-renewal, or differentiation. However, in the case of tissue healing, adult stem cells are able to leave these natural niches and circulate (194), before

finally engrafting a specific matrix micro-environment that promotes their differentiation into a defined lineage to regenerate the tissue. These studies seem to indicate that in the coming year it will be essential to manufacture scaffolds with the appropriate stiffness and topography which make possible the desired cell commitment *in vitro* to encourage rapid and complete *in vivo* integration.

The perpetual advances made in material design have a positive impact on bone tissue engineering. In the body, all tissues have an interface with at least one other type of tissue and this must be taken into consideration for implant integration. For example, bone tissue has a major interface with cartilage tissue, and scientists have tried to create multi-tissue constructs composed of bone and cartilage (195,196). The development of computer-assisted design techniques will open the way for 3D organization of scaffolds (197) and specific lineage cells, thus producing multi-tissue constructs *in vitro* (198,199).

Figure captions

Figure 1. Bone tissue engineering principle

Figure 2. Biphasic calcium phosphate (BCP) granule (2-4 mm) without cells observed by scanning electron microscopy (SEM) (a) or with cells cultured for 21 days in proliferation medium and stained using May-Grünwald Giemsa (b). Histological staining (c) or SEM analyses (d) of BCP granules loaded with hMSCs for 7 days and implanted under the skin of immune-compromised mice for 8 weeks. Arrows indicate newly mature bone formation. Histogram graph represents the percentage of bone formation in proliferation or osteogenic medium (* : $p < 0.05$).

Figure 3. Scaffold for mimicking tridimensional environment. Representation of scaffold produced by 3D fiber deposition (a) (reproduce with permission from (200)). Electrospun fibrous membranes observed by scanning electron microscopy (b) (reproduce with permission from (103)). Human MSCs cultured in a sylanized synthetic polymer (c) or collagen hydrogel (d) with BCP particles.

Figure 4. Cell-synthesized 3D environment on BCP particles (140-200 μm). Cell synthesized extracellular matrix during culture time on BCP particles (a) after 1 (b) and 14 days (c). *In vivo* bone formation of 3D hybrid hMSC/BCP particles implanted subcutaneously in nude mice for 8 weeks. Histological staining (d) and scanning electron microscopy analyses. Arrows indicate newly mature bone formation.

Figure 5. Representation of cell conformation on different BCP scaffolds. Two-dimensional conformation of cells seeded on macroporous BCP scaffold (left) and three-dimensional conformation of cells seeded on BCP particles with extracellular matrix formation (right).

References

1. Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:6.
2. McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J. Orthop. Res.* 2008 Mar;26(3):384-393.
3. Hao Y, Yingjie H, Zhang G, Ge Z, Wang Y, Yisheng W, et al. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone.* 2007 Oct;41(4):631-638.
4. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(21):3053-3061.
5. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shifflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N. Engl. J. Med.* 2001 May 17;344(20):1511-1514.
6. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 2001 Feb 1;344(5):385-386.
7. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975 May;55(5):533-544.
8. Friedrich JB, Moran SL, Bishop AT, Wood CM, Shin AY. Free vascularized fibular graft salvage of complications of long-bone allograft after tumor reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Jan;90(1):93-100.
9. Ghert M, Colterjohn N, Manfrini M. The use of free vascularized fibular grafts in skeletal reconstruction for bone tumors in children. *J Am Acad Orthop Surg.* 2007 Oct;15(10):577-587.
10. Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J, Yajima H, Haga N, Kamegaya M, et al. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a multicenter study in Japan. *J Pediatr Orthop.* 2005 Apr;25(2):219-224.
11. Sakamoto A, Yoshida T, Uchida Y, Kojima T, Kubota H, Iwamoto Y. Long-term follow-up on the use of vascularized fibular graft for the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Orthop Surg Res.* 2008;3:13.
12. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.* 1987 Apr;18(2):187-196.
13. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials.* 1998;19(16):1473-8.
14. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices.* 2006 Jan;3(1):49-57.
15. de Groot K. Implant materials in dentistry. *Med Prog Technol.* 1982;9(2-3):129-136.
16. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* 2008 Mar;29(9):1177-1188.
17. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng.* 2004 Jan;32(1):160-165.
18. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-926.

19. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 2000;18(9):959-63.
20. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):959-963.
21. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials.* 2008 July;29(21):3053-3061.
22. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 2001 Feb 1;344(5):385-386.
23. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004 Jun;62(6):724-729.
24. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found. Symp.* 2003;249:133-143; discussion 143-147, 170-174, 239-241.
25. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S86-95.
26. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13 Suppl 1:S3-6.
27. Cotten A. *Imagerie musculosquelettique: Pathologies générales.* Elsevier Masson; 2005.
28. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371-386.
29. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001;22(19):2581-93.
30. DUCY P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000;289(5484):1501-4.
31. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):287-99.
32. Pierce AM, Lindskog S, Hammarstrom L. Osteoclasts: structure and function. *Electron Microsc Rev.* 1991;4(1):1-45.
33. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 1976 Sep;4(5):267-274.
34. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991 Sep;9(5):641-650.
35. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007 Oct 19;131(2):324-336.
36. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-228.
37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-4295.
38. Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2006;76B(1):230-239.

39. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):55-70.
40. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):313-317.
41. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):318-324.
42. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat. Biotechnol.* 1998 Mar;16(3):247-252.
43. Ripamonti U. Bone induction by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, BMP-7) in the primate Papio ursinus with expression of mRNA of gene products of the TGF-beta superfamily. *J. Cell. Mol. Med.* 2005 Dec;9(4):911-928.
44. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-1534.
45. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Feb;1(1):25-32.
46. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J. Orthop. Res.* 2006 May;24(5):867-876.
47. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):944-953.
48. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):81-98.
49. Winter M, Griss P, de Groot K, Tagai H, Heimke G, von Dijk HJ, et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1981 Jul;2(3):159-160.
50. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Int.* 1990 Jan;46(1):20-27.
51. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*. 1989;23(8):883-94.
52. Norman ME, Elgendi HM, Shors EC, el-Amin SF, Laurencin CT. An in-vitro evaluation of coralline porous hydroxyapatite as a scaffold for osteoblast growth. *Clin Mater*. 1994;17(2):85-91.
53. Shu R, McMullen R, Baumann MJ, McCabe LR. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 15;67(4):1196-1204.
54. Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, et al.

- Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, [beta]-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials*. 2003 July;24(15):2593-2603.
55. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Bohner M, Richter W. Porosity and pore size of [beta]-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. *Acta Biomaterialia*. 2008 Nov;4(6):1904-1915.
 56. Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(6):1036-1047.
 57. Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, et al. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Jan;21(1):353-363.
 58. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg E, et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2008 Feb;12(1):281-291.
 59. Curran JM, Chen R, Hunt JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(27):4783-4793.
 60. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 Apr 26;102(17):5953-5957.
 61. Wollenweber M, Domaschke H, Hanke T, Boxberger S, Schmack G, Gliesche K, et al. Mimicked bioartificial matrix containing chondroitin sulphate on a textile scaffold of poly(3-hydroxybutyrate) alters the differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006 Feb;12(2):345-359.
 62. Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Dec;9(12):717-721.
 63. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* 1996 July 1;317 (Pt 1):59-64.
 64. Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem. J.* 1994 Aug 15;302 (Pt 1):175-179.
 65. Boskey AL, Wians FH, Hauschka PV. The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif. Tissue Int.* 1985 Jan;37(1):57-62.
 66. Hausehka PV, Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*. 1982 May 11;21(10):2538-2547.
 67. Li X, van Blitterswijk CA, Feng Q, Cui F, Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials*. 2008 Aug;29(23):3306-3316.
 68. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*.

- 2005 Jun;26(17):3565-3575.
- 69. Liu Q, Cen L, Yin S, Chen L, Liu G, Chang J, et al. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and [beta]-TCP ceramics. *Biomaterials*. 2008 Dec;29(36):4792-4799.
 - 70. Frayssinet P, Trouillet J, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*. 1993 May;14(6):423-429.
 - 71. Kwon S, Jun Y, Hong S, Kim H. Synthesis and dissolution behavior of [beta]-TCP and HA/[beta]-TCP composite powders. *Journal of the European Ceramic Society*. 2003 Jun;23(7):1039-1045.
 - 72. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Mar;14(3):201-209.
 - 73. Julien M, Khoshnati S, Lacreusette A, Gatius M, Bozec A, Wagner EF, et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J. Bone Miner. Res.* 2009 Nov;24(11):1856-1868.
 - 74. Liu Y, Layrolle P, de Bruijn J, van Blitterswijk C, de Groot K. Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001 Dec 5;57(3):327-335.
 - 75. Liu Y, Hunziker EB, Layrolle P, De Bruijn JD, De Groot K. Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity. *Tissue Eng.* 2004 Feb;10(1-2):101-108.
 - 76. Hollinger JO, Schmitz JP. Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1987 Jul;45(7):594-600.
 - 77. Agrawal CM, Best J, Heckman JD, Boyan BD. Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. *Biomaterials*. 1995 Nov;16(16):1255-1260.
 - 78. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT. The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1991 Jun;73(5):750-764.
 - 79. Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm. Res.* 2000 May;17(5):497-504.
 - 80. Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, et al. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm. Res.* 2001 Dec;18(12):1747-1753.
 - 81. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, et al. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000 May;50(2):227-238.
 - 82. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat. Biotechnol.* 2001 Nov;19(11):1029-1034.
 - 83. Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJA, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials*. 2008

- Apr;29(12):1892-1900.
84. Attawia MA, Uhrich KE, Botchwey E, Langer R, Laurencin CT. In vitro bone biocompatibility of poly (anhydride-co-imides) containing pyromellitylimidoalanine. *J. Orthop. Res.* 1996 May;14(3):445-454.
85. Ibib SE, Uhrich KE, Attawia M, Shastri VR, El-Amin SF, Bronson R, et al. Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998;43(4):374-379.
86. Claase MB, de Bruijn JD, Grijpma DW, Feijen J. Ectopic bone formation in cell-seeded poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) copolymer scaffolds of varying porosity. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Jul;18(7):1299-1307.
87. Kuijer R, Bouwmeester SJ, Drees MM, Surtel DA, Terwindt-Rouwenhorst EA, Van Der Linden AJ, et al. The polymer Polyactive as a bone-filling substance: an experimental study in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 1998 Aug;9(8):449-455.
88. Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP, et al. Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995 Aug;29(8):959-965.
89. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998 Dec 5;42(3):396-402.
90. Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials.* 1996 Jul;17(14):1417-1422.
91. Bakshi A, Fisher O, Dagci T, Himes BT, Fischer I, Lowman A. Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine.* 2004 Oct;1(3):322-329.
92. Ma PX, Zhang R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001 Sep 15;56(4):469-477.
93. Chen JH, Laiw RF, Jiang SF, Lee YD. Microporous segmented polyetherurethane vascular graft: I. Dependency of graft morphology and mechanical properties on compositions and fabrication conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999;48(3):235-245.
94. Dalton PD, Flynn L, Shoichet MS. Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels. *Biomaterials.* 2002 Sep;23(18):3843-3851.
95. Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg.* 2003 May;14(3):324-332.
96. Karp JM, Rzeszutek K, Shoichet MS, Davies JE. Fabrication of precise cylindrical three-dimensional tissue engineering scaffolds for in vitro and in vivo bone engineering applications. *J Craniofac Surg.* 2003 May;14(3):317-323.
97. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer RS, Aufdemorte TB, Mikos AG. The ingrowth of new bone tissue and initial mechanical properties of a degrading polymeric composite scaffold. *Tissue Eng.* 1995;1(1):41-52.
98. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997 Jul;36(1):17-28.

99. Xu H, Han D, Dong J, Shen G, Chai G, Yu Z, et al. Rapid prototyped PGA/PLA scaffolds in the reconstruction of mandibular condyle bone defects. *Int J Med Robot.* 2010 Mar;6(1):66-72.
100. Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(7):974-985.
101. Woodfield TBF, Malda J, de Wijn J, Péters F, Riesle J, van Blitterswijk CA. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(18):4149-4161.
102. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005 Nov 18;310(5751):1135-1138.
103. Yang F, Both SK, Yang X, Walboomers XF, Jansen JA. Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application. *Acta Biomater.* 2009 Nov;5(9):3295-3304.
104. Erisken C, Kalyon DM, Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2008 Oct;29(30):4065-4073.
105. Kim IA, Rhee S. Apatite coating of electrospun PLGA fibers using a PVA vehicle system carrying calcium ions. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21(8-9):1127-1141.
106. Li X, Xie J, Yuan X, Xia Y. Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Langmuir.* 2008 Dec 16;24(24):14145-14150.
107. Li W, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(25):5158-5166.
108. Obata A, Hotta T, Wakita T, Ota Y, Kasuga T. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Apr;6(4):1248-1257.
109. Ko EK, Jeong SI, Rim NG, Lee YM, Shin H, Lee B. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and in vivo bone formation in composite nanofiber meshes. *Tissue Eng Part A.* 2008 Dec;14(12):2105-2119.
110. Pişkin E, İsoğlu IA, Bölgün N, Vargel I, Griffiths S, Cavuşoğlu T, et al. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Sep 15;90(4):1137-1151.
111. Fu Y, Nie H, Ho M, Wang C, Wang C. Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol. Bioeng.* 2008 Mar 1;99(4):996-1006.
112. Cushing MC, Anseth KS. MATERIALS SCIENCE: Hydrogel Cell Cultures. *Science.* 2007 May 25;316(5828):1133-1134.
113. Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat. Biotechnol.* 2003 May;21(5):513-518.
114. Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. In vivo

- engineering of organs: The bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 9;102(32):11450-11455.
115. Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J Control Release.* 2009 Mar 4;134(2):111-117.
116. Huang YX, Ren J, Chen C, Ren TB, Zhou XY. Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/ nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. *J Biomater Appl.* 2008 Mar;22(5):409-432.
117. Webster TJ, Smith TA. Increased osteoblast function on PLGA composites containing nanophase titania. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Sep 15;74(4):677-686.
118. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 2005 Jan;23(1):47-55.
119. Lutolf M, Raeber G, Zisch A, Tirelli N, Hubbell J. Cell-Responsive Synthetic Hydrogels. *Advanced Materials.* 2003;15(11):888-892.
120. Stendahl J, Rao M, Guler M, Stupp S. Intermolecular Forces in the Self-Assembly of Peptide Amphiphile Nanofibers. *Adv. Funct. Mater.* 2006 3;16(4):499-508.
121. Stupp SI, LeBonheur V, Walker K, Li LS, Huggins KE, Keser M, et al. Supramolecular Materials: Self-Organized Nanostructures. *Science.* 1997 Avpr 18;276(5311):384-389.
122. Kim J, Park Y, Tae G, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, et al. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Mar 15;88(4):967-975.
123. Oldinski RA, Cranson CN, James SP. Synthesis and characterization of a Hyaluronan-polyethylene copolymer for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2010 Aug;94(2):441-446.
124. Li Q, Wang J, Shahani S, Sun DDN, Sharma B, Elisseeff JH, et al. Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(7):1027-1034.
125. Wang D, Williams CG, Li Q, Sharma B, Elisseeff JH. Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel. *Biomaterials.* 2003 Oct;24(22):3969-3980.
126. Ladet S, David L, Domard A. Multi-membrane hydrogels. *Nature.* 2008 Mar 6;452(7183):76-79.
127. Fatimi A, Tassin J, Turczyn R, Axelos MAV, Weiss P. Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: the influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomater.* 2009 Nov;5(9):3423-3432.
128. Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, et al. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *J. Orthop. Res.* 2006 Apr;24(4):628-635.
129. Trojani C, Weiss P, Michiels J, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(27):5509-5517.

130. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6643-6651.
131. Sohier J, Corre P, Weiss P, Layrolle P. Hydrogel/calcium phosphate composites require specific properties for three-dimensional culture of human bone mesenchymal cells. *Acta Biomater*. 2010 Aug;6(8):2932-2939.
132. Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*. 2006 Sep;24(9):2140-2149.
133. Mankani MH, Kuznetsov SA, Marshall GW, Robey PG. Creation of new bone by the percutaneous injection of human bone marrow stromal cell and HA/TCP suspensions. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec;14(12):1949-1958.
134. Kuznetsov SA, Huang KE, Marshall GW, Robey PG, Mankani MH. Long-term stable canine mandibular augmentation using autologous bone marrow stromal cells and hydroxyapatite/tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2008 Nov;29(31):4211-4216.
135. Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3631-3638.
136. Scaglione S, Braccini A, Wendt D, Jaquier C, Beltrame F, Quarto R, et al. Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Jan 5;93(1):181-187.
137. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, et al. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng*. 2002 Dec;8(6):911-920.
138. Kruyt MC, De Bruijn J, Veenhof M, Oner FC, Van Blitterswijk CA, Verbout AJ, et al. Application and limitations of chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine for tracing cells used in bone Tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003 Feb;9(1):105-115.
139. Kruyt M, De Bruijn J, Rouwkema J, Van Blitterswijk C, Oner C, Verbout A, et al. Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jun;14(6):1081-1088.
140. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*. 2004 Jan;32(1):112-122.
141. Kim HJ, Kim U, Vunjak-Novakovic G, Min B, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials*. 2005 Jul;26(21):4442-4452.
142. Ng AMH, Tan KK, Phang MY, Aziyati O, Tan GH, Isa MR, et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. *J Biomed Mater Res A*. 2008 May;85(2):301-312.
143. Gravel M, Gross T, Vago R, Tabrizian M. Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coralline composites microstructured using coralline as gas forming agent. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1899-1906.
144. Xu C, Wang Y, Yu X, Chen X, Li X, Yang X, et al. Evaluation of human mesenchymal

- stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Jan;88(1):264-273.
145. Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PG, Lennon DP, Caplan AI, et al. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A*. 2008 Nov;14(11):1809-1820.
146. Marolt D, Augst A, Freed LE, Vepari C, Fajardo R, Patel N, et al. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials*. 2006 Dec;27(36):6138-6149.
147. Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001 May;55(2):242-253.
148. Braccini A, Wendt D, Jaquiere C, Jakob M, Heberer M, Kenins L, et al. Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells*. 2005 Sep;23(8):1066-1072.
149. Braccini A, Wendt D, Farhadi J, Schaeren S, Heberer M, Martin I. The osteogenicity of implanted engineered bone constructs is related to the density of clonogenic bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Feb;1(1):60-65.
150. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kuteпов S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*. 2007 May;13(5):947-955.
151. Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: Comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006 Mar;101(3):285-290.
152. Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 2006 Feb;30(2):115-118.
153. Fischer EM, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD. Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng*. 2003 Dec;9(6):1179-1188.
154. Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, Rosset P, et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Mar;21(3):981-987.
155. Petersen OW, Rønnow-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992 Oct 1;89(19):9064-9068.
156. Weber LM, Hayda KN, Anseth KS. Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec;14(12):1959-1968.
157. Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM. Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J. Cell. Biochem*. 2004 Oct 15;93(3):454-462.

158. Howe AK, Juliano RL. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 1998 Oct 16;273(42):27268-27274.
159. Chen X, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 2007 Dec;22(12):1943-1956.
160. Bitar M, Brown RA, Salih V, Kidane AG, Knowles JC, Nazhat SN. Effect of cell density on osteoblastic differentiation and matrix degradation of biomimetic dense collagen scaffolds. *Biomacromolecules.* 2008 Jan;9(1):129-135.
161. Kim YS, Lim JY, Donahue HJ, Lowe TL. Thermoresponsive terpolymeric films applicable for osteoblastic cell growth and noninvasive cell sheet harvesting. *Tissue Eng.* 2005 Feb;11(1-2):30-40.
162. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005 Nov;130(5):1333-1341.
163. Takahashi H, Nakayama M, Yamato M, Okano T. Controlled Chain Length and Graft Density of Thermoresponsive Polymer Brushes for Optimizing Cell Sheet Harvest. *Biomacromolecules* [Internet]. 2010 Jul 1 [cite 2010 Jul 15];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20593758>
164. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Jun;2(4):196-201.
165. Zhou W, Han C, Song Y, Yan X, Li D, Chai Z, et al. The performance of bone marrow mesenchymal stem cell-implant complexes prepared by cell sheet engineering techniques. *Biomaterials.* 2010 Apr;31(12):3212-3221.
166. Zou XH, Cai HX, Yin Z, Chen X, Jiang YZ, Hu H, et al. A novel strategy incorporated the power of mesenchymal stem cells to allografts for segmental bone tissue engineering. *Cell Transplant.* 2009;18(4):433-441.
167. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone.* 2010 Feb;46(2):418-424.
168. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008 Aug;26(8):434-441.
169. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today.* 2003 Nov 1;8(21):980-989.
170. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.* 2006 Mar;10(1):7-19.
171. Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, Stürzl M, Kneser U. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *J. Cell. Mol. Med.* 2007 Feb;11(1):6-20.
172. Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S, et al. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng.* 2007 Jul;13(7):1549-

- 1560.
173. Pelissier P, Villars F, Mathoulin-Pelissier S, Bareille R, Lafage-Proust M, Vilamitjana-Amedee J. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003 May;111(6):1932-1941.
 174. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 2003 Jun;9(6):685-693.
 175. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2093-2104.
 176. Peters MC, Polverini PJ, Mooney DJ. Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002 Jun 15;60(4):668-678.
 177. Huang Y, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J. Bone Miner. Res.* 2005 May;20(5):848-857.
 178. Krenning G, Dankers PYW, Drouven JW, Waanders F, Franssen CFM, van Luyn MJA, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009 Jun;296(6):F1314-1322.
 179. Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, et al. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 2004;14(4-6):325-332.
 180. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004 Jul 20;110(3):349-355.
 181. Valarmathi MT, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A.* 2008 Apr;14(4):491-504.
 182. Valarmathi MT, Davis JM, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. A three-dimensional model of vasculogenesis. *Biomaterials.* 2009 Feb;30(6):1098-1112.
 183. Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials.* 2007 Sep;28(27):3965-3976.
 184. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotech.* 2005 July;23(7):879-884.
 185. Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng.* 2006 Sep;12(9):2685-2693.
 186. Jones GL, Motta A, Marshall MJ, El Haj AJ, Cartmell SH. Osteoblast: osteoclast co-cultures on silk fibroin, chitosan and PLLA films. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(29):5376-5384.
 187. Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, et al. In vitro ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. *Tissue Eng.* 2006 Apr;12(4):949-958.

188. Tortelli F, Pujic N, Liu Y, Laroche N, Vico L, Cancedda R. Osteoblast and osteoclast differentiation in an in vitro three-dimensional model of bone. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2373-2383.
189. Boyan BD, Lossdörfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater*. 2003 Oct 24;6:22-27.
190. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000 Feb;49(2):155-166.
191. Campoccia D, Arciola CR, Cervellati M, Maltarello MC, Montanaro L. In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrata with different roughness. *Biomaterials*. 2003 Fév;24(4):587-596.
192. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):677-689.
193. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater*. 2007 Dec;6(12):997-1003.
194. Katayama Y, Battista M, Kao W, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):407-421.
195. Schek RM, Taboas JM, Segvich SJ, Hollister SJ, Krebsbach PH. Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid free-form fabricated scaffolds. *Tissue Eng*. 2004 Oct;10(9-10):1376-1385.
196. Moroni L, Hamann D, Paoluzzi L, Pieper J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Regenerating articular tissue by converging technologies. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e3032.
197. Woodfield TBF, Guggenheim M, von Rechenberg B, Riesle J, van Blitterswijk CA, Wedler V. Rapid prototyping of anatomically shaped, tissue-engineered implants for restoring congruent articulating surfaces in small joints. *Cell Prolif*. 2009 Aug;42(4):485-497.
198. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 July;4(7):518-524.
199. Calvert P. MATERIALS SCIENCE: Printing Cells. *Science*. 2007 Oct 12;318(5848):208-209.
200. Moroni L, Schotel R, Sohier J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Polymer hollow fiber three-dimensional matrices with controllable cavity and shell thickness. *Biomaterials*. 2006 Dec;27(35):5918-5926.

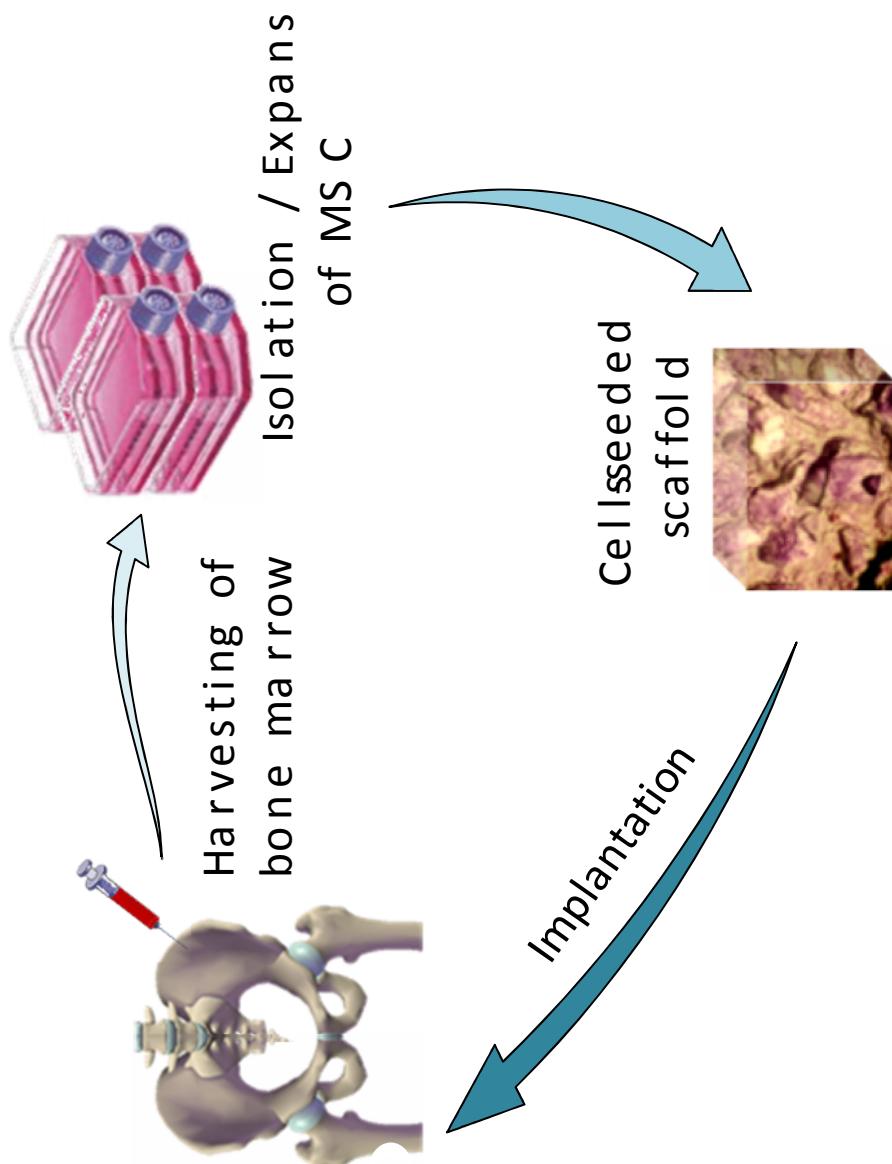


Figure 1: Principle of bone tissue engineer

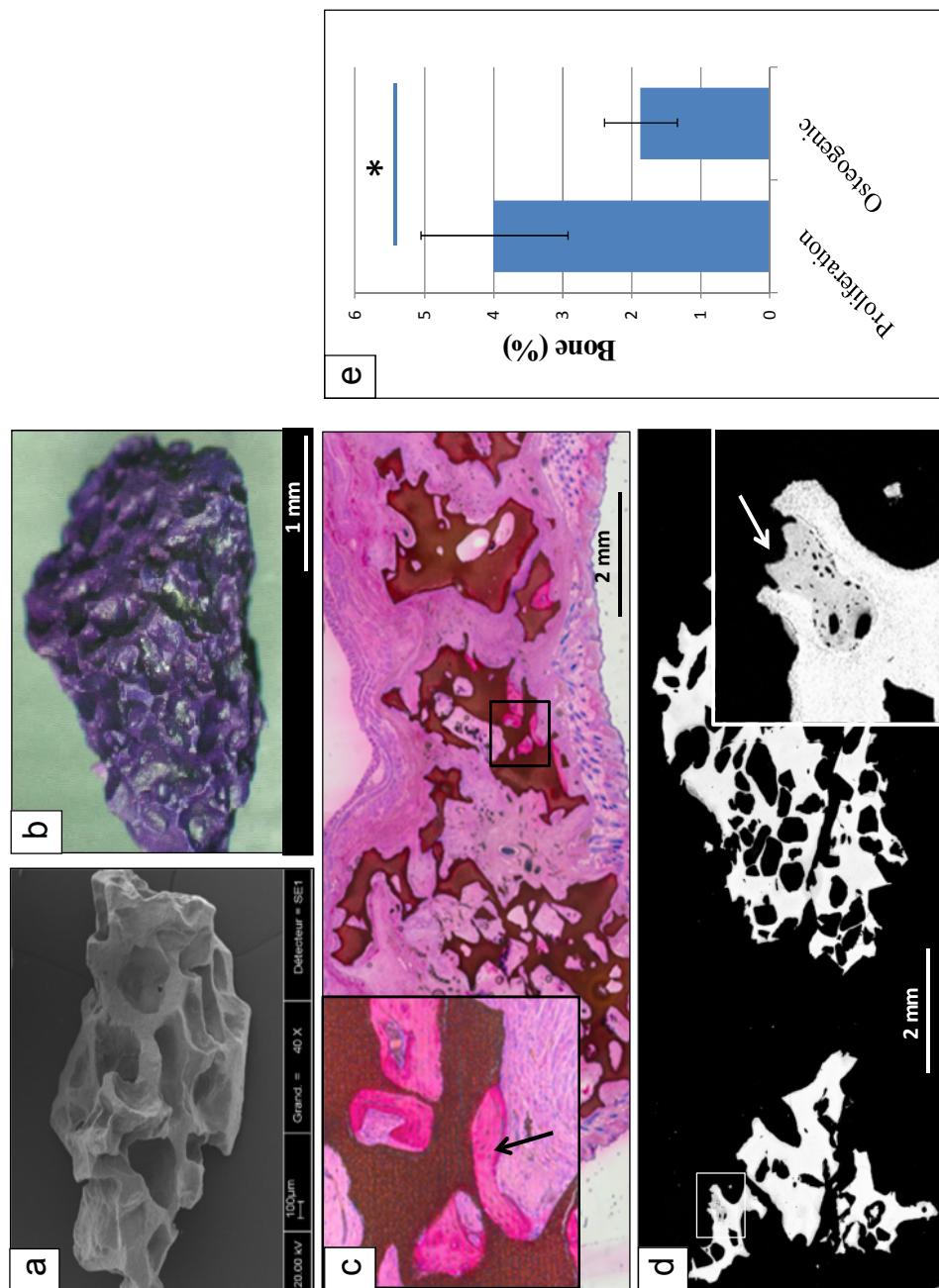


Figure 2. Biophasic calcium phosphate (BCP) granule (2-4 mm) without cells observed by scanning electron microscopy (SEM) (a) or with cells cultured for 21 days in proliferation medium and stained using May-Grünwald Giems a (b). Histological staining (c) or SEM analyses (d) of BCP granules loaded with hMSCs for 7 days and implanted under the skin of immune-compromised mice for 8 weeks. Arrows indicate newly mature bone formation. Histogram graph represents the percentage of bone formation in proliferation or osteogenic medium (* : $p < 0.05$).

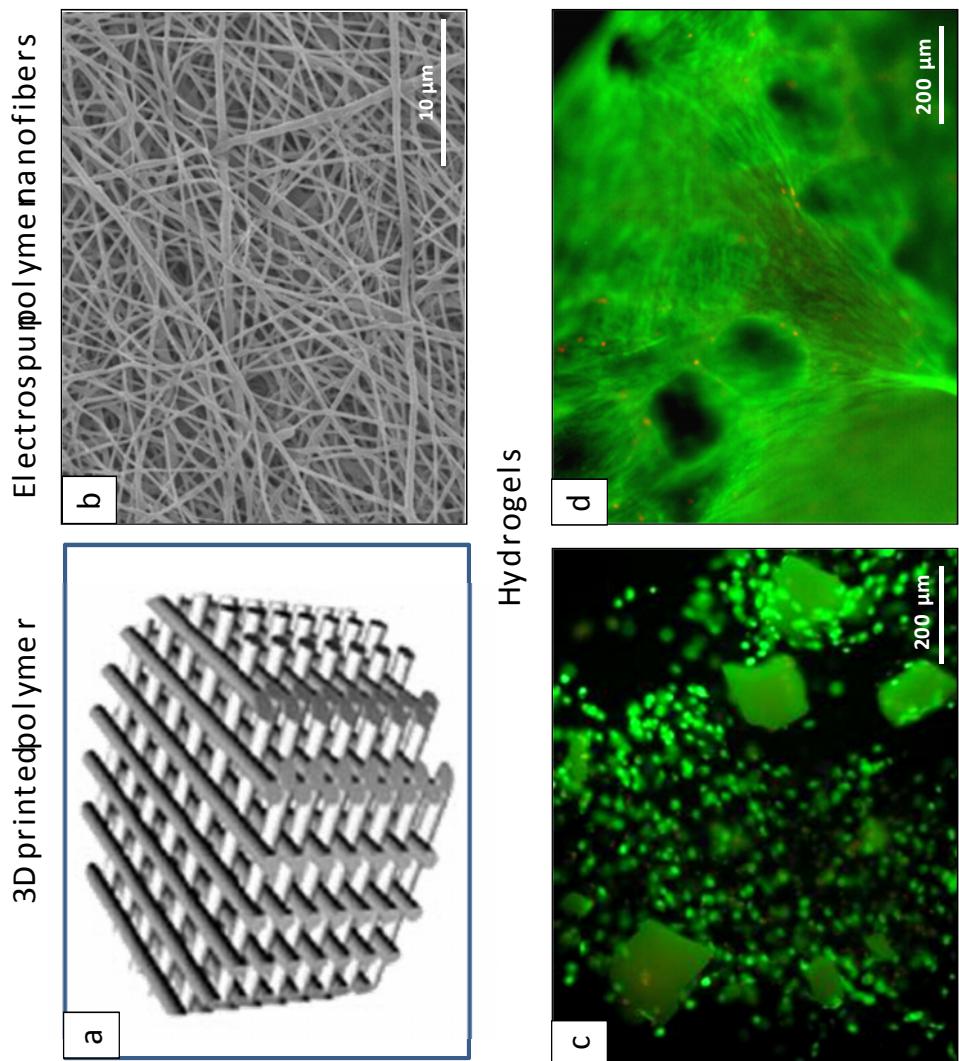


Figure 3. Scaffolds for mimicking three-dimensional environments. Representation of scaffold produced by 3D fiber deposition (a) (reproduced with permission from (200)). Electrospun fibrous membrane observed by scanning electron microscopy (b) (reproduced with permission from (103)). Human MS Cs cultured in a sylanized synthetic polymer (c) or collagen hydrogel (d) with BCP particles

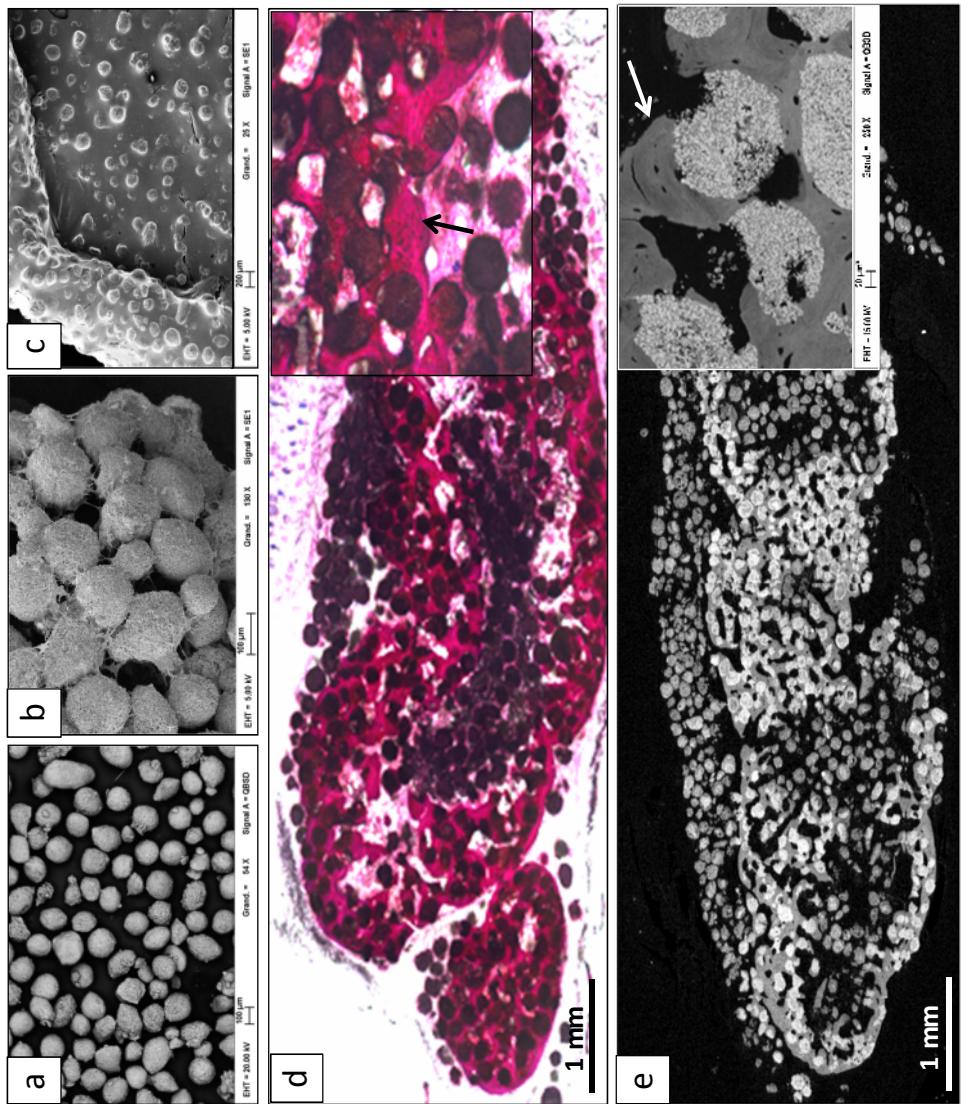


Figure 4. Cell-synthesized 3D environment on BCP particles (140-200 μm). Cell synthesized extracellular matrix during culture time on BCP particles (a) after 1 (b) and 14 days (c). *In vivo* bone formation of 3D hybrid hMs C/BCP particles implanted subcutaneously in nude mice for 8 weeks. Histological staining (d) and scanning electron microscopy analyses. Arrows indicate newly mature bone formation

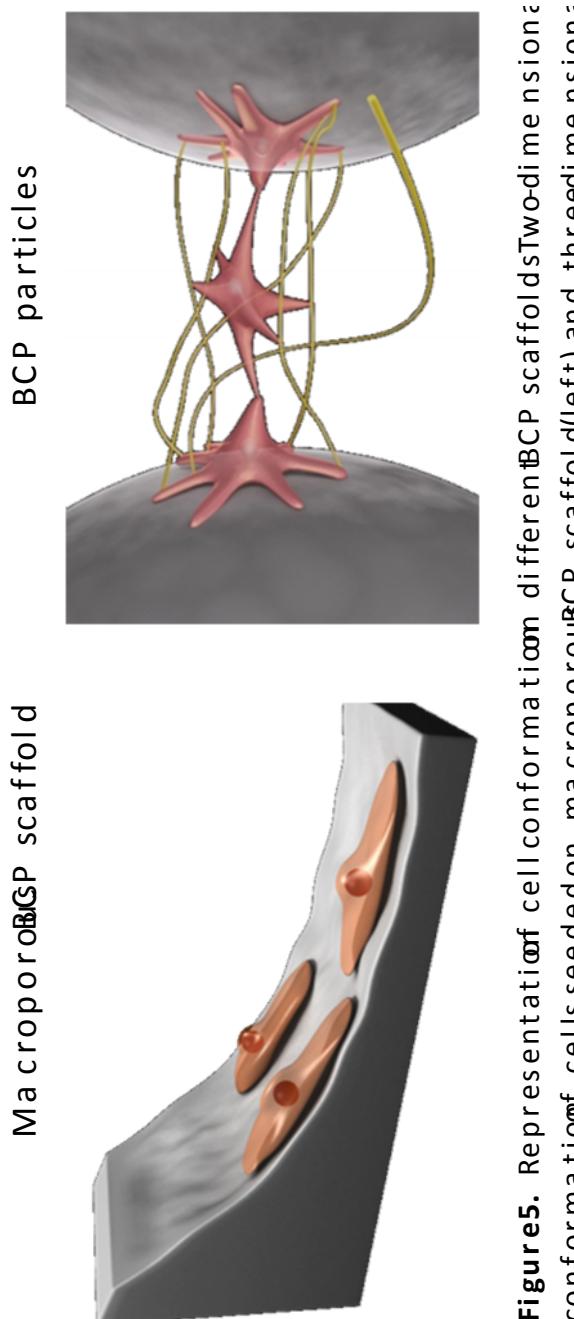


Figure 5. Representation of cell conformation on different BCP scaffolds. Two-dimensional conformation of cells seeded on macroscopic BCP scaffold (left) and three-dimensional conformation of cells seeded on BCP particles with extracellular matrix (right)

Chapitre 2 : Techniques et matériels utilisés lors de cette thèse

Les biomatériaux

Les céramiques de phosphate de calcium biphasées

Durant ces travaux nous avons utilisé principalement des céramiques de phosphate de calcium biphasées (BCP). Ces céramiques nous ont été fournies pour la société Biomatlante (MBCP+®, Vigneux de Bretagne, France). Toutes les céramiques que nous avons utilisées étaient de même composition avec une microporosité de surface identique (figure 9). Ces céramiques sont composées à 20 % d'hydroxyapatite (HA) et 80 % de phosphate tricalcique beta (β -TCP) correspondant au poids total. La pureté de ces matériaux a été analysée par diffraction aux rayons X (XRD, PW 1830, CuK α source, Philips electronics, Mahwah, NJ) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, Nicolet, Magna-IR 550, Ramsey, MN). Par la suite, les traces d'oxyde de calcium (CaO) au sein des BCP ont été analysées par un test à la phénolphtaléine. Les matériaux ont ensuite été stérilisés par irradiation gamma à 25 kGrays.

Différentes formes de BCP ont été utilisées durant cette thèse. Des matériaux macroporeux avec une porosité importante (disques, granules) ou bien des matériaux de taille inférieure, plus dense, ne présentant pas de macroporosité (particules).

Les disques de BCP

Les disques de BCP utilisés avaient un diamètre de 8 mm et une épaisseur de 3 mm pour un poids moyen de 0,14 g et avaient une porosité interconnectée représentant 70 % de leur volume (figure 10A). Les macropores avaient une taille comprise entre 265 et 550 μ m (moyenne 400 μ m) représentant 45 % du volume total. Les micropores (pores de taille inférieure à 10 μ m) représentaient 25 % du volume total. La porosité a été évaluée par un porosimètre à intrusion de mercure (AutoporeIII, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France). La surface totale liée aux macropores ($> 10 \mu$ m) était de $323 \pm 35 \text{ cm}^2/\text{g}$, soit une taille moyenne par disque de 45,2 cm^2 .

Les granules de BCP

Les granules de BCP, de granulométrie comprise entre 2 et 4 mm, étaient macroporeux et fabriqués à partir du même bloc utilisé pour fabriquer les disques (figure 10B). Ils présentaient donc une porosité similaire comprenant des macropores (400 μ m) et des

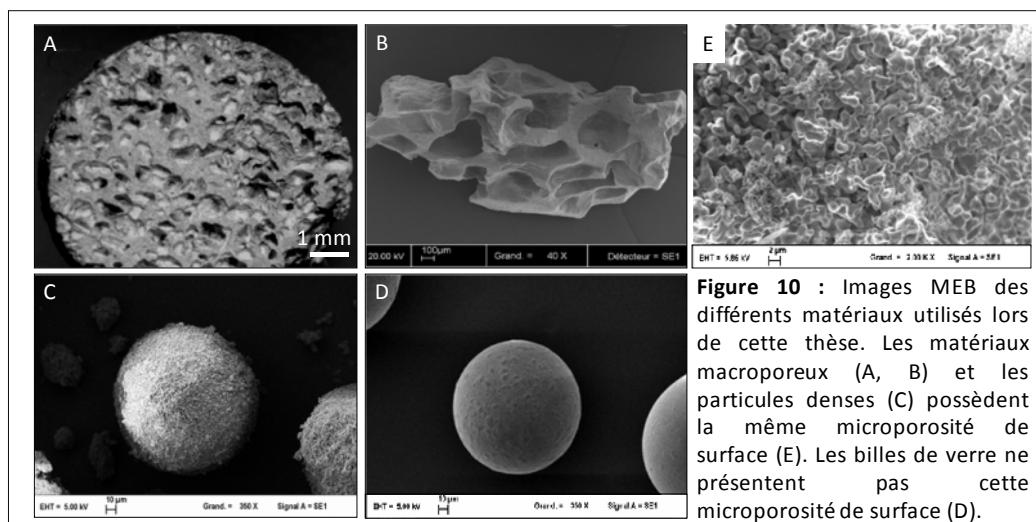
micropores interconnectés représentant une porosité totale de 70 %. Leur composition est identique à celle des disques macroporeux avec un ratio HA/β-TCP de respectivement 20 et 80 %.

Les particules denses de BCP

Les particules de BCP ont une taille comprise entre 140 et 200 µm. Elles possèdent la même composition que les disques et les granules (HA/β-TCP, 20/80) car préparées à partir des mêmes poudres dans les mêmes conditions de frittage mais sans addition de porogènes. En conséquence ces particules possédaient la même microporosité de surface mais ne possédaient pas de macropores (figures 10C). Ces petites particules étaient denses et de forme ovoïde. Elles ont été préparées à partir de particules ayant une taille comprise entre 80 et 200 µm. Ces particules ont ensuite été tamisées pour obtenir une fraction de particules avec un diamètre compris entre 140 à 200 µm. Cette fraction a ensuite été stérilisée avec un autoclave (alphaklave23, HMCE, Taillis, France) à 121°C durant 20 min. L’analyse de la composition et de la microporosité de surface effectuée avant et après la stérilisation n’a montré aucune différence. La porosimétrie à intrusion de mercure ($> 10 \mu\text{m}$) a pu mettre en évidence une surface représentant $863 \pm 72 \text{ cm}^2/\text{g}$ pour ces particules.

Les billes de verres

Des billes de verre de silicate ayant un diamètre compris entre 150 et 200 µm ont été utilisées lors de ces travaux (figure 10D). Ces billes de verres dites inertes (car elles n’interagissent pas avec les fluides biologiques) proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) et ont été stérilisées à l’aide d’un autoclave (alphaklave23) 20 min à 121°C.



Caractérisation des biomatériaux

La microscopie électronique à balayage (MEB)

Les différentes surfaces utilisées ont pu être caractérisées par microscopie électronique à balayage. Le microscope électronique à balayage (MEB) est un instrument permettant l'observation de la topographie des surfaces. Cette technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires, de très faible énergie, produits suite au bombardement d'un « pinceau », quasi parallèle et très fin (jusqu'à quelques nanomètres), d'électrons primaires qui balayent la surface de l'échantillon observé. Ces électrons secondaires sont amplifiés, détectés puis interprétés pour reconstruire une image en fonction de l'intensité du courant électrique produit (figure 11). Le MEB réalise donc une topographie de l'échantillon à analyser, c'est pourquoi il fournit des images en noir et blanc où chaque nuance de gris est le résultat de l'intensité du courant détecté. Le MEB permet l'obtention d'images de très haute résolution avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ.

Un MEB est composé des différents éléments suivants :

-Un canon à électron qui envoie un faisceau d'électrons (source d'électrons primaire) correspondant à un filament de tungstène parcouru par un courant de chauffage.

-Une lentille magnétique qui focalise les électrons comme peut le faire une lentille optique avec la lumière de manière à obtenir un faisceau très fin et focalisé.

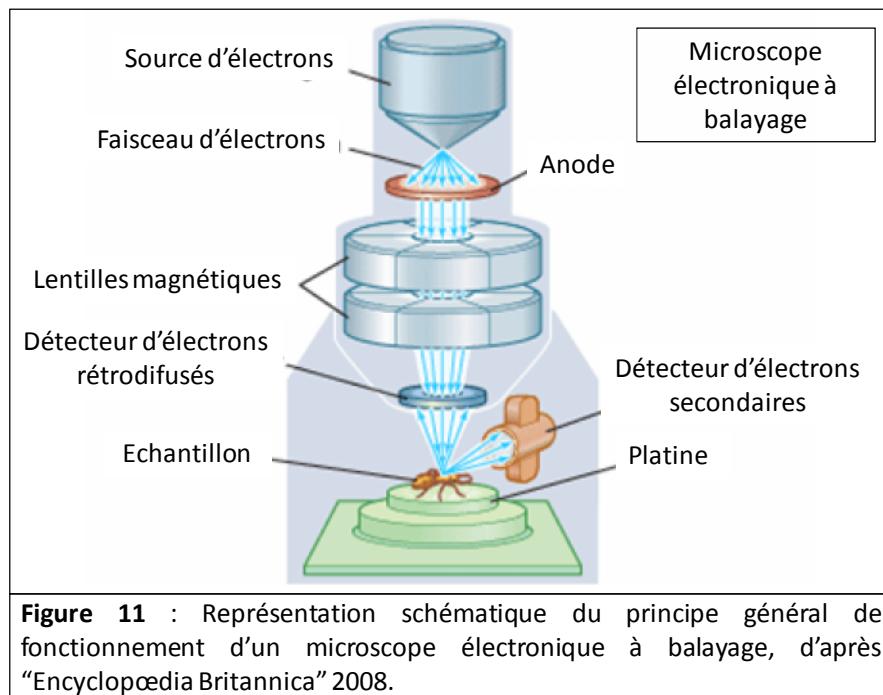
-Des bobines de balayage permettant de balayer la surface de l'échantillon à observer avec le faisceau d'électrons. Ces bobines sont positionnées perpendiculairement de manière à faire parcourir des lignes au faisceau.

-Une pompe à vide permettant de faire le vide dans l'enceinte où se trouve l'échantillon. En effet, pour obtenir une mesure précise, il est important de faire le vide dans l'enceinte (environ 10^{-3} Pascal).

-Une platine porte-objet mobile permettant de déplacer l'échantillon dans les trois plans de l'espace.

-Un détecteur permettant de détecter les électrons secondaires. Les électrons secondaires sont « captés » grâce à un champ électrique positif d'environ 500 Volts de manière à diriger les électrons vers un scintillateur convertissant ces derniers en photons. Les photons ainsi produits sont envoyés vers un photomultiplicateur via une fibre optique pour retransformer les photons en un nombre important d'électrons qui sera mesurable par un dispositif électronique classique. Ce type de détecteur est utilisé pour faire de l'imagerie en

électron secondaire mais il existe d'autres techniques d'imagerie comme l'imagerie en diffraction d'électrons rétrodiffusés (BSEM) ou l'imagerie en courant d'échantillon (EBIC).



La microscopie électronique à balayage utilise donc deux principales sources d'électrons d'énergie différente permettant d'obtenir des images en fonction de ce que l'on cherche à mettre en évidence :

- ✓ Les électrons secondaires qui sont de faible énergie cinétique et devent être émis près de la surface de l'échantillon pour qu'ils ressortent du solide. De ce fait, ils sont très sensibles à la topographie de l'échantillon et permettent de reproduire une image de très haute fidélité.
- ✓ Les électrons rétrodiffusés, d'énergie cinétique élevée. Le détecteur d'électrons rétrodiffusés est généralement placé à la verticale de l'échantillon dans l'axe du faisceau (afin de récolter le maximum d'électrons rétrodiffusés) et donc ne permet pas une très bonne vision du relief. Cependant, ces électrons permettent de distinguer les différences de densité et de discriminer les différents matériaux de l'échantillon.

Préparation des échantillons

Les différents biomatériaux ont été métallisés, c'est-à-dire recouvert d'une fine couche d'or palladium à l'aide d'un métalliseur Denton Vacuum LLC (Desk III, Moorestown, NJ) à 20 mA pendant 4 min. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'enceinte du MEB (LEO

1450, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) suivi par la mise en place du vide et de l'observation des échantillons. Les observations de topographie de surface ont été réalisées à faible et fort grossissement afin d'évaluer la macro- et la microporosité des biomatériaux. Les paramètres utilisés lors de ces observations sont un courant de sonde de 2 pA, une tension d'accélération de 15 kV et une distance de travail aux alentours de 12 mm.

La microscopie par énergie dispersive de rayons X (EDX)

L'utilisation de la microscopie par énergie dispersive de rayons X permet d'analyser la composition chimique de nos échantillons par détection des raies d'émission caractéristiques des éléments en présence. Cette technique développée par Castaing en 1951 est basée sur l'analyse de l'énergie des rayons X émis lors de la désexcitation d'un atome. En effet l'échantillon va être bombardé d'électrons dont certains vont céder une partie de leur énergie cinétique à l'atome, provoquant l'éjection d'un électron de l'atome ; l'atome est dit « excité ». Si l'électron éjecté est proche du cœur, un électron périphérique va descendre (l'atome se désexcite), et ce faisant, il va émettre un photon. Du fait de l'énergie de transition, ce photon va appartenir au domaine X. Le photon est alors analysé et comptabilisé en fonction de son énergie. Cette énergie est caractéristique d'une transition électronique c'est-à-dire spécifique à une espèce chimique donnée. Par étalonnage avec des spectres connus, la composition chimique de la surface du matériau analysé peut être déterminée.

Préparation des échantillons

Les différents échantillons ont été recouverts d'une fine couche de carbone à l'aide d'un Cressington carbon coater (108carbon/A). Les échantillons ont ensuite été placés dans l'enceinte du MEB (LEO 1450) suivi par la mise en place du vide et de l'observation des échantillons.

Les cellules

Les cellules souches mésenchymateuses

Cellules d'origine humaine

Les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) nous ont été fournies par l'établissement français du sang (EFS) dans le cadre d'une collaboration avec le docteur. Luc

Sensebé, directeur scientifique et médical de l'EFS Centre-Atlantique et le professeur Philippe Rosset, chirurgien orthopédique de l'hôpital Troussseau du CHRU de Tours.

Les cellules provenaient de moelles osseuses de patients ayant donné leur consentement après qu'ils aient reçu toutes les informations requises et après l'approbation du comité éthique de l'hôpital Troussseau. Toutes les données personnelles relatives aux patients sont restées confidentielles. Les moelles osseuses ont été ponctionnées sur des donneurs sains au niveau des crêtes iliaques lors de procédures chirurgicales (prothèses totales de hache pour coxarthrose) permettant leur exposition. L'aspiration de la moelle osseuse de la crête iliaque a été réalisée en percutané à l'aide d'un trocart de Jamshidi®. Le volume prélevé (5 à 20 ml) a été récupéré dans une seringue en plastique de 20 centimètres cubes contenant 1 ml d'héparine (15000 UI) afin d'éviter la coagulation.

Les moelles osseuses prélevées ont ensuite été diluées dans un même volume de milieu, appelé milieu d'amplification, correspondant à de l'alpha-modified Eagle's medium (α-MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 2 mM de L-glutamine (Gibco, Invitrogen), 100 U/ml de pénicilline (Gibco), 100 U/ml de streptomycine (Gibco), 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone, South Logan, UT) ainsi que 1 ng/ml de facteur de croissance fibroblastique (FGF-2, R&D Systems, Minneapolis, MN). Un petit volume (10 µl) a alors été prélevé afin de compter le nombre de cellules mononucléées. Après comptage, les cellules ont été ensemencées à raison de 1.10^5 cellules mononucléées par cm^2 dans des flasques en plastique traitées pour la culture puis placées dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO₂. Après 2 à 3 jours d'incubation, le surnageant de culture a été aspiré afin d'éliminer les cellules non adhérentes (majoritairement des globules rouges) puis remplacé par 12 ml de milieu d'amplification. Par la suite, le milieu a été rafraîchi tous les 2 jours. La formation de colonies (CFU) a été contrôlée durant une période de 10 à 15 jours après quoi les colonies ayant atteint une taille convenable ont été détachées enzymatiquement à l'aide de trypsine/EDTA à 0,25 % (Lonza, Basel, Suisse) durant 3 min à 37°C. Les cellules ainsi détachées ont alors pu être congelées jusqu'à leur utilisation ou amplifiées avant d'être ensemencées sur différents supports pour les expérimentations. Les cellules destinées à être amplifiées ont été ensemencées à raison de 1.10^4 cellules/ cm^2 et cultivées jusqu'au deuxième passage. Les cellules destinées à être conservées ont été centrifugées à 1500 tours/min pendant 5 min afin de récupérer le culot et de le reprendre dans du SVF contenant 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich). La suspension cellulaire a alors été répartie dans des cryotubes à raison de 2 millions de cellules par tubes. Ces tubes ont été placés 24h dans une boîte de congélation contenant de l'isopropanol afin de permettre une congélation lente des cellules

(1°C/min). Les cryotubes ont ensuite été transférés et maintenus dans un conteneur d'azote liquide à une température de -196°C jusqu'à utilisation.

Les cellules de brebis

Les cellules souches mésenchymateuses de brebis ont été prélevées de la même manière que pour les cellules humaines. La moelle osseuse a été aspirée au niveau de la crête iliaque avant d'être préparée de la même façon que les cellules humaines, à savoir une dilution dans un même volume de milieu d'amplification puis un ensemencement dans des flasques de culture à raison de 1.10^5 cellules mononucléées/cm². Les cellules ont ensuite été amplifiées dans un milieu d'amplification rafraîchi tous les 3 jours dans une atmosphère humide composée de 95 % d'air et 5 % CO₂ à une température de 37°C. Les cellules ont ensuite été cryopréservées dans de l'azote liquide jusqu'à leur utilisation, comme décrit précédemment, avec une solution de SVF contenant 10 % de DMSO.

Caractérisation des cellules

Afin de vérifier le caractère souche de ces cellules, différents marqueurs membranaires connus comme étant spécifiques des cellules souches ont été testés ainsi que la différenciation de ces cellules vers les trois principales lignées que sont les chondrocytes, les adipocytes et les ostéoblastes.

La cytométrie en flux

Cette technique permet d'étudier de nombreux caractères et l'expression protéique intracellulaire mais également les protéines exprimées à la surface de ces cellules. Les CSM isolées à partir du prélèvement de moelle osseuse comme décrit précédemment ont été cultivées jusqu'à 80 % de confluence. Elles ont ensuite été détachées enzymatiquement de leur support à l'aide de trypsine/EDTA qui a été neutralisée par l'ajout d'un même volume de milieu. Cette suspension cellulaire a alors été centrifugée (1500 tours/min pendant 5 min) afin d'en éliminer la trypsine/EDTA et de ne conserver que le culot cellulaire. Ce culot a ensuite été remis en suspension dans un tampon phosphate salin (PBS 1X) supplémenté avec 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) permettant la survie des cellules et contenant l'anticorps fluorescent (conjugué à la phycoerythrine (PE)) (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) dirigé contre la protéine d'intérêt (Tableau 1). Un anticorps isotopique non pertinent a été utilisé comme contrôle négatif. Pour les anticorps primaires non conjugués, l'utilisation d'un

anticorps secondaire a été nécessaire. Cet anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire était lui conjugué à une molécule de détection (peroxydase, fluorochrome). Après incubation sur glace pendant 20 min, les cellules ont été analysées par un cytomètre en flux FACSCalibur (Becton-Dickinson). Les cellules ont été aspirées par un système de pompe puis envoyées une à une devant un faisceau laser argon de 488 nm qui a permis de détecter, de manière spécifique, la fluorescence et donc la présence des protéines recherchées. Les échantillons ont été analysés en collectant plus de 30000 événements à l'aide du logiciel Cell-Quest (Becton-Dickinson).

Anticorps Primaire	Dilution	Conjugué	Fabricant	Produit
Anti-humain CD45	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD14	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD73	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD90	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD105	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD146	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain CD166	1/100	Phycoerythrine (PE)	Becton-Dickinson	Souris
Anti-humain ALPL	1/100	Phycoerythrine (PE)	R&D Systems	Souris
Anti-phosphorylated Smad1/5	1/200	-	Cell Signaling	Lapin
Anti-mouton CD45	1/10	Phycoerythrine (PE)	AbD Serotec	Souris
Anti-mouton CD14	1/10	Phycoerythrine (PE)	AbD Serotec	Souris
Anti-mouton CD44	1/10	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	AbD Serotec	Souris
Anti-mouton CD31	1/10	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	AbD Serotec	Souris
Anticorps Secondaires	Dilution	Conjugué	Fabricant	Produit
Anti-Lapin IgG	1/1000	Alexa Fluor® 488	Cell Signaling	Chèvre

Tableau 1 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.

Multipotence des cellules souches mésenchymateuses

Après avoir vérifié le phénotype des cellules isolées de la moelle osseuse, nous avons testé leur capacité à se différencier vers les 3 lignées cellulaires prépondérantes que sont les adipocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes afin de s'assurer que nous étions bien en présence de CSM (figure 12). Les cellules ont été cultivées dans des milieux de

différenciation spécifique aux trois voies ainsi que dans un milieu de prolifération, servant de contrôle, correspondant au milieu d'amplification sans ajout de FGF-2.

Différenciation adipocytaire

Les CSM ont été cultivées dans des chambres de culture stérile (Lab-tek, Nalge Nunc, Rochester, NY) jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence après quoi leur différenciation par un milieu adipocytaire a été induite. Ce milieu, pour les cellules humaines, était composé de Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) contenant 1M glucose, 10 % de SVF (Hyclone), 100 U/ml de pénicilline/streptomycine (P/S, Gibco) 0,5 mM de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX, Invitrogen) 60 μ M d'indométacine (Sigma-Aldrich) et 10^{-6} M de déexaméthasone (dex, Invitrogen). Ce milieu était légèrement différent pour les CSM de brebis et se composait de DMEM contenant 1 M de glucose, 10 % de SVF, 100 U/ml de P/S, 2 mM de β -glycérophosphate (β -gly, Invitrogen), 0,17 mM d'acide ascorbique (a.a, Sigma-Aldrich), 10^{-7} M de dex et de 100 ng/ml de la protéine morphogénétique osseuse humaine 2 (hBMP-2, R&D Systems). Après 8 à 10 jours de différenciation, les cellules ont été fixées dans une solution de PBS 1X contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA) pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS 1X avant d'être incubées avec 300 μ l/puits de solution de rouge de Nil à 4°C pendant 30 min à l'abri de la lumière. Les casiers des chambres de culture ont ensuite été retirés et une goutte de 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) par chambre a été déposée avant de recouvrir les échantillons d'une lamelle (figure 12E). Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Carl Zeiss).

Différenciation chondrocytaire

Les CSM ont été cultivées dans des flasques de culture jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 80 % de confluence. Une fois ce degré de confluence atteint, elles ont été enzymatiquement détachées des flasques (comme vu précédemment) puis centrifugées à 1500 tours/min pendant 5 min. Le culot a ensuite été repris dans du milieu de différenciation chondrogénique dans des tubes de 15 ml puis à nouveau centrifugé à 1500 tours/min mais cette fois pendant 10 min. Les tubes contenant les culots ont été mis à l'étuve (37°C, 5 % CO₂). Le milieu de différenciation chondrogénique était composé de DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, 100 U/ml de P/S, 10^{-8} M de dex, 2 mM de sodium pyruvate, 0,17 mM d'a.a., 35 mM de proline, de l'ITS 1X (insuline 10 μ g/ml, transferrine 10 μ g/ml et sodium sélénite 10ng/ml, ITS, Sigma-Aldrich) et enfin, d'un ajout extemporané de 10 ng/ml de transforming

growth factor-*bêta* 1 (TGF- β 1, R&D Systems). Ce milieu est renouvelé tous les 3 jours pendant 21 jours. Après cette période de culture, les cellules sous forme de petites billes ont été fixées dans du PBS 1X contenant 4 % de PFA à 4°C pendant 24h. Elles ont ensuite été rincées au PBS 1X puis incubées dans du PBS 1X à 4°C pendant 30 min. Elles ont été déshydratées dans des bains graduels d'éthanol (75, 80, 90, 95, 100 %), chaque bain étant réalisé à 4°C pour une durée de 30 min. Enfin, elles ont été placées dans un bain de xylène (Invitrogen) à 4°C pendant 30min. Elles ont ensuite été incluses dans de la paraffine avant de réaliser des coupes sur lames. Les lames ont été réhydratées par des bains successifs de 10 min (xylène, alcool 100, 95, 90, 80, 75 %) puis placées dans de l'eau distillée. Les lames ont alors été colorées à l'aide de colorants tels que le Safranine O (mis en évidence des protéoglycans et glycosaminoglycans) ou le bleu alcian (mis en évidence des glycosaminoglycans) (figure 12D) avant d'être déshydratées comme vu précédemment. Une lamelle a alors été déposée sur la lame avant de l'observer à l'aide d'un microscope photonique (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Différenciation ostéoblastique

Les cellules ont été cultivées dans des chambres de culture stériles (Lab-tek) jusqu'à ce qu'elles aient atteint la confluence puis différencier. Le milieu de différenciation ostéogénique était composé de α -MEM contenant 10 % de SVF, 100 U/ml de P/S, 10 mM de β -gly, 0,2 mM d'a.a., 10^{-8} M de dex. D'autres milieux ont été utilisés afin d'induire la différenciation des CSM humaines. Ces milieux à base de α -MEM contenaient 10 % ou 2 % de SVF et étaient supplémentés de façon extemporanée de 50 ng/ml de BMP-2, 4 ou 7 (R&D Systems). Le milieu de culture était renouvelé tous les 3 jours pendant une période de culture de 21 jours. Après cette période de culture, les cellules ont été fixées dans du PBS 1X contenant 4 % de PFA pendant 10 min à 4°C puis rincées à l'eau distillée. A cette étape, différentes solutions ont pu être ajoutées sur le tapis cellulaire afin de mettre en évidence la différenciation ostéoblastique des CSM.

Coloration Von Kossa.

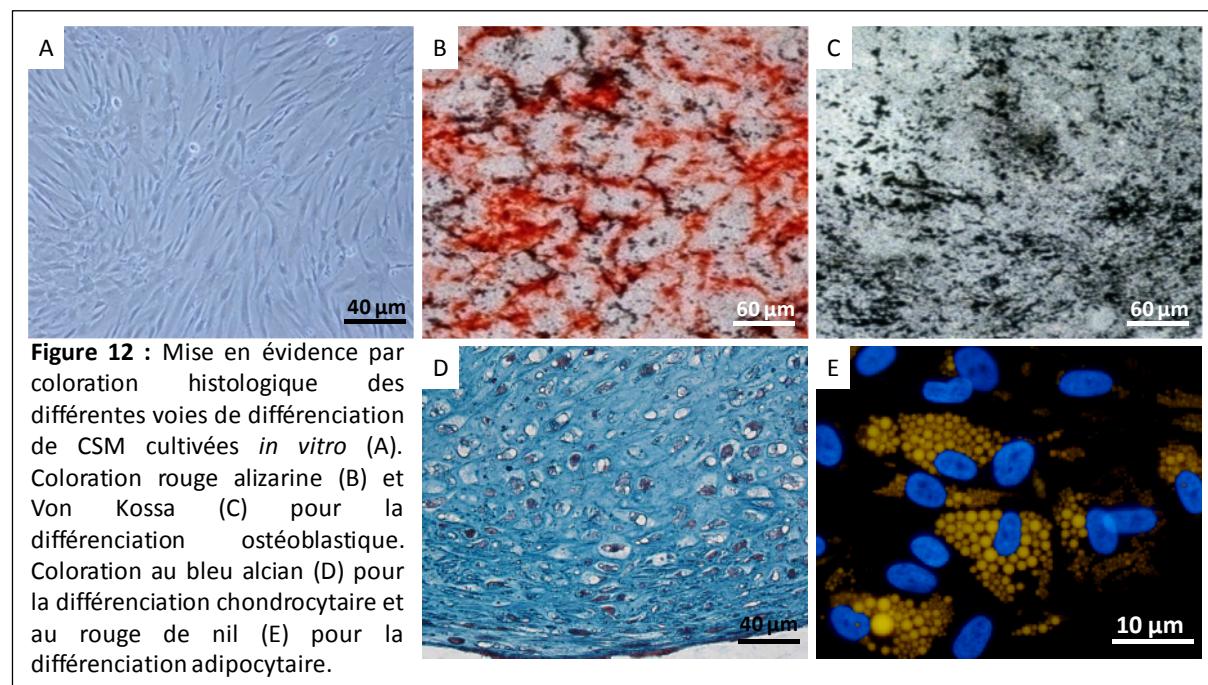
Cette coloration permet de mettre en évidence la minéralisation de la matrice osseuse. Elle révèle les sels de calcium (phosphate, carbonate, sulfate et oxalate) en le substituant par un cation métallique, le nitrate d'argent, qui après réduction par des U.V. aboutit à une coloration noire.

Une solution aqueuse de nitrate d'argent à 5 % (Sigma-Aldrich) a été ajoutée dans chaque puits pendant 30 min à l'abri de la lumière. Les échantillons ont ensuite été abondamment rincés à l'eau distillée. La révélation s'est faite par exposition des échantillons à une lumière U.V. entre 5 min et 1 h en fonction de l'apparition de la coloration noire (figure 12C). Les échantillons ont ensuite été abondamment rincés avant d'être observés par microscopie photonique (Leica Microsystems).

Coloration rouge alizarine.

Cette seconde technique permet de révéler les dépôts de calcium durant le processus de différenciation ostéoblastique et donc la minéralisation de la matrice extracellulaire. Lors de cette coloration, le calcium est complexé par chélation sous la forme d'un complexe rouge, complexe « rouge alizarine/calcium ».

Une solution de rouge alizarine ajusté avec de la soude à un pH 4,2 a été ajoutée dans chacun des puits durant une période de 30 sec à 5 min en fonction de l'apparition d'une coloration rouge/orangée (figure 12B). Les échantillons étaient ensuite abondamment rincés à l'eau distillée puis observés par microscopie photonique (Leica Microsystems).



Culture des CSM sur les biomatériaux

L'ensemencement des CSM sur les céramiques phosphocalciques biphasées

Afin de minimiser la libération d'ions dans le milieu de culture, les céramiques phosphocalciques biphasées (BCP) ont été préincubées 48 h dans du milieu de prolifération renouvelé de façon journalière avant l'ensemencement des cellules.

Les disques macroporeux

Les CSM ont été ensemencées sur les disques de BCP à raison de 7.10^5 cellules (figure 13E et F). Ceci correspondait à une densité cellulaire de 15000 cellules/cm². Une suspension cellulaire de 200 µl contenant les cellules a été déposée à la surface des disques pendant environ 1 h afin de laisser le temps à cette suspension cellulaire d'être « absorbées » au niveau du BCP et de laisser du temps aux cellules pour y adhérer. Après cette période, 1 ml de milieu spécifique de chaque condition a été ajouté sur chaque échantillon afin de le recouvrir et d'apporter les nutriments nécessaires à la survie cellulaire. Ce milieu était ensuite renouvelé tous les 3 jours pendant toute la période de culture.

Les granules macroporeuses

Les granules 2-4 mm ont été utilisés lors des expériences réalisées chez la brebis. Ces granules n'ont pas été préincubés 48 h avant l'association avec les cellules mais 1 h avec du milieu de culture sans sérum dans le bloc opératoire. Cent millions de CSM décongelées ont été remises en suspension dans 4 ml de solution saline contenant de l'albumine avant de les associer à 5 cm³ de granules de BCP dans un tube stérile de 50 ml pendant 1 h à température ambiante. Cette association a été effectuée juste avant l'implantation de cette solution CSM/granules de BCP au niveau du défaut osseux. Pour évaluer l'adhésion et la prolifération cellulaire, ces granules ont également été associés *in vitro* avec des cellules de brebis cultivées pendant 1 ou 21 jours (Figure 13C et D).

Les particules denses

Les particules de BCP de diamètre 140 à 200 µm ne présentant pas de macroporosité ont été utilisées lors des travaux développés dans le chapitre 5. Une suspension cellulaire de 500 µl de milieu contenant $4,5.10^5$ cellules a été ensemencée sur 35 mg de particules de BCP dans des plaques 24 trous d'ultra faible attachement afin que les cellules ne puissent adhérer

que sur les particules. Après 24h d'incubation dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % de CO₂, 1 ml de milieu de culture spécifique des conditions de culture était ajouté dans chacun des puits puis renouvelé tous les 2 jours pendant toute la période de culture. Cette quantité de 35 mg formait une monocouche de particules qui permettait de recouvrir entièrement et uniformément le fond du puits d'une plaque 24 puits (figure 13A et B). Cette monocouche de particules représentait une surface de 30 cm² et donc une densité d'ensemencement de 15000 cellules/cm².

Une même densité cellulaire a été utilisée sur un nombre plus important de particules. Une suspension cellulaire de 1 ml de milieu contenant 2.10⁶ cellules a été ensemencée sur 160 mg de particules dans des plaques 6 puits d'ultra faible attachement. Comme précédemment, après 24 h d'incubation, 2 ml de milieu de culture spécifique était ajouté dans chacun des puits et renouvelé tous les 2 jours pendant la période de culture. Cette quantité de 160 mg représentait une monocouche de particules recouvrant entièrement et uniformément le fond d'un puits d'une plaque 6 puits. Cette monocouche de particule représentait une surface d'environ 137 cm² et correspondait à une densité de 15000 cellules/cm². Cette association cellules/particules de BCP nous a permis d'obtenir des hybrides équivalents à ceux obtenus avec de plus petites quantités de cellules et de particules mais de taille plus importante. Ceci a été effectué dans le but de se procurer une quantité de matériel protéique et génétique suffisant pour les expériences de biologie moléculaire.

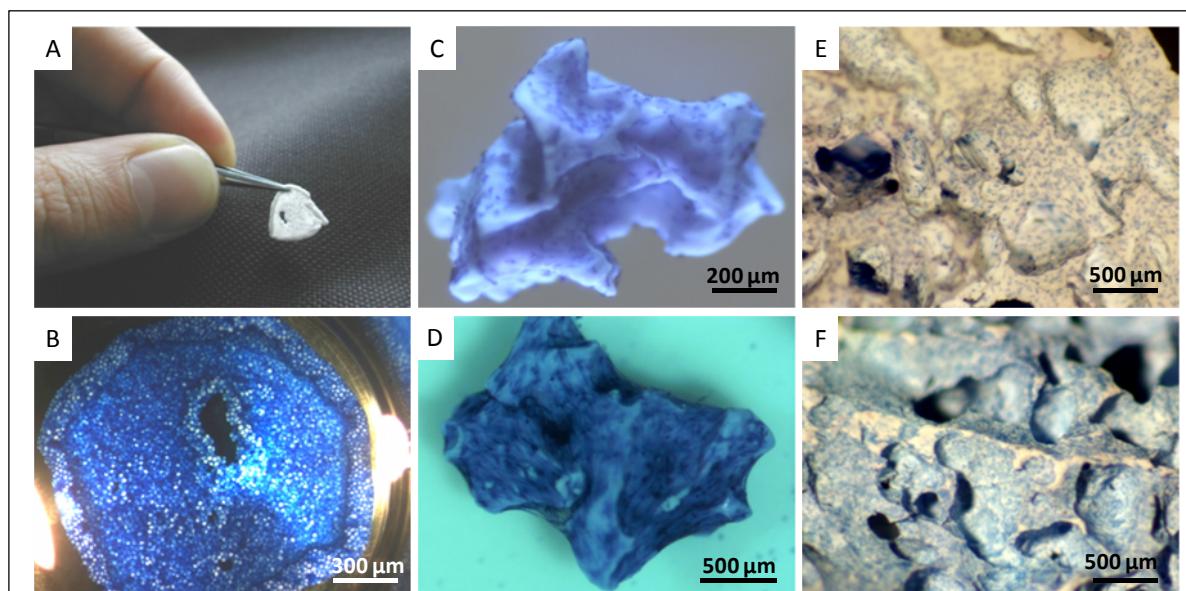


Figure 13 : Culture de CSM sur des céramiques de BCP de granulométrie différente. Les CSM cultivées après 2 jours sur de petites particules denses (140-200 μm) forment un hybride 3D solide (A) avec une densité cellulaire importante mise en évidence par coloration au bleu de méthylène (B). Les CSM ont été ensemencées sur des céramiques de BCP macroporeuses [granules 2-4 mm (C, D) et disques 8 mm (E, F)] à une densité similaire et cultivées 1 (C, E) ou 21 jours (D, F) puis colorées au bleu de méthylène.

Les billes de verres

Une suspension de 500 μ l de milieu contenant $4,5.10^5$ cellules a été ensemencée sur 35 mg de billes de verre (15000 cellules/cm²) dans des plaques 24 puits d'ultra faible attachement de la même façon que vu précédemment pour les particules de BCP. Après 24h d'incubation dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % de CO₂, 1 ml de milieu de culture spécifique a été ajouté dans chacun des puits et renouvelé tous les 2 jours pendant la période de culture.

Là aussi, des associations impliquant de plus grandes quantités de cellules et de biomatériaux ont été réalisées afin d'obtenir un matériel génétique et protéique suffisant à la réalisation d'expériences de biologie moléculaire. Comme précédemment, une suspension cellulaire de 1 ml contenant 2.10^6 cellules a été déposée sur 160 mg de bille de verres. Les hybrides cellules/billes de verre ainsi obtenu étaient similaires à ceux obtenus avec les quantités plus faibles de cellules et de biomatériaux.

Etude de la prolifération

Le profil de prolifération des cellules a été évalué par un test au bleu d'alamar (bioSource, Camillo, CA). Le bleu d'alamar permet d'évaluer la prolifération cellulaire de façon non létale et avec une très haute sensibilité [285]. Le bleu d'alamar oxydé non fluorescent de couleur bleu est réduit en un colorant rose fluorescent par l'activité cellulaire. Une lecture de la fluorescence nous a permis d'évaluer la prolifération cellulaire.

Les échantillons ont donc été cultivés pendant 21 jours dans du milieu de prolifération ou de différenciation ostéogénique et des mesures ont été effectuées à différents temps (1, 4, 7, 14 et 21 jours). Les échantillons réalisés en triplicata ont tout d'abord été rincés avec du PBS 1X avant d'être incubés avec 500 μ l (plaqué 24 puits) ou 2 ml (plaqué 6 puits) d'une solution de PBS 1X supplémentée avec 10 % de solution de bleu d'alamar. Après 45 min d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂ à l'abri de la lumière, 200 μ l de surnageant ont été prélevés en dupliquat pour chacun des échantillons et transférés dans des plaques 96 puits opaques avant d'être mesurés à l'aide d'un lecteur de multiplaques fluorescent (tristar LB941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne). Le signal obtenu pour les échantillons a été corrélé à celui d'une courbe standard obtenue à partir de cellules provenant du même donneur et cultivées à des densités croissantes dans des plaques en plastique traitées culture. Les CSM cultivées sur plastique dans du milieu de prolifération ont subi le même protocole d'incubation au bleu d'alamar que les échantillons et les mêmes paramètres de lecture ont été

conservés. Les cellules utilisées pour réalisées cette gamme ont été ensemencées 12 h avant de réaliser la lecture afin d'obtenir un stade de prolifération métabolique précoce.

Effet des différents modes de culture sur la différenciation des CSM

Etude de l'expression génique

La RT-PCR en temps réel a été utilisée afin d'évaluer l'expression relative de gènes caractéristiques de l'engagement des CSM vers la voie ostéoblastique.

Extraction des ARN

Deux méthodes ont été utilisées afin d'extraire les ARN durant ces travaux. Ces deux méthodes ont montré une bonne efficacité avec une légère supériorité dans la seconde méthode utilisant un kit d'extraction en ce qui concerne la pureté des ARN totaux extraits.

La méthode d'extraction au TRIzol® (Invitrogen) a été réalisée selon les instructions du fabricant. Brièvement, 1 ml de TRIzol® a été ajouté dans chaque puits (plaqué 6 puits) puis chaque tapis cellulaire a été détaché mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile avant d'être transféré dans un tube de 1,5 ml. Pour les cellules cultivées sur les biomatériaux, le complexe cellules/biomatériau était directement transféré à l'aide d'une spatule ou d'une pince stérile dans un tube de 1,5 ml contenant 1 ml de TRIzol®. Les tubes ont été très vigoureusement agités à l'aide d'un vortex afin de lyser les cellules. Une première centrifugation légère (1500 tours/min pendant 1 à 2 min) nous a permis de récupérer uniquement le surnageant afin d'éliminer les biomatériaux et le plus gros des débris cellulaires. Une deuxième centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4°C en présence de chloroforme permettait l'élimination du reste des débris cellulaires et de séparer la phase contenant l'ARN des autres phases contenant l'ADN et les protéines. La phase supérieure aqueuse contenant l'ARN solubilisé a ainsi été récupérée. Les ARN totaux ont ensuite été précipités par l'ajout d'isopropanol et une centrifugation de 10 min à 4°C et 7500 g a permis d'éliminer le surnageant et de ne conserver que le culot d'ARN. Les culots ont ensuite été lavés avec de l'éthanol froid à 75 % puis séchés et repris dans de l'eau stérile avant d'être quantifiés à l'aide d'un nanodrop (lecture d'absorbance à 280 nm). Les ARN ainsi purifiés ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Une seconde méthode d'extraction a été utilisée. Cette méthode a été effectuée à l'aide du kit d'extraction d'ARN RNeasy Mini® selon les instructions du fabricant (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Brièvement, les cellules cultivées sur plastique ont été détachées mécaniquement à

l'aide d'un grattoir stérile dans un volume de 350 µl de tampon de lyse RLT puis transférés dans des tubes 1,5 ml. Les hybrides cellules/biomatériaux ont directement été transférés dans des tubes de 1,5 ml contenant 350 µl de tampon RLT. Les tubes ont été vigoureusement agités à l'aide d'un vortex puis le lysat a été transféré dans une colonne (QIAshredder), elle-même disposée dans un tube collecteur de 2 ml. Le tout a été centrifugé pendant 2 min à vitesse maximale. Le lysat récupéré dans le tube collecteur a été homogénéisé avec un même volume d'éthanol à 70 % puis transféré dans une seconde colonne (RNeasy) disposée dans un tube collecteur de 2 ml. Une centrifugation de 15 secs à 10000 tours/min permettait d'éliminer le tampon RLT qui se retrouvait dans le tube collecteur. Un tampon de lavage (RW1) a été ajouté à raison de 700 µl dans la colonne (RNeasy). Une centrifugation de 15 secs à 10000 tours/min permettait d'éliminer ce tampon de lavage. Deux lavages successifs ont ensuite été effectués avec l'ajout dans la colonne RNeasy de 500 µl de tampon RPE. Ces deux solutions de tampon ont été éliminées par deux centrifugations successives de respectivement 15 secs et 2 min à 10000 tours/min. Les colonnes RNeasy ont ensuite été placées dans un tube collecteur de 1,5 ml et l'ARN et éluée par l'ajout de 30 µl d'eau sans RNase directement déposés sur la membrane de la colonne puis récupérés par une centrifugation d'1 min à 10000 tours/min. Les ARN ainsi purifiés ont alors été quantifiés puis stockés comme décrit précédemment.

La rétrotranscription (RT)

L'objectif de la transcription inverse ou rétrotranscription (RT) est de convertir les ARN totaux purifiés en ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est possible grâce à l'action d'une enzyme, la MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-RetroTranscriptase) (Promega, Madison, WI) capable de synthétiser un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN.

La RT a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux à l'aide d'un kit PrimeScript™ Takara (Lonza) selon les instructions du fabricant. Brièvement, cet ARN a été mixé à une solution contenant 50 pmol d'hexamères aléatoires (Random Hexamers), 1 µl de mix dNTP, et de l'eau stérile sans RNase pour obtenir un volume final de 10 µl. Cette solution était chauffée 5 min à 65°C puis déposée immédiatement sur glace. A cette solution de 10 µl ont ensuite été ajoutés 4 µl de tampon PrimeScript™ (5X), 20 unités d'inhibiteur des RNases, 200 unités d'enzyme PrimeScript™ de rétrotranscription (RT) et de l'eau stérile sans RNase pour obtenir un volume final de 20 µl. Cette solution était alors agitée délicatement puis chauffée 10 min à 30°C, 50 min à 42°C et enfin chauffé 5 min à 95°C pour inactiver l'enzyme avant d'être mise sur glace et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation pour les PCR en temps réel.

PCR en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR) est utilisée pour réaliser l'amplification génique d'une séquence d'ADN donnée. Cette amplification est possible grâce à l'utilisation d'une enzyme, l'ADN polymérase, qui est capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir d'une amorce. L'enzyme utilisée lors de nos expériences est la Taq polymérase, une enzyme extraite de la bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, vivant à proximité des sources d'eaux chaudes (de 50 à 80°C). Cette ADN polymérase thermorésistante dont la température optimale de travail est de 72 °C est capable de résister à des températures supérieures à 95°C. Cette propriété a rendu possible le développement et l'automatisation de la PCR. La Taq polymérase permet l'elongation de l'ADN à partir de 2 amores conçues pour délimiter la séquence d'ADN spécifique d'un gène que l'on souhaite amplifier (une amorce sens et une autre antisens). L'ADN polymérase synthétise de façon exclusive des brins d'ADNc à partir de ces amores grâce aux éléments de base présents dans le mix que sont les dNTPs. La PCR permet, grâce à de nombreux cycles, d'amplifier des séquences d'ADNc d'intérêts présentes en quantités infinitésimales. Le profil d'amplification que nous avons utilisé est le suivant :

Une première étape de dénaturation a été effectuée à 95°C pendant 10 min puis s'ensuivent 39 cycles selon le schéma suivant (figure 14) :

1°) Dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95 °C pendant 30 sec

2°) Hybridation des amores à 60°C pendant 1 min

3°) Elongation des brins complémentaires à 72 °C pendant 30 sec

Au fil des cycles, la quantité du double brin d'ADN délimité par les amores augmente de façon exponentielle, en théorie 2^n copies pour n cycles de PCR. Mais en pratique, cette quantité dépend de l'efficacité de la réaction de PCR. Pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produira environ 10^6 copies d'amplicons de taille attendue.

Contrairement à la PCR classique qui ne permet d'obtenir une quantité d'ADNc qu'à la fin de la réaction, la PCR en temps réel permet de suivre, comme son nom l'indique, l'augmentation de la quantité d'ADNc en temps réel. Le principe de la PCR en temps réel repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes qui peuvent se fixer à l'ADN double brin, comme c'est le cas pour la SYBRgreen que nous avons utilisée (figure 14) ou se fixent à une séquence d'ADN spécifique (Taqman ou Beacon).

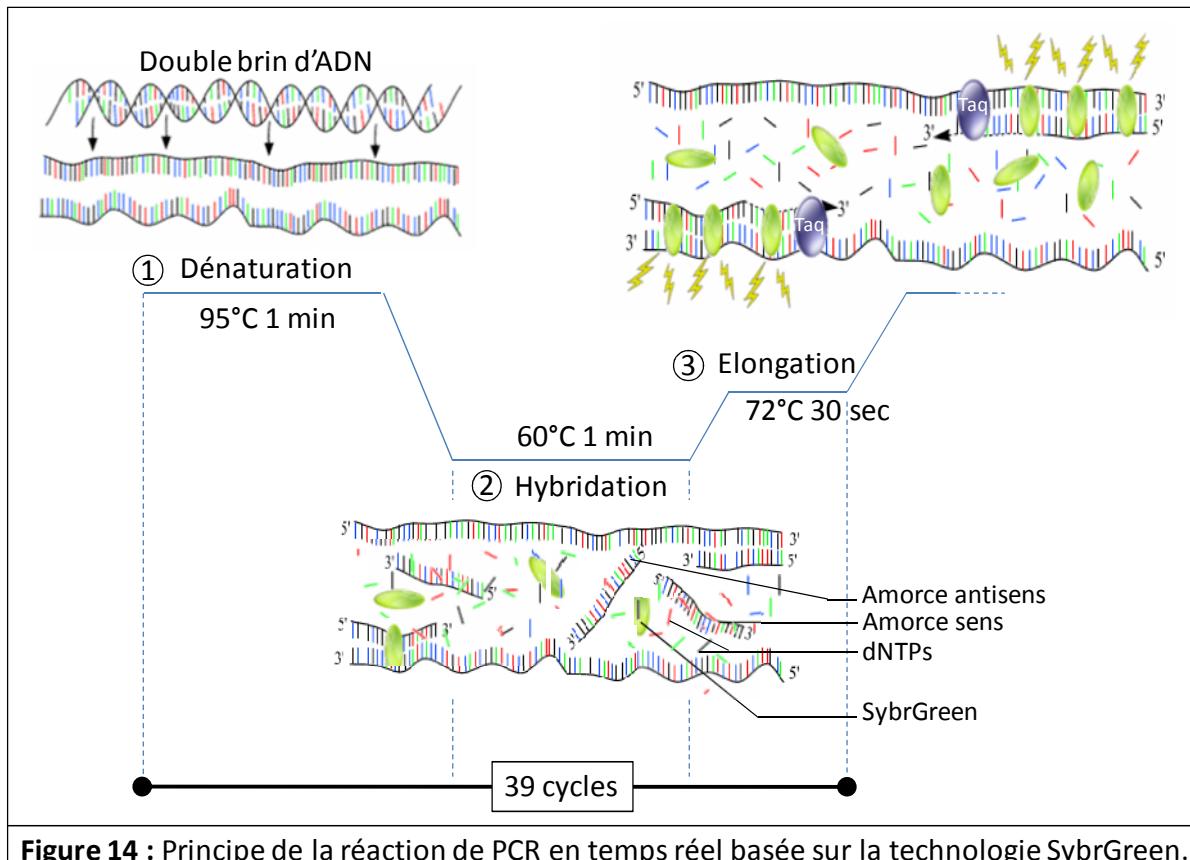


Figure 14 : Principe de la réaction de PCR en temps réel basée sur la technologie SybrGreen.

Nous avons utilisés lors de nos travaux la technique basée sur les sondes SYBRgreen. Le mix réalisé contenait dans chaque puits 2 µl de notre produit de RT et 48 µl de milieu réactionnel pour PCR en temps réel comprenant les amorces sens et antisens à 5 µM spécifiques d'un gène, 10 mM de dNTP, 25 mM de MgCl₂ et la Taq à 5 U/µl dans un volume final de 50 µl complété par de l'eau stérile. Les amorces correspondant à chaque gène d'intérêt ont été répertoriées dans le tableau 2. Les sondes SYBRgreen ne vont fluorescer que lors de leur adhésion au double brin d'ADN.

Amorces (humain)	Séquences (5'-3')	Taille de l'amplicon
GAPDH / sens	agccacatcgctcagacac	66 nt
GAPDH / antisens	gcccaatacgaccaaatcc	
α SM-actin / sens	ctgttccagccatccttcat	70 nt
α SM-actin / antisens	tcatgatgctgttaggtgg	
ALPL / sens	aacaccacccaggggAAC	78 nt
ALPL / antisens	ggtcacaatgcccacagatt	
Runx2 / sens	ggcccacaaaatctcagatcg	184 nt
Runx2 / antisens	cactggcgctgcaacaagac	
BMP-2 / sens	aggacactggggaaagcagcaa	117 nt
BMP-2 / antisens	gctcttcaatggacgtgtccc	
Coll / sens	acatggaccaggcactggca	153 nt
Coll / antisens	tcaactgtctgcggcaggct	
PTHR1 / sens	ggggcttcacagtctcg	78 nt
PTHR1 / antisens	tggccaggtagctctga	
BSP / sens	cgaatacacggcgtaatg	109 nt
BSP / antisens	gtagctgtactcatcttcataaggc	
OCN / sens	ggcgctacactgttatcaatgg	106 nt
OCN / antisens	tcagccaaactcgtcacagtc	
Osx / sens	ggctcagctctccatctg	103 nt
Osx / antisens	ggggactggaggccatagt	

Tableau 2 : Récapitulatif des séquences d'amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR en temps réel.

Nous avons établi un seuil de fluorescence minimal afin de déterminer le seuil minimal de détection. Lors de l'amplification de l'ADN, à chaque cycle une lecture de la fluorescence a été effectuée. Lorsque l'intensité de la fluorescence dépassait le seuil minimum établi, cela signifiait que la quantité d'ADN était suffisamment importante pour être détectée. Nous avons ainsi obtenu une valeur correspondant au cycle durant lequel l'intensité de fluorescence a pu dépasser le seuil (C_t : Cycle Threshold). Cette valeur est primordiale pour effectuer les analyses qui nous ont servi à déterminer la quantité d'ADN présente initialement dans nos conditions de culture. En effet, plus cette valeur est faible (peu de cycles avant de dépasser le seuil), plus la quantité d'ADN présente initialement est importante. Inversement, plus cette valeur est haute plus la quantité d'ADN de départ était faible (besoin de plus de cycle pour détecter une fluorescence). Ces valeurs nous ont permis d'obtenir des valeurs relatives qui vont être normalisées avec un gène de référence ne variant pas en fonction des conditions de culture utilisées. Le gène de référence nous servant de contrôle endogène était la *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. La méthode de calcul du 2^{-ΔΔC_t} décrite précédemment par Livak *et al.* a été utilisée pour calculer le niveau d'expression relatif des gènes [286]. Ces valeurs permettent d'obtenir des valeurs relatives quant à la quantité d'ADN

présente au départ. Pour obtenir des valeurs absolues il est indispensable d'effectuer des courbes étalons sur des dilutions croissantes d'échantillons avec les couples d'amorces utilisés [287]. Par exemple, une série de dilution au $\frac{1}{2}$ doit, en théorie, donner des courbes d'amplification décalées d'un cycle de PCR à chaque fois. Si tel est le cas, la quantité d'ADN double à chaque cycle et la réaction présente alors une efficacité de 100 %.

Une fois la PCR terminée, les produits qui en étaient issus ont pu être conservés à 4 °C et utilisés pour réaliser des migrations sur gel d'agarose. Ces migrations nous ont permis de nous assurer de l'obtention d'un seul produit lors de l'amplification. En effet, l'apparition de smires (nombreuses bandes) nous indiquerait l'amplification d'ADN double brin de tailles différentes et donc une contamination de nos échantillons, une mauvaise spécificité des amorces ou un problème lors de l'elongation des brins par la Taq polymérase. Les produits de cette migration peuvent également être séquencés pour s'assurer de l'amplification de la séquence d'intérêt.

Etude de l'expression protéique

Coloration de l'alcaline phosphatase non tissu-spécifique (ALPL)

La phosphatase alcaline est une protéine qui n'est pas spécifique de l'ostéoblaste car elle est retrouvée dans de nombreux tissus dans l'organisme autre que le tissu osseux. Cependant, elle est indispensable au bon fonctionnement des cellules ostéoblastiques et sa présence est révélatrice de l'engagement des CSM vers le phénotype ostéoblastique.

La coloration a été effectuée à la fois sur les cellules cultivées sur des plaques multipuits en plastique et sur des cellules cultivées sur divers biomatériaux en milieu de prolifération ou de différenciation ostéogénique (Dex). Les colorations ont été faites après 14 et 21 jours. A la fin de ces temps de culture, les cellules ont été fixées avec une solution d'acétone/citrate pendant 1 min à température ambiante puis lavées avec de l'eau distillée. Les échantillons ont ensuite été incubés dans une solution de Fast-Violet B contenant du naphtol pendant 30 min à température ambiante (Sigma-Aldrich). Les échantillons ont finalement été abondamment rincés avec de l'eau distillée et observés à la loupe binoculaire (Leica Microsystems).

Western Blot

Dans le but de tester l'efficacité de différents milieux de différenciation et notamment de vérifier la capacité de certaines molécules ostéogéniques à se substituer à la

dexaméthasone, des analyses protéiques ont été effectuées par Western Blot sur des CSM cultivées sur plastique.

Les CSM cultivées dans différents milieux ostéogéniques ont été stoppées à différents temps (0, 7, 14 et 21 jours). Un tampon de lyse cellulaire a été ajouté dans chacun des puits (100 µl/puits pour une plaque 6 puits) et les tapis cellulaires ont été détachés mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile. Les suspensions de cellules lysées contenues dans chacun des puits ont alors été transférées dans des tubes de 1,5 ml. Après une centrifugation de 10 min à 10000 g et 4°C qui a permis la séparation des débris cellulaires insolubles et des protéines solubles contenues dans le surnageant. Les surnageants ont été collectés et leur concentration en protéines totales a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre (Victor², PerkinElmer, Waltham, MA). Les protéines totales extraites ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse à 12% de Tris-glycine-SDS-polyacrylamide et transférées par la suite sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Saclay, France). Les membranes ont été lavées trois fois dans du PBS 1X puis incubées toute la nuit (< 14 h) à 4°C avec une solution d'anticorps primaire diluée dans du PBS 1X contenant 5 % de BSA. Les anticorps primaires ont permis par leurs affinités avec des protéines données de mettre en évidence l'état de différenciation des CSM. Les anticorps primaires ont interagi avec la protéine d'intérêt puis les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires et couplés à la peroxydase (horseradish-peroxydase) ont permis de révéler ce complexe. La liste des anticorps primaires et secondaires a été répertoriée dans le tableau 3. Les bandes protéiques ont été visualisées avec un kit de détection pour western blot, ECLplus (GE Healthcare, Waukesha, WI). Les images ont ensuite été acquises avec une caméra Chemi-smart 2000 à l'aide du logiciel Chemocapt (Vilbert-Lourmat, Marne-la-vallée, France).

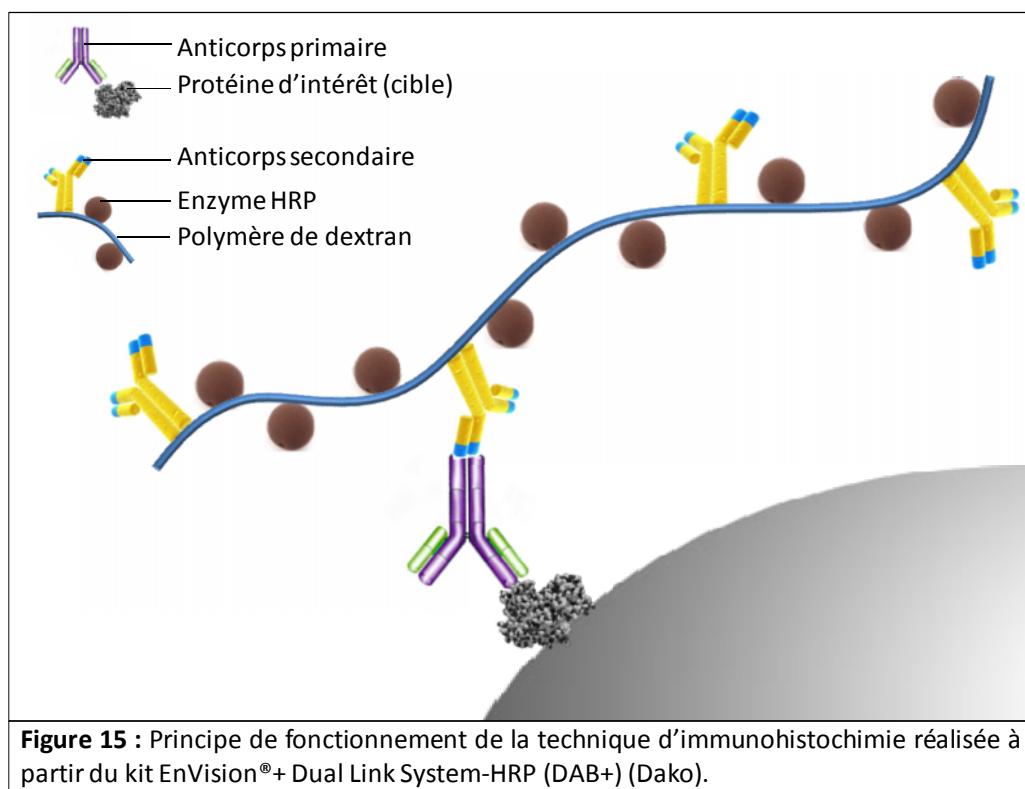
Anticorps Primaire	Dilution	Fabricant	Production	Clone
Anti-humain α Smooth Muscle-actin (α SM-actin)	1/3000	Sigma-Aldrich	Souris	1a4
Anti-humain Alkaline phosphatase(ALPL)	1/1000	R&D Systems	Souris	B4-78
Anti-humain Calcium Sensing Receptor (CaSR)	1/1000	Santa Cruz Biotech	Souris	F-19
Anti-humain Osterix (Osx)	1/500	GeneTex	Souris	
Anti-humain β actin	1/3000	Sigma-Aldrich	Souris	AC15

Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés lors des expériences de western blot.

Immunohistochimie

Les difficultés rencontrées pour extraire les protéines des cellules cultivées sur les céramiques de BCP nous ont poussées à développer une autre technique de détection des protéines basée sur l'immunohistochimie.

Après 14 jours de culture, les cellules cultivées sur des particules de BCP, des billes de verres ou sur plastique ont été stoppées. Les complexes cellules/biomatériaux après lavage au PBS 1X ont été cryogénisées avec de l'azote liquide puis inclus dans du Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura, Villeneuve d'Ascq, France). Ce composé, liquide à température ambiante se solidifie à une température de -20°C et nous a donc permis de réaliser des coupes à froid de nos échantillons. Afin d'étudier l'expression de différentes protéines, des sections de 7 µm de nos échantillons ont été obtenues à l'aide d'un microtome cryostat (Leica Cryocut 3000, Rueil-Malmaison, France) puis colorées par un kit d'immunohistochimie (EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)) (Dako, Trappes, France) (figure 15).



Afin de préserver les épitopes, les lames ont été fixées 10 min avec de l'acétone froid (-20°C) et conservées à -20°C avant coloration. Les cellules cultivées sur plastique ont été rincées au PBS 1X puis fixées 1 h à 4°C avec du PBS 1X contenant 4 % de PFA. Pour les étapes suivantes concernant la coloration à proprement parlé, les lames et les cellules cultivées sur plastique ont été traitées de la même façon. Les échantillons ont été lavés

pendant 5 min avec du PBS 1X avant de bloquer les enzymes endogènes pendant 10 min avec du Dual Endogenous enzyme block reagent. Les échantillons ont ensuite été rincés avec du tampon de lavage (PBS 1X contenant 3 % de BSA) avant d'être incubés 1 h à température ambiante dans une solution contenant un anticorps primaire dirigé contre une protéine d'intérêt. Par la suite, les échantillons ont abondamment été rincés avec le tampon de lavage puis incubés 30 min à température ambiante avec un complexe anticorps secondaires/polymer/horseradish peroxydase. Les anticorps secondaires fixés au polymère (dextran) ont interagis avec les anticorps primaires fixés sur les protéines d'intérêt. Après un abondant rinçage par le tampon de lavage, la longue chaîne de polymère associée à des peroxydase horseradish a permis d'amplifier le signal après l'ajout d'un substrat chromogène. Ce substrat chromogène a été déposé sur les échantillons pour une durée de 5 à 10 min, dépendant de l'apparition d'une coloration brune au niveau de chacun des échantillons. Les échantillons sur lame ont ensuite été lavés puis montés en utilisant un milieu de montage aqueux et l'ensemble des échantillons a pu être observé par microscopie photonique (Leica Microsystems). Le marquage immunohistochimique a été positivement et négativement évalué par l'utilisation de contrôle, respectivement de l'os et du cartilage humain. La liste des anticorps a été répertoriée dans le tableau 4.

Anticorps Primaire	Dilution	Fabricant	Production
Anti-humain Bone morphogenetic protein 2(BMP-2)	1/200	Abcam	Lapin
Anti-humain Collagène de type 1 (Coll)	1/4000	Sigma-Aldrich	Souris
Anti-humain Bone sialoprotéin (BSP)	1/600	Abcam	Lapin
Anti-humain Ostéocalcine (OCN)	1/200	R&D Systems	Souris

Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.

Analyses histochimiques

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de colorations spécifiques a permis d'évaluer la différenciation des CSM. Nous avons donc pu évaluer l'effet de différents milieux ostéogénique sur la différenciation ostéoblastique des CSM par l'utilisation de coloration tels que la coloration au rouge alizarine et la coloration Von Kossa. Ces colorations étant des marqueurs spécifiques du calcium et du phosphate nous n'avons pu les réaliser sur les cellules cultivées sur les céramiques de BCP. En effet, ces céramiques étant constituées de phosphate de calcium, la coloration de complexes cellules/BCP ne permettait pas d'observer

une coloration spécifique à la différenciation des CSM. Malgré tout, ces colorations nous ont permis d'évaluer l'effet de différents milieux sur l'induction de la différenciation ostéoblastique de cellules cultivées sur plastique.

Etude *in vivo*

Modèles animaux

Expérimentation en site orthotopique

Des brebis ont été utilisées afin de créer des pertes de substances osseuses de taille critique au niveau de la diaphyse du métatarse. Ce modèle se rapproche des problèmes posés par les pertes de substances osseuses chez l'homme. Cette étude a été menée sous la direction des professeurs Pierre Layrolle et Philippe Rosset ainsi que du docteur Luc Sensebé. Les actes chirurgicaux ont été effectués par le professeur Philippe Rosset et les docteurs Patrick Coipeau et Emilie Marteau, tous trois chirurgiens orthopédiques de l'hôpital Trousseau de Tours.

Toutes les manipulations et les interventions chirurgicales ont été conduites selon les directives de la communauté européenne pour le bien-être et l'utilisation des animaux de laboratoire (DE 86/609/CEE) et ont également été approuvées par le comité local d'éthique. Quatorze brebis adultes avec un poids moyen de 64 kg ont été utilisées durant ces travaux. Les animaux ont été hébergés à l'INRA de Nouzilly dans des champs d'herbe avec un accès illimité à l'eau et la nourriture. Les animaux ont été opérés dans des pièces chirurgicales totalement équipées et sous anesthésie générale induite par injection intraveineuse de diazépam (1 mg/kg) et de kétamine (8 mg/kg) suivi du maintien de l'anesthésie de façon volatile par inhalation d'oxygène et d'halothane durant l'opération.

Pour la première procédure, les brebis sont allongées sur leur flanc gauche permettant l'accès à leur flanc droit. Durant l'intervention, les animaux reçoivent une solution saline isotonique (0,9 % de NaCl) et 1 g d'amoxicilline injectés par un cathéter positionné dans leur veine jugulaire. Les sites chirurgicaux que sont la crête iliaque et le métatarse sont rasés et désinfectés avec une solution iodée. La moelle osseuse provenant de la crête iliaque a été aspirée durant la première intervention à l'aide d'une aiguille de biopsie (Jamshidi) insérée à travers l'os cortical. Les moelles osseuses sont prélevées dans des seringues en plastique contenant 1 ml d'héparine (15000 UI) et immédiatement transportées dans les locaux permettant leur culture. L'isolation et l'amplification de ces cellules sont effectuées de façon

standard comme décrit précédemment. Afin d'exposer le métatarse, une incision longitudinale est réalisée sur la face externe du métatarse droit. Avant la création du défaut, la plaque de compression dynamique de 8 trous (Synthes®, Etupes, France) a été adaptée à la face latérale du métatarse et les trous des vis ont été préparés. Le trou le plus proche du défaut était à une distance supérieure ou égale de 5 mm par rapport à la ligne d'ostéotomie. Un défaut de taille critique d'une longueur de 2,5 cm au milieu de la diaphyse a été créé à l'aide d'une scie chirurgicale (Synthes®) sous irrigation continue d'une solution saline (0,9 % de NaCl). Une fois le segment osseux sectionné retiré, le défaut a été lavé pour en éliminer les débris. L'os a ensuite été stabilisé par la plaque avec 3 vis de chaque côté du défaut de diamètre 3,5 mm. Le défaut diaphysaire du métatarse a été comblé avec un ciment orthopédique de polyméthylméthacrylate (PMMA) (Cerafix® low viscosity, Ceraver®, Gonesse, France) et le champ chirurgical lavé avec une solution saline isotonique durant la polymérisation du ciment. Les tissus sous-cutanés ont été suturés avec des sutures résorbables (poliglecaprone 25, Monocryl®, Ethicon®, issy les Moulineaux, France) et des sutures non résorbables pour la peau (polyester, Flexidène®, BBraun, Boulogne, France). Le membre traité a été immobilisé à l'aide d'un plâtre cylindrique radiotransparent de résine polyurethane et de fibres de verre (Scotchcast®, 3M®, Cergy Pontoise, France). Des radiographies ont été prises afin de s'assurer de la reproductibilité du défaut et des procédures chirurgicales. Après la chirurgie, les animaux ont pu récupérer sans survenance de complications et pouvaient marcher après quelques jours en supportant la totalité de leur poids.

Pour la seconde intervention, six semaines plus tard, les brebis opérées sous anesthésie générale ont été positionnées sur leur flanc droit afin de laisser libre accès à la partie médiane du métatarse droit de façon opposé à la plaque. Une fois le plâtre retiré, la peau a été incisée pour exposer le milieu de la diaphyse du métatarse. La membrane fibreuse recouvrant le ciment de PMMA a été incisée et surélevée à l'aide d'un élévateur périostique afin de retirer le cylindre de PMMA. La cavité médullaire a été curetée de chaque côté avec une curette osseuse (3 mm) dans le but de rétablir la perméabilité puis lavée avec une solution saline isotonique. Le défaut diaphysaire a été comblé par des granules de BCP (2-4 mm) seules ou associées avec 100.10^6 CSM autologues isolées et amplifiées comme décrit précédemment. Parmi les 14 brebis, 7 ont reçu des granules de BCP seule et les 7 autres ont reçues l'association CSM/BCP. Après comblement du défaut, la membrane a été suturée avec du fil résorbable et les tissus sous-cutanés et la peau ont été refermés comme lors de la première procédure avant la pose d'un nouveau plâtre. Après les actes chirurgicaux, les animaux ont reçu des antibiotiques (amoxicilline, 2 g/jour) par injection intraveineuse pendant 5 jours et

des suivis cliniques ont été effectués durant la première semaine suivant l'intervention. Douze semaines après l'intervention, les animaux ont été euthanasiés par injection intraveineuse d'une dose létale de pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol, Lure, France) sous anesthésie générale.

Expérimentation en site ectopique

L'implantation au niveau de site ectopique chez le petit animal permet de vérifier et de prouver l'efficacité de concepts obtenus *ex vivo*. En effet, le passage *in vivo* chez le petit animal est une étape obligatoire pour évaluer l'ostéogénérité d'un matériau (seul ou associé) avant le passage sur gros animal puis chez l'homme.

Les expérimentations ont été réalisées avec l'aide du docteur Pierre Corre, chirurgien maxillo-facial et du docteur Jérôme Sohier. Toutes les procédures de manipulation et de chirurgies des animaux ont été réalisées en conformité avec un protocole approuvé par le comité local pour le bien-être et l'éthique animale. Les études ont été effectuées sur des souris Swiss et NMRI nude femelles âgées de 7 semaines. Ces souris Swiss et NMRI nude ont été fournies par des éleveurs certifiés, respectivement le laboratoire Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) et l'élevage Roger Janvier (Le Genest Saint Isle, France).

Les souris Swiss nude ont été hébergées dans des cages réglementaires à raison de 5 individus maximum par cage conformément aux recommandations de la directive européenne 86/609/CEE du 24 novembre 1986 relative aux conditions d'hébergement. Ces animaux ont été hébergés au sein des locaux du laboratoire de transgénèse et d'archivage d'animaux modèles (TAAM) d'Orléans (CNRS). Les cages possédaient des couvercles filtrants (HEPA) eux-mêmes reliés à un circuit d'échange gazeux clos. Une période de quarantaine de 2 semaines a été instaurée avant toute manipulation. Les animaux sont observés et contrôlés périodiquement, et ont un accès totale et permanent à l'eau et la nourriture.

Les souris NMRI nude ont été hébergées et manipulées dans les mêmes conditions au sein des locaux de l'élevage Roger Janvier.

Les CSM ensemencées sur les différents biomatériaux (comme décrit précédemment) ont été implantées de manière sous-cutanée chez ces souris immunodéprimées (Swiss ou NMRI nude). L'utilisation de ce type de souris permet l'implantation de cellules xénogéniques (dans notre cas des cellules humaines) sans que ne se produise de phénomène de rejet. Cependant, ces souris étant très fragiles, il est important de les héberger et de les manipuler dans des conditions drastiques d'asepsie.

Les CSM ont été cultivées 7 jours sur divers biomatériaux (Disques macroporeux, particules denses, billes de verre) afin de former un hybride CSM/biomatériaux. Après cette période de culture, ces hybrides ont été implantés chez les souris immunodéprimées. L'anesthésie générale des animaux est assurée par l'inhalation d'un composé halogéné, l'isoflurane (2,5% dans de l'air) avec un débit de 2,5 l/min, qui sera maintenue pendant toute la durée de l'intervention chirurgicale, à un débit plus faible de 1 l/min. Les zones d'interventions chirurgicales sont désinfectées par l'application d'une solution iodée puis une incision d'1 cm de long est faite de chaque côté du dos de la souris, au niveau des lombaires. Ensuite, une dissection mousse est réalisée afin de séparer la peau du tissu conjonctif sous-cutané pour créer une poche dans laquelle les échantillons pourront être introduits. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'une pince ou d'une spatule stérile puis introduits dans la poche sous-cutanée. La peau des souris est ensuite suturée à l'aide de fils de sutures non résorbables (polyester, Flexidène®, BBraun). Durant la première semaine suivant l'intervention, les souris sont surveillées quotidiennement et reçoivent du paracétamol *per os* (200 mg/kg) pour pallier à d'éventuelles douleurs. Après 8 semaines, les animaux sont euthanasiés sous anesthésie générale par injection intracardiaque de pentobarbital de sodium (Dolethal, 0,5 ml).

Analyses histomorphométrique

Immédiatement après l'euthanasie des animaux, les échantillons sont fixés dans du formaldéhyde à 4 %. Ils sont ensuite déshydratés dans des bains successifs de 24 h présentant des degrés croissants d'éthanol (70, 80, 95 et 100 %). Les explants sont ensuite placés dans un bain d'acétone pendant 48 heures puis 2 imprégnations successives de 2 jours sont réalisées dans une solution de méthylmétacrylate (MMA) supplémenté par du peroxyde de benzoyle (PBO) et de polyéthylène glycol (PEG) (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont enfin inclus grâce à la polymérisation de la résine PMMA induite par l'ajout de 60 µl d'initiateur (1 ml de NN-dimethylaniline + 19 ml de propan-2-ol) à 5 ml de résine de PMMA. Cette polymérisation s'effectue à 4°C durant 2 à 3 jours. Les blocs obtenus sont ainsi démoulés et des coupes de 20 µm sont réalisées à l'aide d'une scie diamantaire Leitz (Leica SP 1600, Leica Microsystems). Ces coupes fines sont alors montées sur lame et colorées au bleu de méthylène et à la fuchsine basique (1 min pour chaque colorant). Une lamelle est déposée sur l'échantillon afin de finir le montage et collée grâce à de la colle U.V. Les échantillons sont ensuite observés par microscopie photonique. Les tissus calcifiés sont colorés en rose violacée et les non calcifiés restent en bleus violacés. Les noyaux sont colorés en bleu.

Les coupes réalisées sur les blocs permettent de réaliser des analyses histologiques. Le reste de l'échantillon inclus dans son bloc va ainsi pouvoir être utilisé pour analyser la repousse osseuse. Les blocs sont « polis miroir », c'est-à-dire qu'aucun défaut ni aucune rayure ne sont apparent puis ils sont métallisés avec une fine couche d'or-palladium (Denton Vacuum LLC, desk III, Moorestown, NJ). Les blocs ainsi préparés peuvent être observés au microscope électronique à balayage (LEO 1450 VP, Carl Zeiss). Une image de chaque échantillon est réalisée au grossissement x30 en utilisant la source d'électrons rétrodiffusés (BSEM). Cette technique permet de discriminer l'os du biomatériau en fonction de leurs densités électroniques respectives, ainsi sur ces analyses d'images BSEM, le biomatériau apparaît en blanc, l'os minéralisé en gris et le tissu fibreux en noir. La quantité d'os néoformé a ainsi pu être mesurée par analyse d'images (Leica Quantimet 4).

Objectifs de la thèse

Le tissu osseux est un organe indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. De nombreuses lésions endommagent ce tissu et malgré sa capacité de régénération, dans certains cas une intervention chirurgicale est nécessaire, basée le plus souvent sur l'utilisation d'autogreffe. Actuellement, ces techniques présentent de bons résultats et sont la référence, mais l'idéal serait d'obtenir des résultats identiques ou même supérieurs sans avoir à utiliser d'autogreffe, en particulier en cas de perte de substance osseuse. C'est le but de l'ingénierie tissulaire osseuse. Cependant, cette approche n'a pas encore confirmé son utilité dans le cadre d'applications cliniques. De nombreux aspects de l'ingénierie tissulaire osseuse restent encore à être étudiés plus précisément pour améliorer ses performances thérapeutiques.

Pour cela nous nous sommes employés à atteindre les objectifs suivants :

- Faire un état de l'art de l'ingénierie tissulaire osseuse pour exposer ce qui peut être considéré comme acquis, préciser les questions non résolues et les axes de recherche possibles.
- Trouver un milieu de culture apte à induire les cellules souches mésenchymateuses vers une différenciation ostéoblastique terminale en un temps réduit.
- Développer des méthodes de culture biomimétique afin de mimer l'environnement cellulaire naturel et d'améliorer la différenciation des cellules souches mésenchymateuses *in vitro* et la formation osseuse *in vivo*.

Chapitre 3 : Association CSM/BCP pour la Régénération Osseuse au Niveau d'un Défaut Critique

Introduction à la problématique

Les greffes osseuses sont largement utilisées en chirurgie orthopédique pour soigner les défauts de taille critique des os longs. Tous les ans en Europe, plus d'un million de patients sont confrontés à de la chirurgie réparatrice osseuse [135, 288] et le vieillissement de la population fait que ce nombre est en progression constante. L'autogreffe osseuse est la plus efficace et la plus sûre des procédures de greffe puisqu'elle contient les propres cellules et protéines du patient et qu'elle procure une armature permettant la repousse osseuse [95, 289] [290, 291]. Dans le cadre des traitements de défauts osseux diaphysaires, Masquelet et ses collaborateurs ont proposé une procédure combinant des membranes induites et de l'os spongieux autologue [292]. La première étape consiste à insérer dans le défaut un ciment de poly-methylmetacrylate (PMMA) responsable de la formation à son contact d'une membrane vascularisée. La seconde étape est le comblement du défaut, six semaines plus tard, en remplaçant le PMMA par de l'os spongieux autologue. La membrane induite par le PMMA permet d'éviter la résorption du greffon, favorise sa vascularisation, et libère des facteurs de croissances qui favorisent la réparation osseuse. Grâce à cette technique, Masquelet et ses collaborateurs ont obtenu, chez l'homme, la reconstruction de défauts osseux diaphysaires de plus 10 cm de long (4 à 25 cm) avec une durée moyenne de consolidation de 8,5 mois. Malgré ces succès cliniques, la procédure de Masquelet présente des inconvénients. Le greffon autologue osseux est limité en quantité (environ 20 cm³ par crête iliaque) et son prélèvement nécessite un site chirurgical supplémentaire avec des douleurs et des complications associées qui restent fréquentes [99, 100, 103, 293]. Enfin, cette perte de stock osseux ne se reconstitue pas. D'autres sources de greffes osseuses comme l'allogreffe, provenant de banque de tissus, ne contiennent pas de cellules vivantes et les protéines matricielles sont partiellement dénaturées par les procédures de cryogénération, ce qui en diminue leur propriété ostéogénique par rapport aux autogreffes [112, 113]. De plus, l'allogreffe osseuse est susceptible de transmettre des maladies ou d'être responsable d'une réaction immunitaire contre certains antigènes du donneur [95]. Les auto- et allogreffes présentent des inconvénients certains, c'est pourquoi les scientifiques et les orthopédistes se sont depuis longtemps tournés vers la recherche de matériaux compatibles pouvant être utilisés à la place des greffes osseuses biologiques. Mais les substituts osseux synthétiques disponibles ne possèdent qu'une partie des propriétés de l'autogreffe. Ainsi, les biocéramiques de phosphate de calcium ne possèdent pas les propriétés ostéogéniques suffisantes pour permettre la

reconstruction osseuse de larges défauts, d'où l'intérêt pour des méthodes innovantes comme l'ingénierie tissulaire.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1, l'ingénierie tissulaire osseuse associe des cellules souches mésenchymateuses (CSM), le plus souvent issues de moelle osseuse à des matériaux synthétiques ainsi que des facteurs de croissance ou de différentiation, afin de former un matériau hybride [263, 294]. L'approche classique de l'ingénierie tissulaire osseuse consiste à prélever de la moelle osseuse du patient, d'en isoler les CSM, de les amplifier jusqu'à un certain nombre et de les différencier pour ensuite les ensemencer sur un biomatériau avant de les planter chez le patient. Avant d'être utilisées en clinique, ces techniques doivent être testées sur modèles animaux permettant d'être le plus proche des conditions rencontrées chez l'homme. Les défauts de taille critique du métatarse de la brebis ont ainsi pu être reconstruits par l'ingénierie tissulaire. Petite et ses collaborateurs ont démontré que des défauts diaphysaires de 2,5 cm représentaient des défauts de taille critique [295] et qu'ils pouvaient être réparés en 4 mois par comblement du défaut en associant des CSM autologues et des cylindres de coraux [296]. Plus récemment, cette équipe a utilisé la technique de Masquelet avec un ciment de PMMA ainsi que des CSM autologues cultivées sur des granules de corail pour régénérer des défauts diaphysaires de brebis [297]. Après 6 mois, la quantification de la formation osseuse indiquait une formation osseuse similaire induite par les hybrides CSM/corail et l'autogreffe spongieuse. Les granules de corail seules permettaient la formation d'un pont entre les berges du défaut mais avec une quantité d'os néoformé nettement en deçà de ce que procuraient l'autogreffe ou l'association CSM/corail. Les biocéramiques poreuses d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate de calcium tricalcique (TCP) sont des matériaux plus adéquats pour l'ingénierie tissulaire osseuse que les matériaux xénogéniques comme ceux provenant de porites coralliens. En effet, ces matériaux sont largement utilisés en tant que substituts osseux et ont démontré des caractéristiques telles que la bioactivité [298], l'ostéoconduction [299], et l'ostéogénicité [300] dans de nombreux modèles animaux et études cliniques. En plus de cela, la possibilité de contrôler le rapport HA/TCP fait de ces biocéramiques des matériaux plus adaptables et moins biodégradables que le carbonate de calcium de coraux. Ces matériaux synthétiques sont également plus sûrs pour des applications cliniques que les xénogreffons. Enfin, les biocéramiques ont montré leur capacité en tant que support des CSM et sont capables d'induire la formation d'os notamment au niveau de sites ectopiques [255, 301, 302].

Le but de cette étude, décrite dans l'article « Healing of Long Bone Defects in Sheep Metatarsi using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells» était d'évaluer l'aptitude des granules de BCP, associées ou non à des CSM à permettre la consolidation de défauts osseux critiques de métatarses de brebis. La technique de Masquelet a été utilisée sur 14 brebis, selon les mêmes principes qu'en clinique humaine.

Article 1 : Healing of Long-Bone Defects in Metatarsus of Sheep using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells

Healing of Long Bone Defects in Sheep Metatarsi using Bioceramics and Mesenchymal Stem Cells

Thomas Cordonnier^{1,4}, Jérôme Sohier¹, Patrick Coipeau⁵, Emilie Marteau^{4,5}, Sophie Source², Alain Langonné^{3,4}, Julien Gaillard^{3,4}, Luc Sensebé^{3,4}, Pierre Layrolle¹, Philippe Rosset^{4,5}

¹ Inserm U957, Laboratory Physiopathology and Bone Resorption, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

² Inserm U791, Laboratory for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, France

³ EFS Centre-Atlantique, Research Department, Tours, France

⁴ EA3855, Laboratory of Hematopoiesis, François Rabelais University, Tours, France

⁵ Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital, François Rabelais University, Tours, France.

* Corresponding author: Prof. Pierre Layrolle, PhD, Inserm U957, Faculty of Medicine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Tel: +33 2 72 64 11 43; fax: +33 2 40 41 28 60; e-mail: pierre.layrolle@inserm.fr

Submitted to Journal of Orthopedic Research

07-Sept-2010

Abstract

Bone grafting is primarily of interest for bone regeneration in orthopedic surgery. Autografts are the most effective bone graft procedure but the restrictions associated with this material regarding the limited bone quantity available and the need for a second surgery site have encouraged scientists and surgeons to find an alternative approach. The aim of this study was to investigate the ability of biphasic calcium phosphate (BCP) ceramic granules to promote bone regeneration in a surgical model similar to a clinical situation. In this work, BCP granules were implanted alone or with autologous mesenchymal stem cells (MSC) in a critical-sized bone defect using Masquelet's technique in sheep metatarsi. A critical-sized defect measuring 2.5 cm was filled with poly-methylmethacrylate (PMMA) cement spacer which was replaced 6 weeks later with BCP granules alone or associated with autologous MSC. After 12 weeks, non decalcified histology demonstrated good and homogeneous bone formation for BCP ceramic granules with or without MSC. No significant difference was observed between the two groups, however, with all the implants able to support bone formation and for certain cases support bone unions. These results highlighted the potential BCP ceramic granules have to be used as scaffolds for MSC in the reconstruction of critical-sized bone defects instead of autologous bone grafts.

Keywords

Biphasic calcium phosphate granules; mesenchymal stem cells; critical-sized bone defect; bone healing; sheep metatarsus.

Introduction

Bone grafting is widely used in orthopedic surgery to repair critical-sized defects in long bone. In Europe, about one million patients undergo surgical bone reconstruction annually and the numbers are steadily increasing because of the ageing population. Bone autografts are the safest and most effective grafting procedure, as they contain the patient's own bone cells and proteins, and provide a framework for the new bone to grow into (1,2). For the treatment of diaphyseal bone defects, Masquelet *et coll.* have proposed a procedure combining induced membranes and cancellous bone autografts (3). The first stage consists in inserting into the defect a poly-methylmethacrylate (PMMA) cement spacer that is responsible for the formation of a pseudo-synovial vascularized membrane. The second stage is the reconstruction of the defect, six weeks later, replacing the PMMA spacer with an autologous cancellous bone graft. The membrane induced by the spacer prevents the graft from resorbing, favors its vascularization and corticalization, and releases growth factors that enhance bone healing. Using this technique, Masquelet *et coll.* have reported the reconstruction of bone defects up to 10 cm in length (4 to 25 cm), with an average of 8.5 months for normal walking and full weight-bearing diaphyseal segmental repair. Despite these clinical successes, Masquelet's procedure has a certain number of drawbacks. The autologous bone graft is limited in quantity (less than 50 cm³) and its harvesting (e.g. from the iliac crest) requires an additional surgical site, resulting in frequent pain and complications (4-7). Other sources of bone grafts, such as allogenic bone from tissue banks, do not contain living cells and some matrix proteins are denatured by freezing process, resulting in osteogenic properties that are inferior to those of autogenous bone (8,9). Furthermore, allograft bone may transfer disease or lead to immunological rejections (2).

As both autografts and allografts have drawbacks, scientists have long searched for biocompatible materials that could be used in place of transplanted bone. Although most of the synthetic bone substitutes available have some of the positive properties of autografts, none yet have all the benefits of using the patient's own bone. For instance, calcium phosphate bioceramics do not have enough osteogenic properties to allow bone reconstruction over large defects. Given these limitations, and the increasing number of bone grafting procedures, surgeons are looking for more advanced therapies, such as tissue engineering.

Tissue engineering combines bone marrow mesenchymal stem cells (MSC), synthetic scaffolds and molecular signals (growth or differentiating factors) in order to form hybrid constructs (10,11). Using a classical approach, bone tissue engineering consists of harvesting

bone marrow from a patient, isolating the MSC by means of their adherence to tissue culture plastic, expanding and differentiating those cells in culture to a sufficient number and then seeding them on to a suitable synthetic scaffold prior to implantation into the same patient. Before entering clinical trials, this therapeutic approach has to be tested in relevant animal models. For instance, critical-sized bone defects in sheep metatarsi have been reconstructed by bone tissue engineering (12). Petite *et coll.* have demonstrated that 2.5 cm diaphyseal defects were critical-sized defects (13) and when filled with hybrid constructs of autologous mesenchymal stem cells and coral cylinders, they healed in 4 months. However, the selected scaffold made of calcium carbonate from porites resorbed rapidly in the absence of cells. More recently, this group used Masquelet's technique with a PMMA cement spacer, culture expanded autologous mesenchymal stem cells and coral scaffold granules to regenerate diaphyseal bone defects in sheep (14). After 6 months, quantification of bone formation in the defects indicated comparable bone formation using MSC/coral constructs or autologous fragmented bone chips. The coral particles alone, without cells, made it possible to bridge the defects, but with less bone formation than autologous bone grafts or tissue engineered bone constructs.

Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate bioceramics are more suitable scaffolds for bone tissue engineering than xenogenic materials such as those derived from coral porites. These materials are effectively widely used as synthetic bone substitutes and have been shown to have controlled bioactivity (15), osteoconduction (16) and osteogenicity (17,18) in various animal models and clinical studies (19,20). Although controllable through the HA/TCP ratio, bioceramics are significantly less biodegradable than calcium carbonate corals. Furthermore, these synthetic materials are safer for clinical use than xenogenic materials. Lastly, bioceramics have been shown to be suitable scaffolds for MSC and are able to induce ectopic bone formation (21-23).

The aim of this study was to evaluate the bone regenerative properties of BCP granules with or without autologous MSC in critical-sized sheep metatarsus bone defects. As in clinical treatments, Masquelet's technique was used in 14 sheep. Metaphyseal defects measuring 2.5 cm were first filled with a PMMA cement spacer, and bone marrow aspirates were taken. After 6 weeks, the cement was removed and replaced with BCP granules associated, or not, with cultured expanded MSC. Bone formation was assessed after 12 weeks using micro-computed tomography, non decalcified histology, back scattered scanning electron microscopy and image analyses.

Materials and Methods

Ceramic scaffold

A porous ceramic scaffold was used in the experiments. The material consisted of granules of 2-4 mm macroporous biphasic calcium phosphate bone substitute (MBCP+™, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). The BCP ceramic was composed of HA and β -TCP in a 20/80 weight ratio. The chemical purity of the MBCP was analyzed by X-ray diffraction (XRD, Philips PW 1830, CuK α source) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Nicolet, Magna-IR 550). Finally, traces of CaO in the MBCP were checked by using a phenolphthalein test. The total porosity of the BCP ceramic was approximately 70% as measured using a mercury intrusion porosimeter (AutoPoreIII, Micromeritics). The macroporosity was about 45 % with macropores in the 260-550 μ m size range. The microporosity was approximately 25 % including micropores less than 10 μ m in size. The BCP granules were packaged in 5 cm³ vials and sterilized by gamma irradiation at >25 Grays.

Surgical procedure

All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 98/58/EC) and approved by the local ethics committee. Fourteen adult female sheep with an average weight of 64 kg were used in this study. The animals were housed in grass fields and operated on in fully equipped surgical rooms at INRA Nouzilly, France. All surgical procedures were performed under general anesthesia induced by intravenous diazepam (1 mg/kg) and ketamine (8 mg/kg) and followed by volatile anesthesia with oxygen and halothane.

For the first procedure, the sheep were placed on the left lateral side exposing the right limb. During surgery, the animals received an intravenous saline isotonic solution (NaCl 0.9%) and 1 g of amoxicillin through a catheter in the jugular vein. The surgical sites, iliac crest and metatarsus, were shaved and disinfected with iodine solution. Bone marrow was aspirated from the iliac crest during the first operation using a biopsy needle inserted through the cortical bone. The bone marrow aspirates were immediately transferred into plastic tubes containing 1 ml heparin (15,000 IU) and transported to the cell culture facilities. The mesenchymal stem cells were isolated and cultured according to the standard procedure described below. In order to expose the metatarsus, a longitudinal incision was made on the external right metatarsus. Before creating the defect, the 8-hole dynamic compression plate

(Synthes® Etupes, France) was fitted to the lateral aspect of the metatarsus and the screw holes were drilled, measured and taped. The holes nearest the defect were ≥ 5 mm from the osteotomy line. A critical-sized defect 2.5 cm in length in the middle of the diaphysis was created using a surgical saw (Synthes® Etupes, France) under continuous saline solution (0.9 % NaCl) irrigation. The diaphyseal segment was removed and the defect was rinsed to remove bone debris. The bone was stabilized using the plate and 3 screws (diameter 3.5 mm) on both sides of the defect. This diaphyseal metatarsus defect was filled with polymethylmethacrylate (PMMA) orthopedic cement (Cerafix® low viscosity, Ceraver® Gonesse, France) and the surgical field was rinsed with isotonic saline solution during the polymerization of the cement. Subcutaneous tissues were sutured with biodegradable sutures (poliglecaprone 25, Monocryl®, Ethicon®, Issy les Moulineaux, France) and non adsorbable sutures on the skin (polyester, Flexidène®, BBraun, Boulogne, France). The limb was immobilized using a radiolucent cylindrical cast of polyurethane resin and fiberglass (Scotchcast®, 3M®, Cergy Pontoise, France). Care was taken to prevent shore pressure by adding a soft band. X-rays were taken to control the reproducibility of the diaphyseal bone defects and surgical procedures. After surgery, the sheep recovered without major complications and walking with full weight bearing was observed after a few days.

For the second procedure, six weeks later, the sheep underwent surgery again under general anesthesia. They were positioned on the right lateral side to have access to the medial part of the right metatarsus, opposite the plate. After removing the plaster, the skin was incised to expose the middle of the diaphysis of the metatarsus. The fibrous membrane covering the PMMA spacer was incised and elevated using a periostal elevator, and the PMMA cylinder was removed. The medullary cavity on each side was curetted with a small bone curette (3 mm) to re-establish patency. The cavity was rinsed with isotonic saline solution. The diaphyseal defect was filled with either BCP granules alone or granules associated with cultured expanded autologous MSC. After pre-incubation in culture medium, the BCP granules (5 cm^3) were associated with 100×10^6 autologous MSC suspended in 4 ml of culture medium in 50 ml sterile tubes for approximately 1 hour at room temperature before implantation in the defect. Of the 14 sheep, 7 received only BCP granules and 7 had the combination of BCP granules and autologous MSC. After filling the metatarsal defect, the periosteal membrane was closed using continuous resorbable sutures and the skin was closed as in the first procedure. A new cast was applied. After surgery, the animals received an antibiotic (amoxicillin, i.v. injection 2 g/day) for 5 days and clinical follow-up was performed during the first postoperative week. Twelve weeks after surgery, the animals were euthanized

by intravenous injection of a lethal dose of pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol, Lure, France) under general anesthesia.

MSC isolation and culture

The mesenchymal stem cells (MSC) were obtained from bone marrow harvested in the iliac crest of sheep, as previously described. The bone marrow was transferred to a plastic flask and the cells adhering to the plastic dish were then grown in α -minimal essential medium (α -MEM) that was supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone) and 1 ng/ml of fibroblast growth factor-2 (FGF-2, R&D Biosystem). Cells were seeded at a density of 10×10^5 mononucleated cells per cm^2 and cultivated in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO_2 at 37°C. The medium was changed every 3 days until confluence. The MSC were then enzymatically detached from the plastic by incubation for 3-4 min with 0.25% trypsin/EDTA. The MSC were seeded on to culture flasks ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) for further expansion until passage 1. The cells were then cryopreserved in liquid nitrogen in FCS containing 10 % of dimethyl sulfoxide (DMSO) until use.

MSC characterization

A fraction of the mesenchymal stem cells obtained from the bone marrow of sheep was used for characterization. The proliferation rate was calculated until passage 2 by cell counting. In order to determine the multipotency of the cells, osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation were performed according to standard procedures. Sheep MSC were characterized by flow cytometry using anti-sheep CD44 (MCA2219F), CD31 (MCA1097F), CD45 (MCA2220) CD14 (MCA1568) antibodies, all from AbD Serotec (Oxford, UK). Sheep MSC were seeded and cultured for 2 and 21 days on BCP granules. The adhesion and proliferation capacity of the MSC on the BCP granules were evaluated by stereomicroscopy after May Grünwald Giemsa (MGG) staining and scanning electron microscopy (LEO VP 1450) after fixative, dehydratation and gold sputtering.

Histology

After euthanasia, each metatarsus was dissected and the plate was removed. The metatarsus was immediately fixed in neutral buffered formalin solution for 2 months. Healthy metatarsi

from the other leg were also dissected to be used as controls. The metatarsus was analyzed using X-ray micro-computed tomography (Digisens SA, Le Bourget-du-Lac, France). Three-dimensional reconstructions were then made with the 3D computed tomography software DigiCT 2.4.2. After fixation, the samples were processed for non decalcified histology. They were dehydrated in ascending graded ethanol series (two baths of 24 h for each grade) and then in pure acetone for 24 h. The samples were finally impregnated three times in baths of 10 days in methyl methacrylate (Prolabo) and embedded in polymethylmethacrylate (PMMA) resin. Each block was cut in half along the long axis of the metatarsus using a circular diamond saw (Leica SP 1600, Germany). Sections 25 μ m thick were made and stained using basic fushine and methylene blue. Thin, 7 μ m sections were prepared using a hard tissue microtome (Leica SM 2500, Germany), mounted on glass slides and stained with Goldner's trichrome. The other part of the block was used for histomorphometrical measurements. For comparative purposes, the healthy control metatarsi were processed using similar procedures.

Histomorphometrical analysis

The surface of the ceramic and mineralized bone was measured on cross-sectioned PMMA blocks by means of back-scattered electron microscopy (BSEM, Leo 1450VP, Zeiss, Germany) and an image analysis system. Prior to BSEM observations, the PMMA blocks were polished and coated with gold-palladium at 20 mA for 4 min (EM Scope, UK). The SEM observations were made using back-scattered electrons (BSEM) at 15 kV. The BCP ceramic, mineralized bone and fibro-vascularized non mineralized tissues were distinguished on the basis of their respective gray levels on contiguous BSEM pictures using a semi-automatic image analyzer (Leica QWIN, Germany). The corresponding surfaces were measured and expressed as a percentage of the total defect surface.

Statistical analysis

All data were expressed as averages and standard errors. The two groups of n=7 were compared using a boxplot test. Differences were determined by analysis of variance (ANOVA) with Fisher's probability least significant difference (PLSD) *post hoc* test. Differences were considered significant for P < 0.05.

Results

MSC isolated from sheep bone marrow were expanded on culture dishes until the end of passage 1 (approximately 17 days). As shown in Table 1, cells proliferated well and reached confluence within 11 days for the first passage. Around 12 CFU-F per million mononucleated cells were counted. After this first amplification, the number of cells increased rapidly as confluence was reached in 6 days. As shown in Figure 1, these cells expressed mainly mesenchymal specific membrane antigens such as CD44 (90.7%). Cells with hematopoietic markers, like CD14 and CD45, were presented in very low proportions. There were almost no endothelial CD31-positive cells. Cultured MSC from sheep also had positive immune labeling for alpha-smooth muscle actin and vimentin (data not shown). Overall, a homogenous cell population of mesenchymal type cells was isolated from sheep bone marrow. In order to demonstrate multipotency, the isolated cells were sub-cultured in osteogenic, chondrogenic or adipogenic media and differentiated within the 3 lineages without difficulty (data not shown). After culture expansion, these cells were cryopreserved until implantation in the same animal (autologous transplantation).

Fourteen sheep underwent surgery under general anesthesia and 2.5 cm long bone defects were created in the diaphysis of the metatarsi. All animals recovered very well from surgery and were able to walk after a few hours without complications. Six weeks after the first surgery, the PMMA spacer was removed and replaced with either BCP granules alone or BCP granules with autologous MSC (n=7 sheep). In accordance with the protocol, 100 million cells were seeded on 5 cm³ of BCP granules for 1 h. The seeding efficiency had been previously determined to be around 60 %. As shown in Figure 2, uniform cell seeding was obtained after 2 days. The entire BCP granule was covered in a thick layer of cells after 21 days in standard medium. Euthanasia of the animals was performed 12 weeks after the second surgical procedure. The explanted metatarsi appeared well healed and consolidated with abundant callus formation. Clinically, no signs of inflammation, infection or tissue necrosis were observed. As shown in Figure 3, the long bone defects in sheep metatarsi were well filled with the BCP granules. Callus formation between the BCP granules was observed on μ CT images of the groups that had received autologous MSC or not. Histology pictures confirmed bone healing over the entire defect (Figure 4). However, bone formation appeared more abundant on the border than in the center of the defects. Mineralized bone was present both on and inside the macroporous BCP granules. In most areas, bone tissue had no connection with the border of the defect. Normal, fibrous vascularized tissue containing bone

marrow occupied the remaining space. At high magnification, mature bone tissue containing osteocytes in contact with the BCP granules was observed. Osteoid tissue with lining osteoblasts and bone remodeling lacunae were also observed. The BSEM images corroborated these results with the presence of mineralized bone tissue within the BCP granules and over the entire defect (Figure 5). Thick cortical bone was observed in certain cases. Nevertheless, there was no visible difference in the amount of bone between the BCP alone group and the BCP with autologous MSC group, 12 weeks after removing the PMMA spacer. The critical-sized 2.5 cm diaphyseal metatarsus defects healed at a comparable rate in both groups. At high magnification, mineralized bone was in direct contact with the BCP granules and had filled some pores of the ceramic. The histomorphometrical calculations corroborated that both groups exhibited similar bone healing over the critical-sized defects. As shown in Figure 6 and Table 2, the quantity of BCP granules was similar in both groups, indicating reproducible filling of the diaphyseal defects ($p>0.05$). The quantity of mineralized bone was slightly lower in the BCP granules with MSC group than in the BCP alone group, but the difference was not significant. The bone-to-ceramic contact confirmed that BCP is an osteoconductive biomaterial and was comparable in both groups.

Discussion

Non union fractures or large bone defects are clinically managed using autologous bone grafting and multiple invasive surgeries. Bone tissue engineering, such as Masquelet's technique, may be an alternative to current treatments. Nevertheless, bone tissue engineering must be validated in preclinical animal models prior to being used in patients. There are, however, a limited number of studies that have been carried out using clinically relevant animal models and critical-sized bone defects (12,14,24,25). Accordingly, the aim of this study was to evaluate the bone regenerative capacity of BCP granules in association or not with autologous MSC by using Masquelet's technique in critical-sized bone defects in sheep. The approach aimed to replace the use of autologous bone grafts, which require an additional surgical site and have complications and limitations. The clinical model selected in this study was in good agreement with actual clinical situations. Sheep metatarsi, unlike the femur, are poorly vascularized sites surrounded by few muscular tissues. Therefore, the diaphyseal metatarsus defect in sheep corresponds closely to the inferior part of the human tibia, one of the most difficult clinical sites for bone repair and reconstruction. In addition, a 2.5 cm metatarsal diaphyseal defect has previously been shown to be of critical size (13). Bone

bridging of the defect was not observed, showing only fibrosis as in non union fractures in patients.

In the last decade, Petite *et al.* have obtained interesting results by using coral (natural calcium carbonate-base ceramic) in association with autologous MSC for the reconstruction of metatarsus defects in sheep (12). In this work, they demonstrated superior bone healing potential for coral seeded with MSC compared to coral alone. Another condition using coral mixed with fresh bone marrow did not produce good results. The approach consisted of seeding 32.5 million MSC on to a coral cylinder overnight prior to implantation in the diaphyseal metatarsus defect. However, these experimental conditions are not applicable to clinical situations where the shape and size of bone defects are not precisely known and time is restricted during surgery. For surgeons, the bone filler material must be easy to handle and capable of fitting complex shaped defects. A second requisite is rapid intervention for the patient and, finally, the use of a scaffold capable of being degraded concomitantly with bone regeneration. With these requirements in mind, and in view of clinical applications, we used BCP ceramic granules (2-4 mm), a biomaterial classically used in orthopedic surgery (25,26). These granules were composed of beta-tricalcium phosphate (80%), which is degraded in the body, and hydroxyapatite (20%) which is barely degraded at all. The BCP granules have been widely used due to their biocompatibility (28), capacity to strongly bind proteins and cells (29-32) and to conduct bone ingrowth (21,28-30). These granules are easy to handle and can easily fill a large bone defect. A recent study has demonstrated that BCP granules had superior stability and osteogenic properties in comparison with autologous bone grafts in critical-sized bone defects in goats (21).

Masquelet's technique was performed in sheep in order to mimic the clinical management of large bone defects in patients. In Masquelet's technique, a PMMA spacer is used to induce the formation of a pseudo-synovial vascularized membrane within 6 weeks. This membrane is advantageous in that it obviates fibrous tissue invasion, induces revascularization and prevents bone graft resorption (3,33). In addition, this membrane *in situ* has been shown to serve as a delivery system for growth and osteoinductive factors (34). In our study, instead of using an autologous bone graft to fill the dipahyseal defect after removing the PMMA spacer, 100 million autologous MSC were mixed with 5 cm³ of BCP granules during surgery. The MSC were isolated from the bone marrow aspirate in a far less invasive and more benign procedure than the harvesting of autologous bone. The cells were easily expanded in culture and cryopreserved prior to surgery. The results showed that BCP granules alone or combined

with MSC led to good bone regeneration in all the animals after 12 weeks of implantation. The BCP granules supported bone healing, agreeing with previous results obtained with autologous bone in this model (13). However, seeding BCP granules with MSC prior to implantation did not enhance bone formation and comparable results were obtained. These results are in disagreement with other studies on small animal models that have shown a benefit in associating BCP with MSC for critical-sized bone healing (35). For instance, human MSC loaded for 2 hours at 37°C prior to implantation on BCP ceramic cylinders were used to fill 8 mm femoral defects in immune compromised rats. Significantly superior bone healing was observed in the group with the cells than in the one using the BCP alone (36). Similarly, studies performed on femoral defects in dogs have also demonstrated a beneficial effect of BCP ceramic cylinders loaded with autologous (37) or allogenic MSC (38) compared to scaffolds left alone. This difference with our results may be partially ascribed to the use of Masquelet's technique and the presence of the induced fibro-vascularized membrane. This model may be too favorable to identify differences between the groups. Furthermore, the quantity of mineralized bone reached after 12 weeks, about 18 % in both groups, may be sufficient for consolidation of the metatarsus. Future investigations should use a one-step surgical procedure without using the PMMA spacer and induced membrane as in Masquelet's technique and should explore a shorter healing time than 12 weeks. Another issue may be the number of cells that actually contributed to the bone healing. To remain close to clinical conditions, the MSC were in contact with BCP granules suspended in the cell-containing solution for only one hour in our study. It might be possible that cells were washed out by blood flow from the BCP surface and did not really contribute to bone healing. The removal of cells by body fluids after surgery may explain similar results in both groups. Instead, Petite *et coll.* cultured their MSC on a coral scaffold overnight at 37°C and showed bone formation in contrast to coral alone in sheep (12). This procedure certainly guaranteed better cell adhesion of the scaffold than in our conditions. In order to improve the number of cells associated with the BCP scaffold, hydrogels that may retain the MSC in the bone defect might also be taken into consideration. The means of associating the MSC and BCP scaffolds is thus of utmost importance in bone tissue engineering. Viateau *et al.* reported that the presence of a large number of viable and functional cells accelerated the bone forming process and resulted in higher bone formation compared to the scaffold alone (14). In this study, the MSC were cultured on coral granules for 10 days using an osteogenic medium leading to MSC confluence prior to implantation. Nevertheless, these hybrid constructs did not lead to systematic bone union in sheep metatarsi. In addition, vascularization must be taken into

account for critical-sized bone defects. The effect of the MSC effect on bone healing might be limited because of the lack of fast and homogenous implant revascularization, raising questions about the long term survival of these cells after implantation. Overall, these results highlighted the difficulty of finding the right balance between optimal clinical procedures and the most suitable MSC association for a successful outcome.

Conclusion

In this work, we have shown that BCP granules can support bone healing in critical-sized diaphysis defects in sheep metatarsi. This study demonstrated good bone regeneration with BCP granules alone or with BCP granules loaded with autologous MSC prior to implantation. Both groups made cortical bone union possible, with homogeneous bone formation along the entire length of the defect. Although the association of autologous MSC with BCP granules did not enhance bone formation, these results provide hope for further experiments with a view to substituting autografts in critical-sized bone defects.

Acknowledgments

Thomas Cordonnier is grateful to the ATOS project at the “Agence Nationale de la Recherche” for supporting his PhD fellowship. The authors thank Ms Kirsty Snaith for correcting the grammar.

Figure captions

Figure 1. Characterization by flow cytometry analysis of sheep mesenchymal stem cell phenotypes at the end of P2. IFM: Mean fluorescent intensity

Figure 2. Stereomicroscopy images of cultured sheep MSC on BCP granules in standard media after 2 (a) and 21 days (b). Note the uniform cell seeding after 2 days and the abundant extracellular matrix production after 21 days (May-Grünwald Giemsa staining)

Figure 3. μ CT images of sheep metatarsus defects filled with BCP granules with or without autologous MSC, 12 weeks after removal of the PMMA cement spacer in 2.5 cm diaphyseal defects. (a, c) across-section images and (b, d) 3D reconstructions.

Figure 4. Non decalcified histology of sheep diaphyseal metatarsus defects filled with BCP granules alone (a, b) or combined with autologous MSC (c, d) 12 weeks after removal of the PMMA cement spacer. Staining with basic fuchsine and methylene blue (a, c) and Goldner's trichrome (b, d). *: BCP; B: mineralized bone; FV: Fibro-vascularized tissue.

Figure 5. BSEM images of sheep diaphyseal metatarsus defects filled with BCP granules alone (a, b) or in combination with autologous MSC (c, d) 12 weeks after removal of the PMMA spacer.

Figure 6. Quantification of BCP ceramic granules and mineralized bone formation in defects filled with BCP alone or in combination with autologous MSC 12 weeks after removing the PMMA cement spacer.

Table caption

Table 1. Proliferation characterization of mesenchymal stem cells harvested from sheep cultured on plastic dishes

Table 2: Histomorphometrical analysis of percentage of BCP particles (biomaterial), mineralized bone, fibro-vascular tissue and bone to ceramic contact in diaphyseal metatarsus defects of sheep filled with BCP granules alone or with BCP and autologous MSCs after 12 weeks.

References

1. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am.* 1982 Fév;64(2):270-279.
2. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991;2(3):187-208.
3. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000 Jun;45(3):346-353.
4. Zárate-Kalfópolos B, Reyes-Sánchez A. [Bone grafts in orthopedic surgery]. *Cir Cir.* 2006 Jun;74(3):217-222.
5. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1999 Mar;(360):71-86.
6. Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. *J Trauma.* 2006 Jun;60(6):1322-1329.
7. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1996 Aoû;(329):300-309.
8. Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1985 Nov;(200):322-342.
9. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1986 Avr;(205):269-291.
10. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng.* 2004 Jan;32(1):160-165.
11. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:19-46.
12. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):959-963.
13. Viateau V, Guillemin G, Yang YC, Bensaid W, Reviron T, Oudina K, et al. A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *Am. J. Vet. Res.* 2004 Déc;65(12):1653-1657.
14. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J. Orthop. Res.* 2007 Jun;25(6):741-749.
15. Winter M, Griss P, de Groot K, Tagai H, Heimke G, von Dijk HJ, et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1981 Jul;2(3):159-160.
16. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002 Fév;(395):81-98.
17. Curran JM, Chen R, Hunt JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials.* 2006 Sep;27(27):4783-4793.

18. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 Avr 26;102(17):5953-5957.
19. Passuti N, Daculsi G, Rogez JM, Martin S, Bainvel JV. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1989 Nov;(248):169-176.
20. Rouvillain JL, Lavallé F, Pascal-Mousselard H, Catonné Y, Daculsi G. Clinical, radiological and histological evaluation of biphasic calcium phosphate bioceramic wedges filling medial high tibial valgisation osteotomies. *Knee.* 2009 Oct;16(5):392-397.
21. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* 2008 Mar;29(9):1177-1188.
22. Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(17):3631-3638.
23. Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone.* 2005 Jun;36(6):1086-1093.
24. Bensaïd W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C, et al. De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Eng.* 2005 Jun;11(5-6):814-824.
25. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000 Mar 5;49(3):328-337.
26. Gouin F, Delécrin J, Passuti N, Touchais S, Poirier P, Bainvel JV. [Filling of bone defects using biphasic macroporous calcium phosphate ceramic. Apropos of 23 cases]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1995;81(1):59-65.
27. Ransford AO, Morley T, Edgar MA, Webb P, Passuti N, Chopin D, et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomized study of 341 patients. *J Bone Joint Surg Br.* 1998 Jan;80(1):13-18.
28. Winter M, Griss P, de Groot K, Tagai H, Heimke G, von Dijk HJ, et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1981 Jul;2(3):159-160.
29. Daculsi G, Bouler JM, LeGeros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int. Rev. Cytol.* 1997;172:129-191.
30. Baslé MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delecrin J, Daculsi G, et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif. Tissue Int.* 1993 Nov;53(5):348-356.
31. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbeau I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Int.* 1990 Jan;46(1):20-27.
32. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic

- calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(8):883-94.
- 33. Pelissier P, Martin D, Baudet J, Lepreux S, Masquelet A. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. *Br J Plast Surg.* 2002 Oct;55(7):596-598.
 - 34. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.* 2004 Jan;22(1):73-79.
 - 35. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-Expanded, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Can Regenerate a Critical-Sized Segmental Bone Defect. *Tissue Engineering.* 1997 6;3(2):173-185.
 - 36. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1998 Mar;16(2):155-162.
 - 37. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 Jul;80(7):985-996.
 - 38. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Oct;85-A(10):1927-1935.

	Time to confluence (days)	Number of trypsinized MS / Number of nonnucleated cells	Number of CFU F/1x10 ⁶ nonnucleated cells	Proliferation rate
Average	11 ± 2.4	0.6 ± 0.3	12.4 ± 8.1	15x10 ⁶ ± 2.2x10 ⁶
S. D. (P0)				
Average	5.7 ± 0.5	N/A	12.4x10 ⁶ ± 3.4x10 ⁶	78.8 ± 7.8
S. D. (P2)				

Table 1: MS Cs proliferation and number of CFU-F in bone marrow of sheep

Group	% Biomaterial	% Mineralized bone	% fibro-vascular non mineralized tissue	% Bone ceramic contact
BCP without cells	27.7±2.9	21.8±5.4	50.4±7.2	48.8±6.5
BCP + MSCs	26.7±2.9	16.5±5.5	56.8±6	38.9±9.7

Table 2: Histomorphometric analysis of percentage of BCP particles (biomaterial mineralized bone, fibrovascular tissue and bone to ceramic contact) in a defect of sheep filled with BCP granules alone or with BCP and autologous CMS 12 weeks

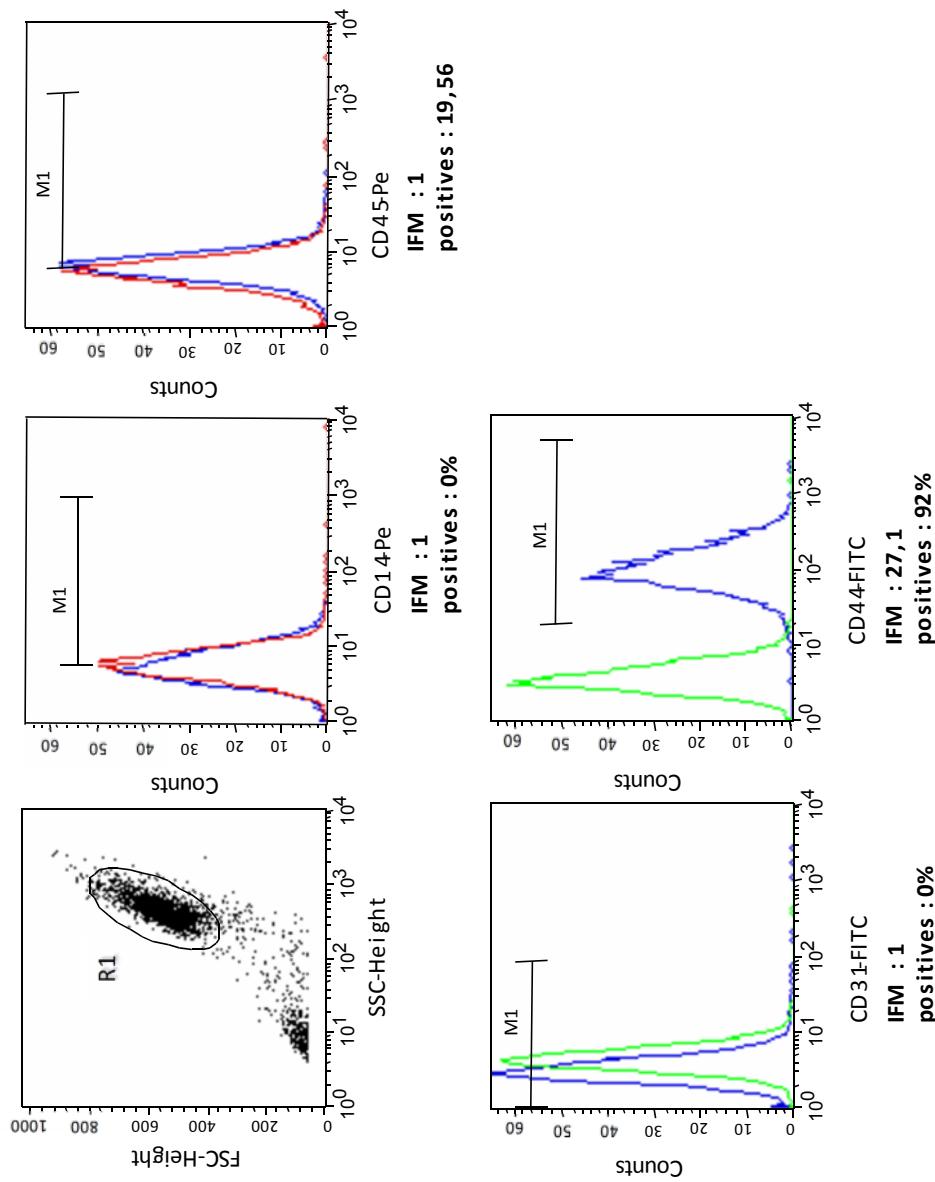


Figure 1. Characterization by flow cytometry analysis of sheep mesenchymal stem cell phenotype at the end of P2. IFM: Mean fluorescent intensity

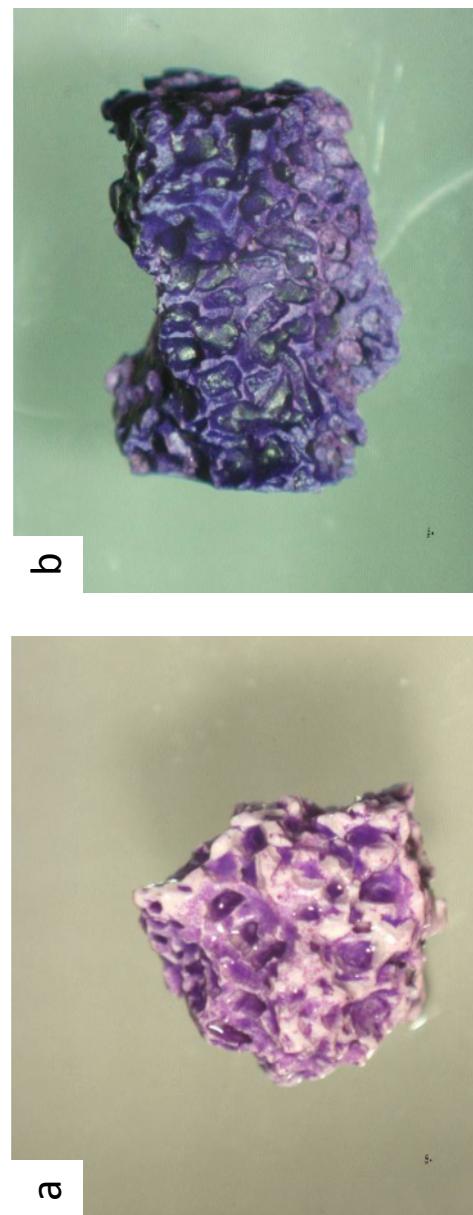


Figure 2. Stereomic microscopy images of cultures seeded on BCP granules in standard conditions (a) and 21 days (b). Note the uniform cell seeding after 2 days and the abundant extracellular matrix production after 21 days (Many green staining)

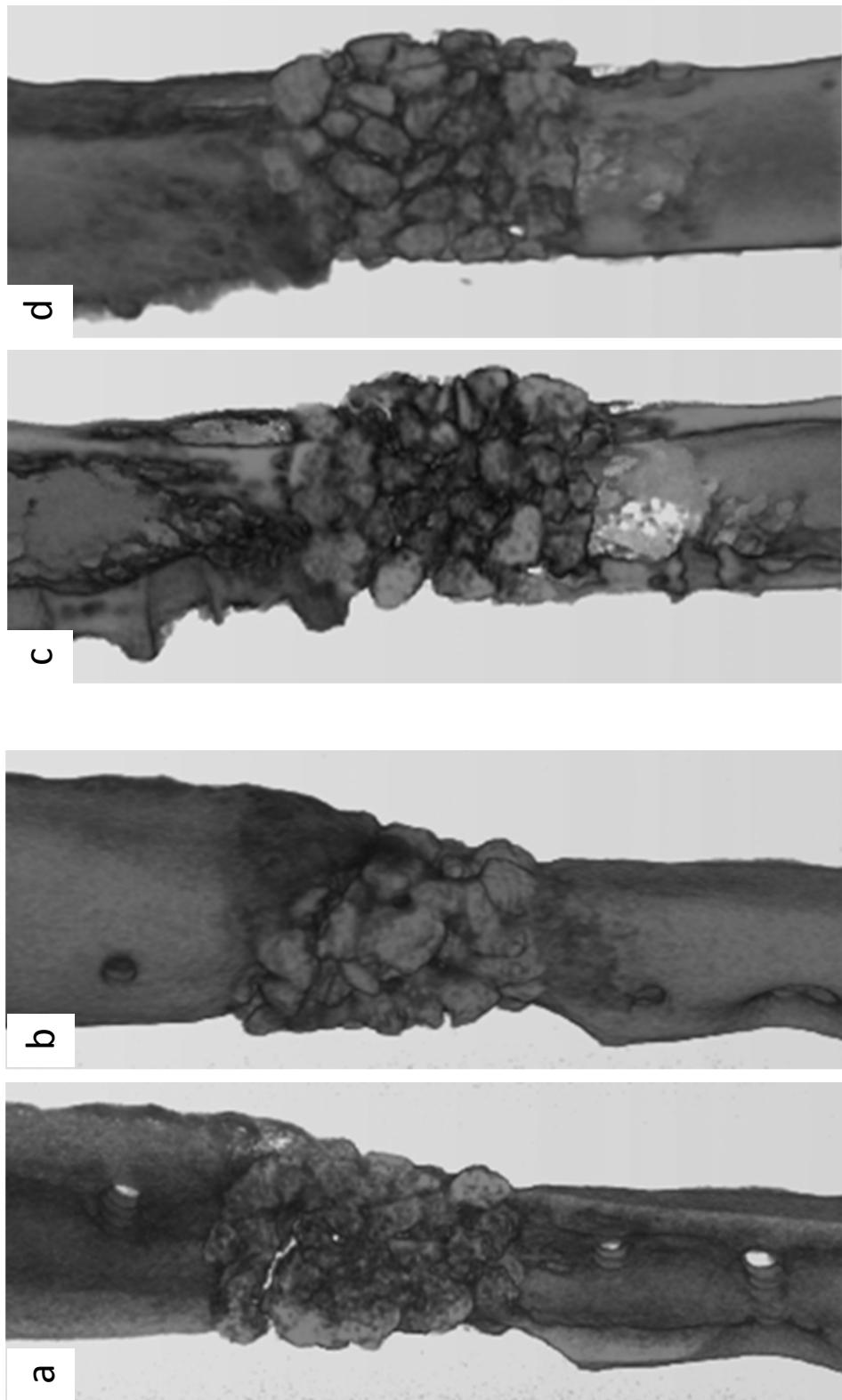


Figure 3. µCT images of sheep tibiae with a critical defect filled with BCP granules after reconstruction using different methods (a, c) and 3D reconstructions (b, d). The images show the progression of bone regeneration and the effects of different reconstruction methods on the bone structure.

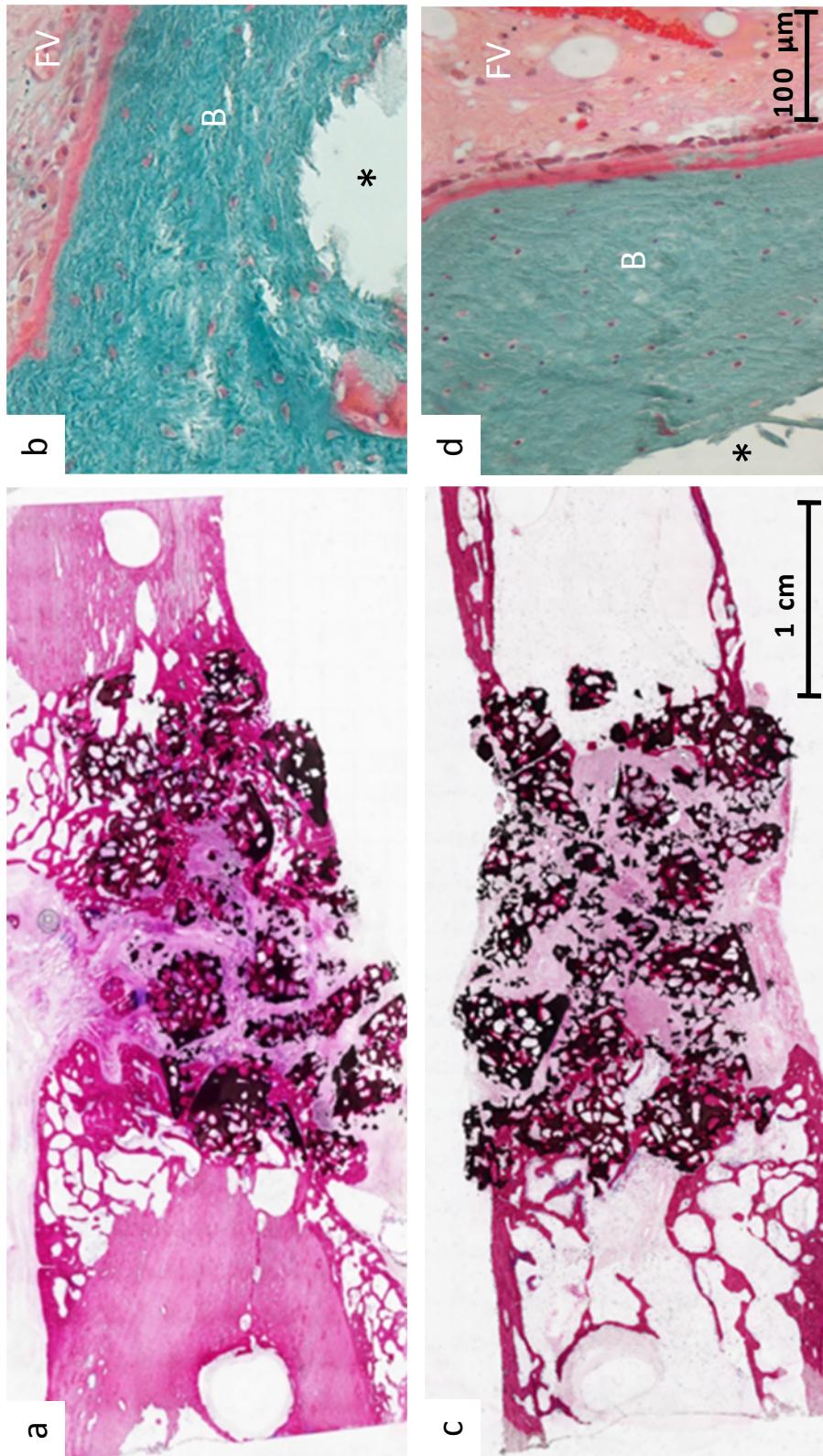


Figure 4. Non-decalcified histology of sheep diaphyseal tissue at 12 weeks after surgery filled with thBCP granules alone (a, b) or combined with the PIMA cement spacer (c, d) 12 weeks after removal of the MIS C (c, d) 12 weeks after removal of the MIS C (c, d). Staining with basic fuchsin and methylene blue (a, c) and Goldner's trichrome (b, d). *: BCP; B: bone; FV: fibrovascular tissue

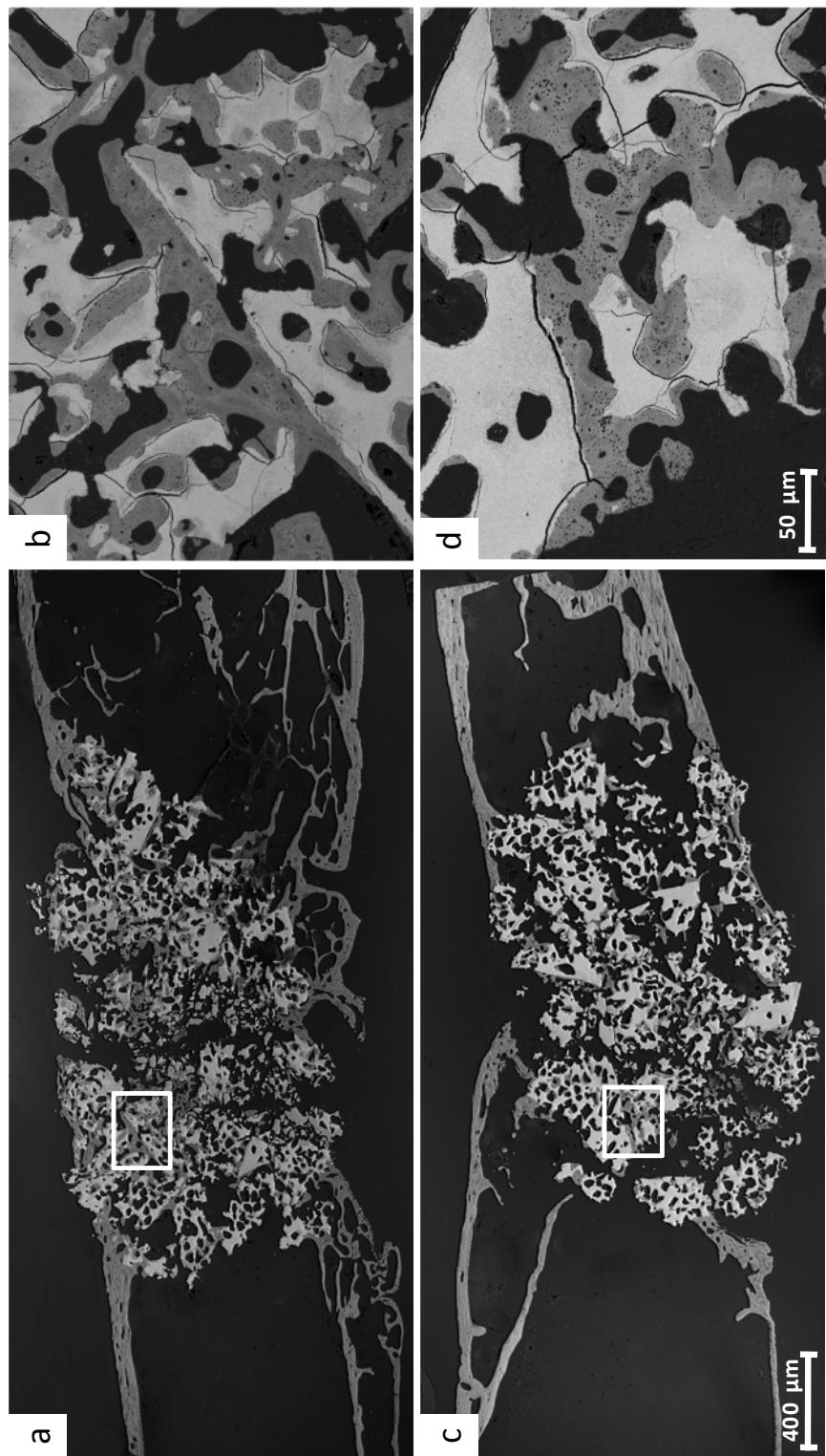


Figure 5. BSEM images of sheep diaphyseal sections at 12 weeks post-surgery. (a, b) Interface between PMMA spacer and bone. (c, d) BCP granules filled in the PMMA spacer.

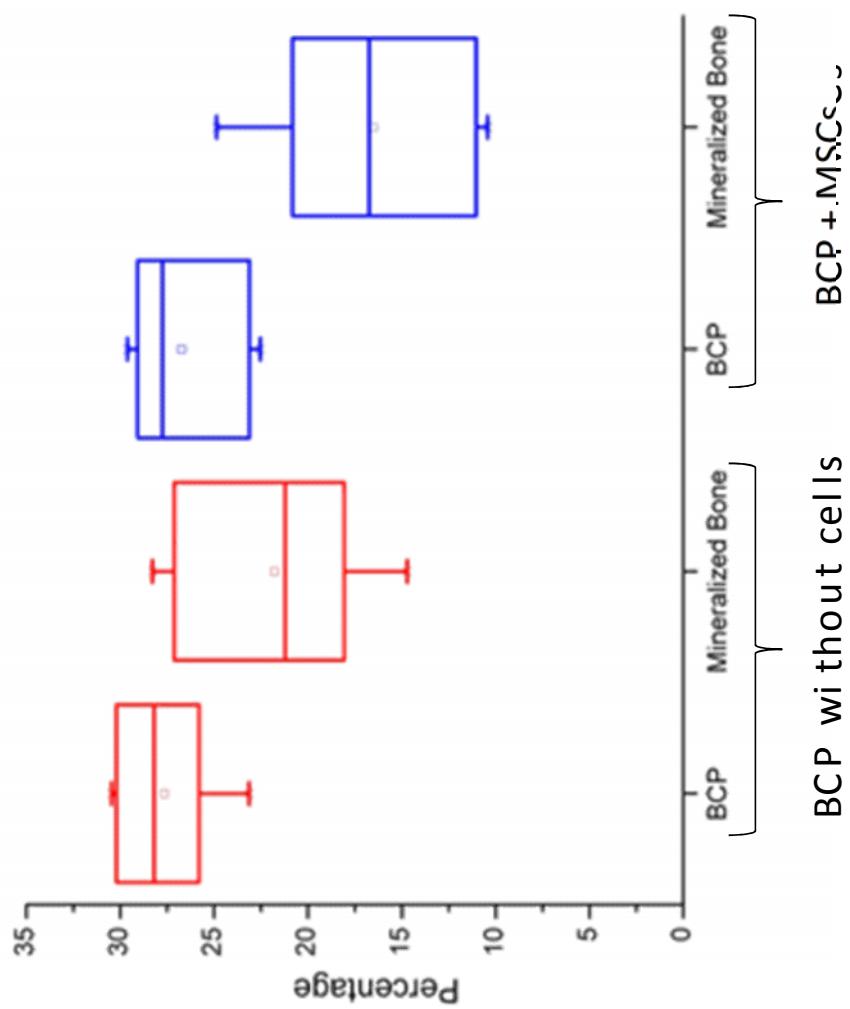


Figure 6. Quantification of BCP ceramic granules and mineralized bone formation in defects filled with BCP alone or in combination with autologous MSCs 12 weeks after removing the PMMA cement spacer

Discussion

Chez l'homme, les fractures non consolidées ainsi que les pertes de substances osseuses importantes sont souvent traitées avec des greffes autologues au cours d'interventions parfois lourdes. L'ingénierie tissulaire osseuse pourrait être une alternative intéressante aux traitements actuellement utilisés comme la technique de Masquelet. Avant d'être appliquée à la clinique, l'ingénierie tissulaire doit néanmoins être testée sur des modèles animaux précliniques. Or, très peu d'études sont réalisées sur des modèles animaux permettant de s'approcher finement de la situation clinique. [296, 297, 303, 304]. Le modèle préclinique utilisé dans cette étude est en parfaite adéquation avec la situation clinique. En effet, les métatarses de brebis sont peu vascularisés et très faiblement entourés de tissu musculaire. C'est pourquoi, une perte de substance osseuse à ce niveau se rapproche des difficultés rencontrées au tiers inférieur du tibia chez l'homme, qui est un des sites où la consolidation est la plus difficile à obtenir.

Pour les chirurgiens, l'utilisation de matériaux facilement manipulables et adaptables à de nombreux défauts est d'un intérêt majeur. D'autres contraintes résident dans la rapidité de l'intervention pour le patient et l'utilisation d'un matériau se dégradant au fur et à mesure de la régénération osseuse. Compte tenu de ces éléments et dans l'optique d'une application clinique, nous avons utilisé dans cette étude des granules de céramique de BCP de taille comprise entre 2 et 4 mm. Ces matériaux sont couramment utilisés en chirurgie orthopédique [305, 306] du fait de leur biocompatibilité [298], de leur capacité à lier les protéines et les cellules [231, 235, 307, 308] et de leur ostéoconduction [231, 235, 298, 301]. Ces granules sont composés à 80 % de phosphate tricalcique *bêta* se dégradant rapidement dans le corps et à 20 % d'hydroxyapatite se dégradant à peine. Leur granulométrie les rend facilement manipulables et permet de combler aisément des défauts osseux de grandes tailles. De plus, une étude récente a pu montrer que les granules de BCP se dégradaient moins rapidement et pouvaient posséder des propriétés ostéogéniques supérieures aux greffes autologues au niveau de défaut osseux de taille critique dans des modèles animaux d'intérêt clinique [301].

Pour mimer une intervention clinique, nous avons utilisé la technique de Masquelet. Mais contrairement à cette technique qui est basée sur une intervention chirurgicale lourde prélevant de l'os autologue, nous avons prélevé de la moelle osseuse autologue de façon peu invasive. Une fois isolées puis amplifiées, les CSM obtenues ont été cryopréservées jusqu'à l'intervention chirurgicale. Les résultats ont montré que les granules de BCP seuls étaient

associés à une formation osseuse et un début de consolidation de l'os cortical pour certains animaux après 12 semaines. Elles n'offrent pas une ostéosynthèse parfaitement stable car sous forme de granules elles n'ont aucune stabilité intrinsèque. Un délai supplémentaire aurait probablement permis d'observer une meilleure corticalisation du cal du fait des contraintes liées à l'appui. Ceci suggère que les granules de BCP favorisent la régénération osseuse *in vivo* au niveau d'un site orthotopique, ce qui est en accord avec de précédentes études chez le petit animal [309]. Néanmoins, contrairement aux résultats observés chez le petit animal [310], les granules de BCP associées avec des CSM autologues n'ont pas abouti à une formation osseuse plus importante. De la même façon, des études réalisées sur des défauts de fémurs de chiens ont démontré un effet bénéfique apporté par des CSM autologues [254] ou allogéniques [311] ensemencées sur des cylindres de BCP par rapport aux cylindres seuls. Cette disparité observée avec nos propres résultats peut être partiellement imputée à la différence entre les modèles animaux de petite taille et les animaux d'intérêt clinique de grande taille. Mais l'utilisation de la technique de Masquelet peut aussi expliquer le manque de bénéfice apporté par les CSM. En effet, les avantages qu'apporte la membrane induite par le ciment [292, 312, 313] peuvent niveler les éventuels effets bénéfiques apportés par les CSM. Enfin, au moment de la mise en place des granules et des CSM, le liquide contenant les CSM a pu s'écouler en dehors de la cavité où étaient déposés les granules. L'idéal serait bien sûr d'aboutir au même résultat avec un seul temps opératoire. Pour améliorer le nombre de cellules associées aux granules de BCP, des hydrogels pourraient être envisagés pour confiner les CSM au niveau du défaut. Par ailleurs, un temps de contact plus important avant implantation pourrait être plus favorable à l'adhésion cellulaire et ainsi améliorer la formation osseuse. Une étude de Viateau *et coll.* a effectivement montré que des CSM cultivées sur du corail durant 10 jours dans un milieu ostéogénique atteignaient la confluence avant implantation et permettaient une formation osseuse plus importante qu'avec les matériaux seuls [297].

Globalement, les céramiques de BCP utilisées apparaissent être un matériau intéressant pour la régénération de grands défauts osseux bien que l'association avec des CSM autologues aboutisse à une formation osseuse similaire au matériau seul. L'effet des CSM sur la régénération osseuse peut être limité par l'absence de la mise en place rapide et homogène d'une néo-vascularisation et soulève la question de la survie cellulaire à long terme après l'implantation. Au-delà de l'association cellules/matériau, la vascularisation doit donc être prise en compte pour ces défauts de taille critique.

Ces résultats soulignent la difficulté de trouver la balance entre des procédures cliniques optimales et une association CSM/matériau appropriée à l'obtention de résultats satisfaisants par l'ingénierie tissulaire. Nous avons pu grâce à cette étude, nous rendre compte de différentes limites que pouvait rencontrer l'ingénierie tissulaire osseuse actuelle. L'adhésion cellulaire ainsi que la différenciation des CSM en ostéoblastes semblent donc être des facteurs cruciaux que nous avons voulu améliorer lors de l'étude décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre 4 : Amélioration du Milieu de Culture des CSM : Effet *in vitro* et *in vivo*

Introduction à la problématique

Les précédents travaux ont montré que l'utilisation de granules de BCP composés de 80 % de β -TCP et de 20 % d'HA permettait de combler des défauts diaphysaires de taille critique avec une bonne régénération de l'os cortical. Nos conditions expérimentales ont abouti à une formation osseuse certes efficace mais similaire que l'ont soit en présence ou non de CSM autologues. Cette première étude s'est basée sur l'utilisation de cellules prolifératives non différenciées. Les ostéoblastes étant les cellules formatrices du tissu osseux, nous avons voulu obtenir des ostéoblastes dérivés de CSM humaines avant l'implantation. Nous avons pour cela évalué *in vitro* différents milieux de différenciations susceptibles de nous procurer de façon rapide et efficace des ostéoblastes matures dérivés de CSM humaines. Lors de l'étude précédente, le temps d'association entre les cellules et le matériau n'était pas suffisant pour permettre une bonne adhésion cellulaire. C'est pourquoi, dans cette nouvelle étude, les cellules ont été cultivées une semaine sur le matériau avant leur implantation. Par ailleurs, nous avons choisi de réaliser des expériences au niveau d'un site moins favorables à la régénération osseuse qui n'est pas prédisposé à la formation osseuse ce qui permet d'évaluer l'effet réel des CSM humaines sur la formation osseuse. Pour cela, nous avons implanté nos greffons en sous-cutané chez la souris immunodéprimée.

Les CSM sont couramment isolées par une étape de culture basée sur un milieu basique contenant un sérum spécifiquement testé pour ses capacités à optimiser l'expansion de cellules multipotentes [314, 315]. Les sérums contiennent de nombreux facteurs comme les cytokines, les facteurs de croissance, les chimiokines, les hormones, les molécules d'attachement au substrat et les protéines d'adhérence et de migration. Bien que l'utilisation des sérums soit essentielle pour la croissance et la survie cellulaire, leur contenu mal déterminé ainsi que leurs variabilités intrinsèques de lot peuvent augmenter les difficultés d'optimisation de la production de cellules ostéorégénératives dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. De plus, les sérums utilisés pour l'expansion des CSM peuvent posséder des activités inhibant la différenciation ostéogénique. Notamment, ces sérums contiennent des molécules qui peuvent activer la voie de signalisation ERK (extracellular receptor kinase) et ainsi supprimer l'ostéogenèse induite par les BMPs (bone morphogenetic proteins) en diminuant la translocation de Smads [316]. Ils contiennent aussi des protéines de type TGF- β 1 (transforming growth factor *bêta* 1) connues pour leurs capacités à inhiber la différenciation cellulaire. Récemment, Maeda et ses collaborateurs ont analysé le mécanisme permettant au

TGF- β 1, provenant du sérum, d'inhiber la maturation ostéogénique BMP-dépendante de la lignée cellulaire myofibroblastique C2C12 [317]. Ces travaux ont mis en évidence la relation croisée entre le TGF- β 1 et la BMP4, tous deux membres de la superfamille des TGF- β qui agissent sur des voies de signalisation similaires (Smads) via les mêmes récepteurs. Néanmoins, cette étude montre que le TGF- β 1, contenu dans le sérum, inhibe la différenciation myocytaire et ostéoblastique alors que la BMP4 inhibe la voie myocytaire et augmente la différenciation ostéoblastique. Les auteurs ont également confirmé leurs résultats sur des CSM humaines mais n'ont pas examiné la maturation complète et la fonctionnalité des ostéoblastes humains générés. Par conséquent, l'utilisation de BMPs comme facteurs ostéogéniques combinés avec un fort taux de sérum semble être inefficace pour induire la voie osseuse, mis à part avec de très fortes doses de BMPs (par ex. 300 ng/ml). L'utilisation d'un inhibiteur du TGF- β 1 pourrait accélérer la différenciation induite par la BMP4.

Dans les approches d'ITO couramment utilisées, le glucocorticoïde dexaméthasone (Dex) est largement employé dans le milieu de culture afin d'induire la différenciation ostéogénique des CSM *in vitro* et étudier la biologie osseuse *in vivo*. Néanmoins, les effets de la Dex sont controversés car cette molécule augmente la minéralisation en culture *in vitro* alors qu'elle diminue la formation osseuse *in vivo* [318-321]. Ces contradictions peuvent être expliquées par les dérèglements observés *in vivo* au niveau de cellules non ostéoblastiques connues pour avoir des fonctions importantes dans la formation osseuse, notamment les ostéoclastes [322]. Par exemple, les fonctions ostéoclastiques sont inhibées par un traitement à la Dex [323].

Pour résoudre ces problèmes et améliorer la différenciation des CSM, nous avons voulu examiner le bénéfice apporté par la réduction de la teneur en sérum dans des milieux ostéogéniques indépendamment de l'inducteur, Dex ou BMPs. Ces travaux, décrits dans l'article « Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum», ont permis de confronter les effets de différents milieux sur la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique. Les milieux contenant de la Dex ou une BMP, à différentes concentrations de sérum ont été évalué *in vitro* et l'induction d'ostéoblastes fonctionnels a été évaluée *in vivo* après 8 semaines d'implantation chez la souris nude.

Article 2 : Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum.

Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum

Thomas Cordonnier,^{1,2} Alain Langonné,^{2,3} Jérôme Sohier,¹ Pierre Layrolle,¹ Philippe Rosset,^{2,4} Luc Sensé bé,^{2,3} and Frédéric Deschaseaux^{2,3}

Providing fully mature and functional osteoblasts is challenging for bone tissue engineering and regenerative medicine. Such cells could be obtained from multipotent bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) after induction by different osteogenic factors. However, there are some discrepancies in results, notably due to the use of sera and to the type of osteogenic factor. In this study, we compared the osteogenic differentiation of bone marrow MSCs induced by dexamethasone (Dex) or bone morphogenetic proteins (BMPs) by assessing phenotypes in vitro and functional osteoblasts in vivo. Reducing the content of fetal calf serum from 10% to 2% significantly increased the mineral deposition and expression of osteoblastic markers during osteogenesis. In comparison to Dex condition, the addition of BMP4 greatly improved the differentiation of MSCs into fully mature osteoblasts as seen by high expression of Osterix. These results were confirmed in different supportive matrixes, plastic flasks, or biphasic calcium phosphate biomaterials. In contrast to Dex-derived osteoblasts, BMP4-derived osteoblasts from MSCs were significantly able to produce new bone in subcutis of nude mice in accordance with in vitro results. In conclusion, we describe a convenient ex vivo method to produce consistently mature functional osteoblasts from human MSCs with use of BMP4 and low serum.

Introduction

Some bone pathologies such as bone defects, nonunion fractures, osteonecrosis, and osteoporosis still lack efficient treatments. The use of stem/progenitor cells as osteo-regenerative cells to give rise to new functional bone or as tools for studying both normal and pathological osteogenesis could be of first interest for the medicine. Among osteo-regenerative cells, mesenchymal stem cells (also named mesenchymal stromal cells, MSCs) are of primary interest. Bone marrow MSCs are multipotent cells because they can generate osteoblasts, chondroblasts, and adipocytes in vitro and in vivo, thus constituting the nonhematopoietic compartment of skeletal tissues.¹ To regenerate bone, autologous bone grafting is generally considered the gold standard and the best material because it contains several elements that are critical for promoting bone formation. These elements include osteo-regenerative cells, matrix, and proteins inducing osteogenesis such as bone morphogenetic proteins (BMPs) belonging to the transforming growth factor-*b* (TGF-*b*)

family.² However, autologous bone for graft is associated with some pitfalls, that is, lack of sufficient graft materials; postoperative pain at the donor site; potential injury to the surrounding arteries, nerves, and tissues; and risk of infection.³⁻⁵ These drawbacks can hamper the use of autologous grafting and prompt researchers to find new solutions for ex vivo production of bone grafts, notably by using osteo-regenerative cells and biomaterials. For clinical use, culture protocols must be well defined, with short production delays, and entail strong reconstitution potential for cells.

MSCs are commonly selected by a culture step based on basal medium containing a specific serum screened for its capacity to maximize the expansion of multipotent cells.^{6,7} However, such sera contain numerous factors such as cytokines, growth factors, chemokines, hormones, substrate-attachment molecules, and binding proteins for transport and presentation. Although the utility of sera is crucial for the growth and survival of cells, their undefined content, as well as their batch-to-batch variability, could increase the difficulties in optimizing osteo-regenerative cell production

¹Laboratory for Bone Resorption Physiopathology and Primary Bone Tumors Therapy, Faculty of Medicine, INSERM U957, Nantes, France.

²EA3855, Laboratory of Hematopoiesis, Rabelais University, Tours, France.

³Research Department, Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Tours, France.

⁴Orthopedic Department, Trousseau Hospital, Tours, France.

for tissue engineering. In addition, sera can have inhibitory activities in osteogenic differentiation. Notably, sera contain molecules that can activate the extracellular receptor kinase pathway, thereby suppressing BMP-induced osteogenesis by decreasing Smad translocation.⁸ Recently, Maeda et al. analyzed mechanisms allowing serum-derived TGF- β 1 to inhibit the osteogenic maturation of the myofibroblastic cell line C2C12.⁹ The authors also confirmed the results with some data about human MSCs but did not explore the full maturation and function of the generated human osteoblasts. Therefore, the use of BMPs as osteogenic factors combined with high serum content seems to be inefficient for inducing bone fate except with very high doses of BMPs (i.e.,

>300 ng/mL). In addition to sera, the glucocorticoid molecule dexamethasone (Dex) is widely used to induce MSC osteogenic differentiation in vitro and to study bone biology in vivo. However, Dex effects are controversial because the activity of bone cells in vivo.¹⁰⁻¹³ Such discrepancies could be explained by disturbances observed in non-osteoblastic cells in vivo known to have strong functions in bone formation, notably in osteoclastic cells.¹⁴ For example, osteoclast functions are inhibited with Dex result, consensus is lacking on efficient osteogenic factors, despite their crucial role in studying human bone biology and bone regenerative medicine.

Therefore, we aimed to investigate the benefits of reducing serum content in osteogenic media whatever the osteogenic inducer, Dex or BMPs, for MSC osteogenic differentiation. We confirmed the effects in vitro and in vivo and further showed that, compared to Dex, BMP4 was the strongest factor, even at a low concentration, for inducing full osteogenic differentiation of MSCs and ectopic bone formation in subcutis of nude mice, thus reducing the time needed to obtain the full maturation of osteoblasts.

Materials and Methods

Cell isolation and expansion

According to the Ethics Committee of Tours University Hospital and after receiving the written informed consent of normal donors (n=17 donors; age = 59.8 ± 3.9; range = 37–80), 20 mL of bone marrow was harvested by iliac crest aspiration with a Jamshidi needle.

MSCs were obtained as previously described for clinical use.¹⁶ Briefly, bone marrow nucleated cells (5×10⁴ cm²) were cultured in proliferation medium of alpha-modified Eagle's medium (a-MEM; Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone), and 1 ng/mL fibroblast growth factor-2 (R&D Systems) and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. The medium was renewed twice weekly until cells reached confluence. Then, cells were harvested, seeded at 1 10³ cm², and expanded in culture flasks until passage 2 before being seeded onto plastic dishes or ceramic discs (described in detail later for osteogenic induction. Analysis of MSC characteristics was as described previously,¹⁷ which confirmed the phenotype and multipotency of all expanded cells tested (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertonline.com/ten). Each experiment was performed with cells isolated from at least three different do-

nors. The number of donors used in each experiment is indicated in the figure legend or in Materials and Methods.

Induction of osteoblastic differentiation

Different a-MEM-based osteogenic media were tested during the indicated times. The first contained b-glycerophosphate (10 mM), ascorbic acid-2-phosphate (0.2 mM), and Dex (10⁻⁷ M; all Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS (v/v; Dex-10% FCS) or 2% FCS (Dex-2% FCS). The others consisted of a-MEM-based media with 50 ng/mL BMP2, 4, or 7 (R&D Systems) supplemented with 10% or 2% FCS.

Histochemical analysis

MSCs were cultured at 1×10⁴ cells/cm² in chamber slides (Lab-tek/Nalge Nunc) in the evaluated differentiation media. To detect mineralization after induction, cells were treated with Alizarin red and Von Kossa reagents (both Sigma-Aldrich) for calcium detection and then observed under a photonic microscope (Leica Microsystems).

Western blot analysis

Culture of cells incubated with the different osteogenic media was stopped at different times (0, 7, 14, and 21 days). Western blot analysis was performed as described.¹⁷ The membranes were washed three times and incubated with the primary antibodies anti-a-smooth muscle actin (αSM-actin, clone 1a4; Sigma-Aldrich), antitissue nonspecific alkaline phosphatase (ALPL, clone B4-78; R&D Systems), anticalcium-sensing receptor (CaSR; clone F-19; Santa Cruz Biotechnology), antiosteopontin (polyclonal; GeneTex), and anti-β-actin (clone AC15; Sigma-Aldrich) in phosphate-buffered saline containing 5% bovine serum albumin overnight at 4°C. After a washing, membranes were incubated with a secondary antibody (Bio-Rad Laboratories) for 1 h at room temperature. Protein bands were observed with the ECLplus Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare), and images were acquired with use of Chemi-smart 2000 and Chemocapt software (Vilbert-Lourmat).

Flow cytometry

Monoclonal antibodies used for phenotyping MSCs were anti-CD45, anti-CD14, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD146, and anti-CD166 conjugated to phycoerythrin (Becton-Dickinson). Cells were also incubated with phycoerythrin-conjugated anti-ALPL for flow cytometry. An irrelevant isotypic antibody was used as a negative control. To determine Smad phosphorylation after BMPs induction, we used rabbit antiphosphorylated Smad 1, 5 antibody after fixation and permeabilization of cells according to the manufacturer's protocols (Cell Signaling). Cells were then analyzed by use of a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson) with a 488-nm argon laser. Samples were analyzed by collecting 30,000 events by Cell-Quest software (Becton-Dickinson).

Culture on biphasic calcium phosphate scaffolds

Macroporous biphasic calcium phosphate (BCP) ceramic discs 8 mm in diameter and 3 mm thick (Biomatlante SA)

were composed of 20 hydroxyapatite and 80 wt.% β -tricalcium phosphate and sterilized by gamma irradiation (total porosity: 70–75%; macroporosity: 400 μm). To minimize ion release, discs were incubated for 48 h in twice-refreshed proliferation medium (a-MEM, 10% FCS, and 1% antibiotic/antimycotic) before cell seeding. Cells were then seeded at 7.5×10^5 cells per BCP disc in nontreated culture dishes (Corning Life Sciences) and cultured during 1, 7, 14, and 21 days in the assessed media (i.e., proliferation medium, or Dex or BMP-containing medium supplemented with 2% or 10% FCS).

RT-polymerase chain reaction analysis

Real-time RT-polymerase chain reaction (PCR) was used to evaluate the relative level of genes characteristic of osteoblastic commitment. Cells cultured on ceramic discs or plastic dishes were transferred into a 1.5 mL tube with lysis buffer and vigorously shaken to lyse the cells. Total RNA was extracted with use of an RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

After desoxyribonuclease I digestion (Invitrogen), RNA samples (1 mg) were reverse transcribed with avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase and random primers in a total volume of 25 mL. Real-time quantitative PCR was performed in the Chromo4 System (Bio-Rad Laboratories) with SYBR Green detection and Titanium Taq DNA polymerase according to the manufacturer's recommendations. PCR amplification involved 39 cycles of 30 s at 98°C, 15 s at 95°C, and 30 s at 60°C. Expression of the target gene was normalized to that of the endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels as previously described.¹⁸ Primer sequences are summarized in Table 1.

Animal study and histology

All animal procedures were performed in accordance with a protocol approved by the local committee for animal care and ethics. Notably, standards and practices in animal experiments are considered statistically significant for 5% or p -value < 0.05 . This significant value is usually obtained for

$n = 5$ animals per group at minimum. Two hundred microliters of medium containing 7.5×10^5 human MSCs was seeded onto BCP discs and after their absorption 1 mL of medium was added (experiments repeated with MSCs deriving from three different donors). The cells were cultured in the different tested media for 7 days in low attachment plates, and media were refreshed twice weekly. Three different media were studied: classical osteogenic medium with 10% FCS (Dex-10% FCS), osteogenic medium with 2% FCS (Dex-2% FCS), and BMP4 medium with 2% FCS (BMP4-2% FCS). Five samples were used for each condition. After this culture period, the BCP discs were subcutaneously implanted in the backs of 10 NMRI nude mice (Elevage Roger Janvier). A 1-cm-long incision was made on each side of the mouse back, and blunt dissection was performed to separate the skin from subcutaneous connective tissue to form pockets into which the discs were inserted. The mice were killed after 8 weeks by lethal intracardiac injection of thiopental, and the implants were retrieved. The explants were processed according to standard operating procedures for non-decalcified histology. The samples were immersed in Karnovsky's fixative (4% formaldehyde and 5% glutaraldehyde), dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in polymethylmethacrylate. After polymerization, 100 μm -thick cross sections of the samples were obtained by use of a diamond-saw microtome (Leica SP 1600; Leica Microsystems), stained with methylene blue and basic fuchsin, and analyzed by light microscopy.

Bone quantification

Newly formed bone within each explant was quantified by back-scattered scanning electron microscopy. Sections of the explants were polished and gold sputter-coated by use of

a Cressington 108 auto apparatus (Cressington Scientific Instruments). Before histomorphometrical analysis, back-scattered scanning electron microscopic images were taken at 15 kV by use of an electronic microscope (Leo 1450 VP Carl Zeiss). This technique allows for separating bone from the implanted ceramics on the basis of their respective electronic densities. The amount of new bone formation within the macroporous BCP discs was then quantified by image analysis (Quantimet 4; Leica Microsystems).

Table 1. Primers Used for Quantitative RT-Polymerase Chain Reaction

Primer	Sequence (5 ⁰ –3 ⁰)	PCR product length (nt)
Human GAPDH/left primer	agccacatcgctcagacac	66
Human GAPDH/right primer	gcccaatacgcaccaaatcc	
Human α SM actin/left primer	ctgttcccgccatccctcat	70
Human α SM actin/right primer	tcatatgtctgttgtatgggt	
Human ALPL/left primer	aaccaccacccaggaaac	
Human ALPL/right primer	ggtcacaaatgcccacagatt	78
Human PTHR1/left primer	ggggtttcacagtcttcg	
Human PTHR1/right primer	tggccagggtatgctgaa	78
BSP/left primer	cgaatacacggggctcaatg	
Human BSP/right primer	gtatcgtaatcttccataggc	109
Human OCN/left primer	ggcgtacactgtatcaatgg	
Human OCN/right primer	tcagccaaactgtcacagtc	106
Human Osx/left primer	ggctcagctctccatctg	
Human Osx/right primer	ggggactggagccatagtg	103

Statistical analysis

Data are expressed as mean standard error of the mean and were analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test. A two-sided $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of serum concentration

After expansion, cells were cultured in differentiation media containing 2% or 10% FCS and Dex as the osteogenic factor. Proliferation and mineralization were assessed after days 7 and 21, respectively. As compared with day 0, at day 7, cells cultured with 10% FCS showed a significant increase in proliferation, whereas those cultured with 2% FCS showed lower mitogenic activity (Fig. 1A).

With regard to mineralization, 2% FCS produced greater calcium and phosphate deposition than did 10% FCS (Fig. 1B). Similar effects were observed when using three serum batches from different donors (Fig. 1C).

We examined expression of several molecular markers delineating different phases of MSC osteoblastic differentiation. α SM actin is a well-known marker of immature proliferative MSCs, whereas ALPL is induced early in osteoblast maturation, and CaSR expression is detected later in the process.¹⁹⁻²¹ The level of α SM actin protein was decreased

after 7 days of 2% FCS culture (Fig. 1D) but was constant with 10% FCS culture. In addition, with 2% FCS, the level of ALPL protein was transiently upregulated early during the differentiation process but was regularly increased with 10% FCS. However, the level of CaSR increased and remained high after 14 days with 2% FCS than with 10% FCS.

Potentiation of serum effect with osteogenic inducers

We determined whether the low serum effect could also be observed with other types of osteogenic inducers such as BMPs. Cells were cultured in media containing Dex or BMP2, 4, or 7. Because expression of osteoblastic proteins was observed early in culture, we chose day 10 as the endpoint for the following investigations. Flow cytometry revealed a higher ALPL expression level in cells cultured with 2% FCS, regardless of the other medium components (Fig. 2). The substitution of Dex by BMPs induced a further increase in ALPL expression, with BMP4 the most potent inducer.

Next, we determined expression of other osteoblastic markers with Dex or BMP4 and 2% FCS culture. Relative mRNA expression of early (ALPL) and late (PTHR1, BSP Osterix) osteoblastic markers was higher in cells cultured with BMP4-2% FCS than with Dex-2% FCS (Fig. 3A). These increases were accompanied by a decrease in α SM actin mRNA expression level, which indicated the loss of the immature state.

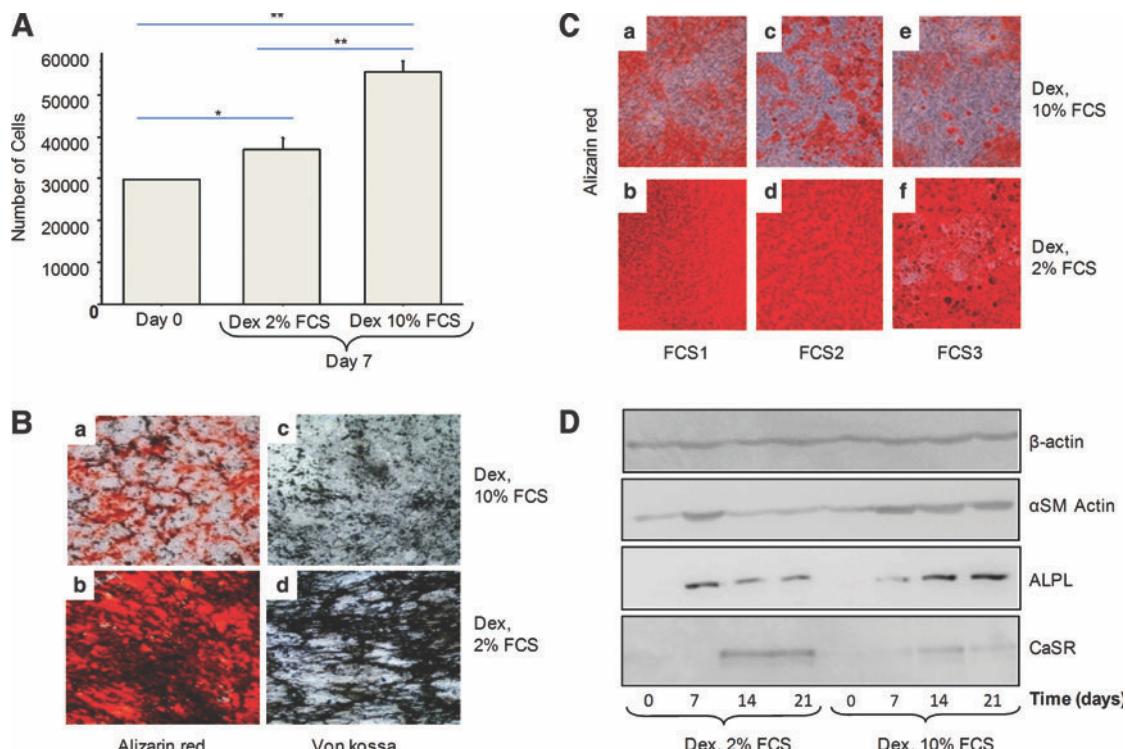


FIG. 1. Effect of different FCS concentrations on cell proliferation of MSCs. Human MSCs were cultured in osteogenic medium (Dex) containing 10% or 2% FCS to evaluate their proliferation (A) and determine their osteoblastic differentiation (B-D). (A) In total, 30,000 cells were seeded and counted after 7 days of culture. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) At day 21, cells were stained with Alizarin red (a, b) and Von Kossa (c, d) solutions. (C) Cells from different donors ($n=5$) cultured in osteogenic media with 10% of three different FCS (purchased from different manufacturers) (a, c, e) or 2% FCS (b, d, f) were tested in terms of mineralization induction (Alizarin red staining at day 21). (D) Western blot analysis of osteoblastic and MSC markers with 21-day culture: β -actin, α SM actin, tissue nonspecific ALPL, or CaSR. FCS, fetal calf serum; MSCs, mesenchymal stem cells; Dex, dexamethasone; SM, smooth muscle; ALPL, alkaline phosphatase; CaSR, calcium-sensing receptor. Color images available online at www.liebertonline.com/ten.

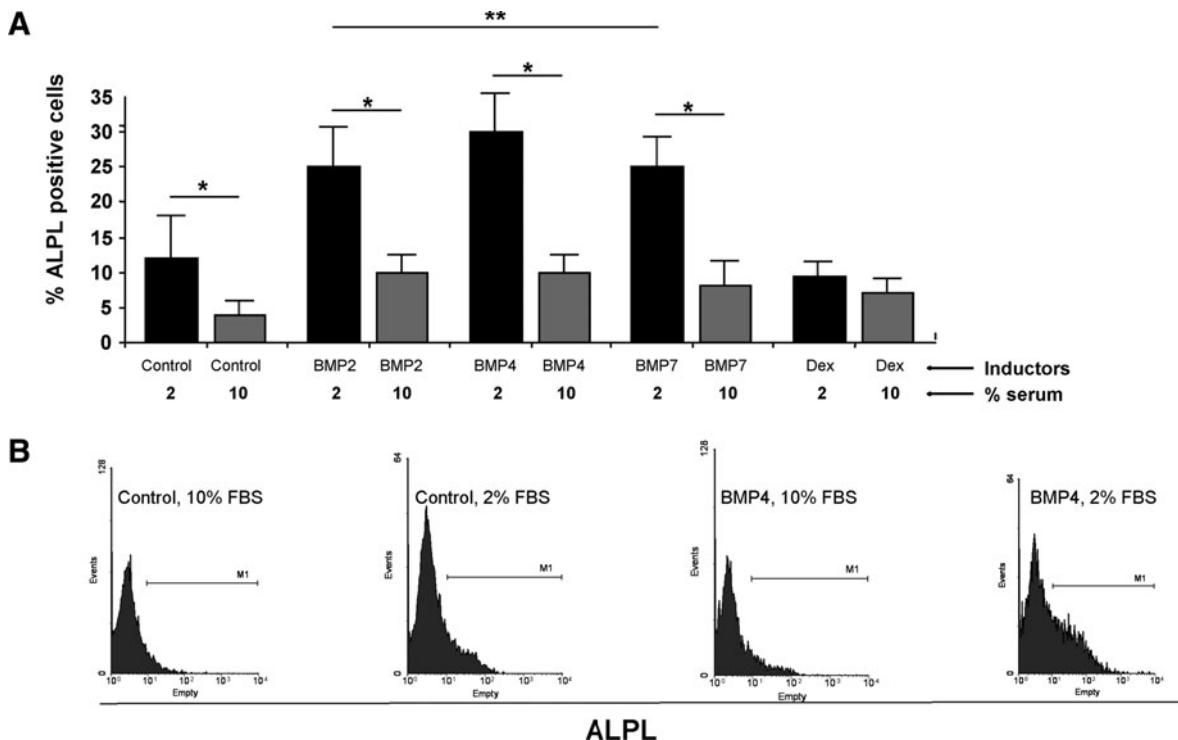


FIG. 2. Flow cytometry analysis of ALPL protein expression. Human MSCs were cultured for 10 days in proliferation medium (control) or differentiation medium containing 2% or 10% FCS and different osteoblastic inducers (BMP2, 4, 7, and Dex). (A) Representative flow cytometry results of ALPL-positive cell percentages with control culture and BMP4 and 2% or 10% FCS culture. *p < 0.05 between 2% and 10% FCS, **p < 0.05 between BMP and 2% FCS and other conditions. (B) Representative flow cytometry histograms of ALPL expression with BMP4 induction (six different donors). BMP, bone morphogenetic protein.

Protein expression of the markers after 10 days of culture was in agreement with mRNA expression results. Indeed, ALPL protein expression was higher with BMP4-2% FCS than with Dex-2% FCS (Fig. 3B). Further, BMP4-2% FCS but not Dex-2% FCS was able to induce Osterix ex-

pression after 10 days of culture. As well, the addition of BMP4 induced the phosphorylation of Smad1, 5 proteins, which demonstrates activation of the BMP signaling pathway (Fig. 3C). Therefore, osteoblastic differentiation induction is significantly more potent at low serum content

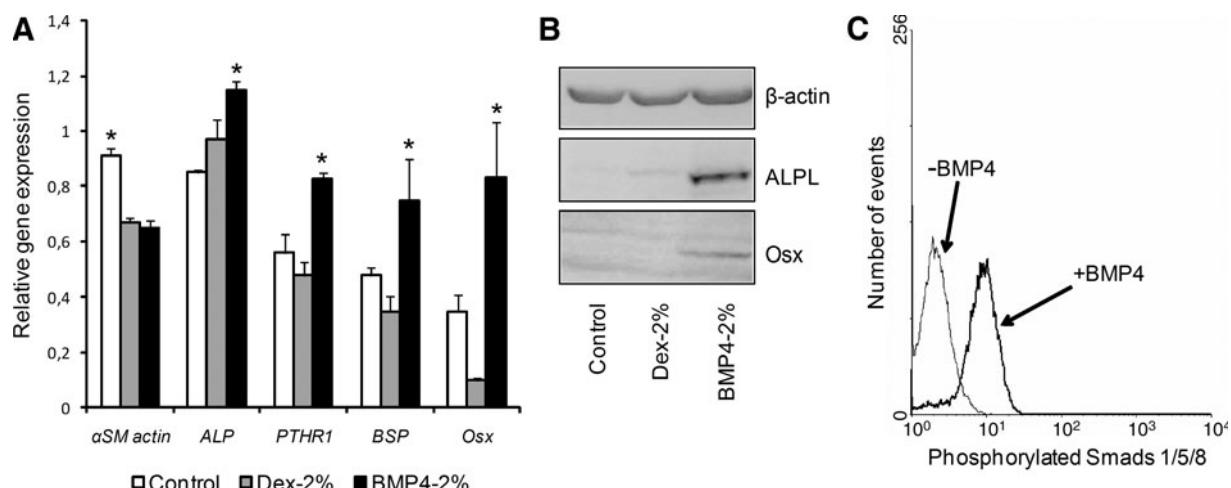


FIG. 3. Osteogenic effect of BMP4 and 2% FCS on human MSCs. Cells were cultured for 10 days in proliferation medium (control, 10% FCS), osteogenic medium with 2% FCS (Dex-2% FCS), or BMP4 with 2% FCS (BMP4-2% FCS). (A) Quantitative RT-polymerase chain reaction analysis of mRNA expression of BSP, tissue nonspecific ALPL, α SM actin, PTHR1, and Osterix. (B) Western blot analysis of protein expression of β -actin (as internal control), ALPL, and osterix. (C) Flow cytometry analysis of phosphorylation of proteins of intracellular transduction signal Smads 1, 5 on BMP4 induction. Representative results of experiments with cells from three different donors. BSP, bone sialoprotein; PTHR1, parathyroid hormone receptor 1.

and the addition of BMP4 regardless of Dex further increased osteogenesis.

Gene expression profile of differentiating cells seeded on ceramic scaffolds

We next asked whether benefits observed when cells were cultured on plastic could also be obtained when BCP biomaterials are used as scaffold. Thus, we checked mRNA expression of osteoblastic markers over 21 days of culture. ALPL gene expression with BMP4-2% FCS was increased until 21 days of culture and remained higher than that with Dex-2% FCS and the proliferation medium (Fig. 4). Similarly, BSP gene expression was higher with BMP4-2% FCS, although to a lesser extent than that for ALPL. Expression of late osteoblastic markers (i.e., Osteocalcin and Osterix) was low with control and Dex-2% FCS but high with BMP4-2% FCS. Therefore, we observed an upregulation of gene expression whatever the gene tested with BMP4-2% FCS used as the osteoinducer. Moreover, Osterix (the crucial transcription factor for osteoblastic maturation) was induced early with BMP4-2% FCS because its expression was detected at day 1. Such upregulation was never detected with Dex-2% FCS. Taken together, these results further showed that the effect of BMP4-2% FCS on osteogenesis was substrate independent.

In vivo bone formation

To corroborate the consistency of in vitro results and assess the functional capacity of ex vivo-derived osteoblasts to form

bone, differentiating cells were seeded on BCP scaffolds and implanted subcutaneously in nude mice. All osteogenic media evaluated in vitro induced bone formation ectopically (Fig. 5A). Bone tissue was found peripherally and within outer pores of the BCP discs. Newly formed bone was in direct contact with the BCP surface. The mineralized bone matrix enclosed numerous lacunae, which indicated the capacity of osteoblasts to terminally differentiate into osteocytes. However, Dex-2% FCS induced the lowest amount of bone formation within the ceramic discs (Fig. 5B). Conversely, BMP4-2% FCS resulted in the highest level of bone deposition, followed by the classical osteoblastic differentiation medium Dex-10% FCS. However, there were no significant differences in bone deposition between these two media.

Discussion

With the emergence of bone tissue engineering (BTE), promising results have been obtained in vivo in model animal experiments.²²⁻²⁶ However, convincing data have not been reported with human studies. Such absence can be linked to the lack of knowledge of the human MSC commitment into an osteoblastic lineage and the difficulties in maintaining this differentiation in vivo. The interests of BTE and regenerative medicine prompted us to find new methods to improve the speed of in vitro osteoblastic maturation with, at the origin, MSCs expanded in vitro with easy to use procedures.

Our method of reducing the serum content of the osteogenic medium and adding the osteogenic inducer BMP4 at a

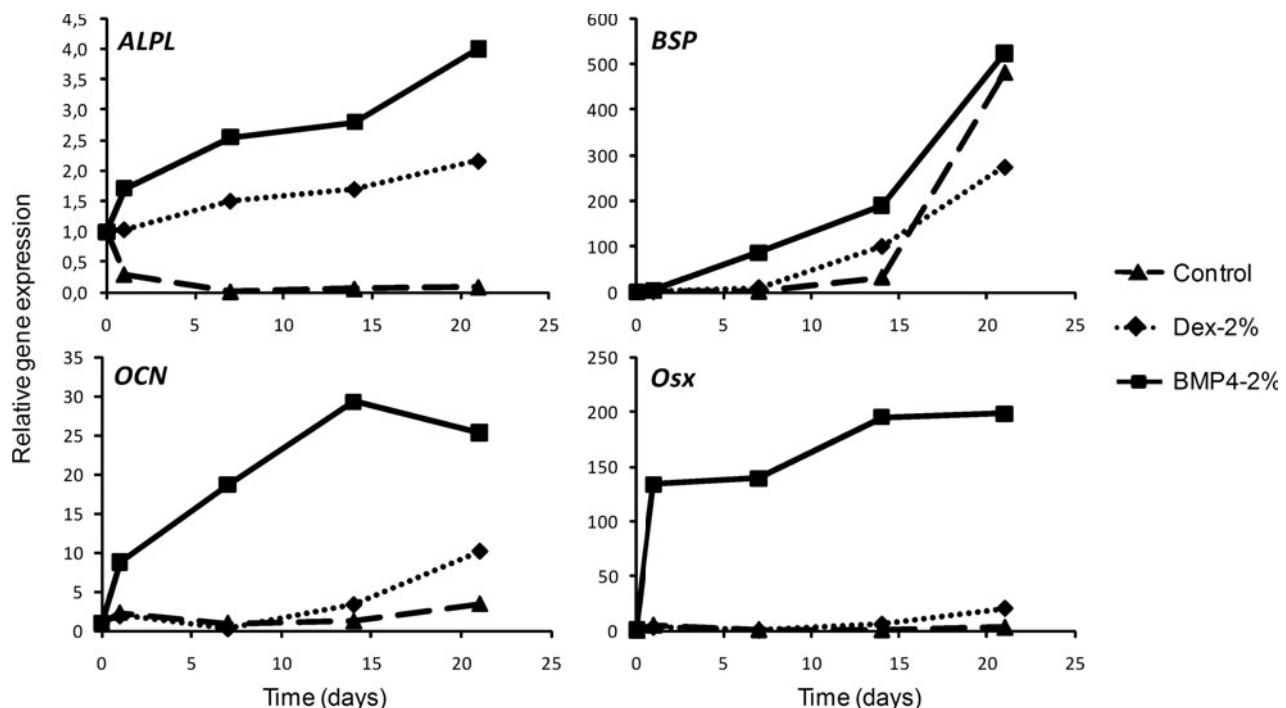


FIG. 4. Expression profile during osteogenesis on BCP discs. Cells were cultured for 21 days on BCP discs in control 10% FCS or osteogenic (Dex-2% FCS or BMP4-2% FCS) media. Quantitative RT-polymerase chain reaction was performed on tissue nonspecific ALPL, BSP, OCN, and Osx mRNA. Gene expression was normalized to that of the control (cells before seeding on HA-TCP discs). Representative results of experiments with cells from three different donors. BCP, biphasic calcium phosphate; OCN, osteocalcin; Osx, osterix.

EX VIVO PRODUCTION OF FUNCTIONAL HUMAN OSTEOBLASTS

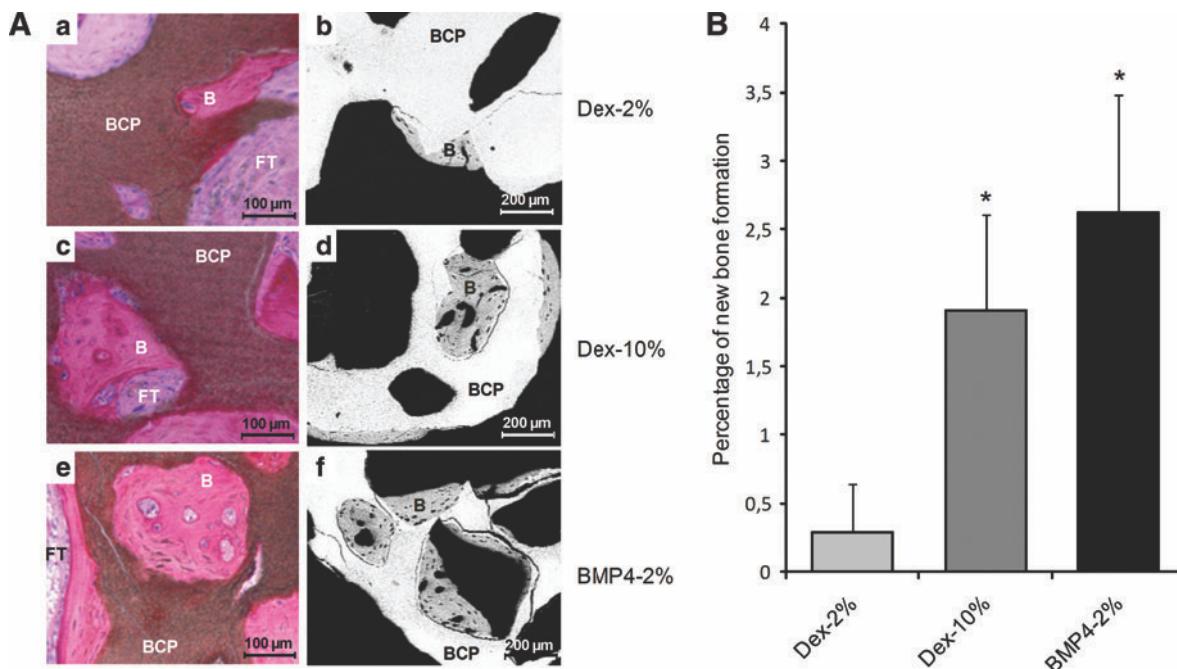


FIG. 5. Evaluation of new bone formation in vivo. Cells cultured on ceramic discs during 7 days in differentiation medium were implanted subcutaneously for 8 weeks in NMRI nude mice. (A) Samples were stained with methylene blue and basic fuchsin (a, c, e) and observed by back-scattered scanning electron microscopy (b, d, f). (B) Quantification of new bone formation by analysis of back-scattered scanning electron microscopic images (n=5). *Significant differences between Dex-2% FCS and other conditions. B, bone; FT, fibrous tissue. Color images available online at www.liebertonline.com/ten.

low concentration, 50 ng/mL, produced numerous functional osteoblasts in a short time. However, we observed that in addition to inducing MSC differentiation, the glucocorticoid-containing osteogenic medium (Dex-10% FCS) also induced high cellular proliferation. Cellular proliferation and differentiation are well known to be two opposite but interconnected phenomena.²⁷⁻²⁹ Notably, during early stages of osteogenesis, multipotent cells proliferate and increase their expression of extracellular matrix proteins. At that moment, genes inducing cell proliferation and cell cycle progression are predominantly expressed. At the next stages, cells slow their proliferation to initiate their maturation. Within these cells, postproliferative genes and those associated with the osteoblastic maturation are expressed, following that of the genes derived from the first stage. Finally, mature cells mineralize the extracellular matrix that they synthesized and reorganized previously. Experimental approaches reducing the proliferative stage hasten the differentiation, and those extending the proliferation period delay the onset of differentiation.³⁰⁻³⁵ Hence, the decrease in osteoprogenitor proliferation is a crucial step for osteoblast differentiation. However, in vitro, the FCS medium currently used is designed to favor MSC expansion. Therefore, decreasing the FCS concentration could decrease the proliferation of osteoblastic cells and enhance their differentiation. Our results confirm such direct links notably through the FCS concentration in osteogenic media (Fig. 1). Indeed, low FCS concentration decreased expression of the immature state marker (α SM actin) and increased that of osteoblastic markers such as ALPL and CaSR. These results are in agreement with data reported by Katagiri et al., who demonstrated the need to decrease FCS content to achieve

myogenic differentiation of the multipotent myoblastic cell line C2C12.³⁶

Several publications have illuminated the molecular mechanisms induced by a decrease in FCS content and highlight the crucial intervening proteins. Although a large variety of proteins contained in FCS enhance cellular survival and proliferation, other factors have a negative effect on the MSC commitment directly or indirectly. Among these proteins, TGF-b1 seems to play an important role in the inhibition of MSC differentiation. Maeda et al. demonstrated that TGF-b1 contained within serum inhibited the osteoblastic differentiation of both C2C12 cells and human MSCs and that the use of a TGF-b type I receptor inhibitor in high-serum culture conditions improved the differentiation process.⁹ Similarly, other studies have elucidated the effect of TGF-b1 on the cell proliferation stimulation and differentiation inhibition notably by reducing the amount of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins p57 and p27.³⁷⁻³⁹ Therefore, the decrease in proliferation of osteo-regenerative cells is required before their differentiation, and such decrease could be achieved simply by decreasing the FCS content in the medium.

To further enhance and hasten the low-serum effect on MSC induction into mature osteoblasts, several differentiation inducers were investigated. We used Dex as an osteoinducer, but its beneficial activities are still controversial, although in vivo it shows osteoporotic potential.^{40,41} Dex is a synthetic glucocorticoid hormone with a pleiotropic effect and is commonly used clinically for its antiinflammatory functions. When used chronically, glucocorticoids induce adverse effects such as bone loss, which results in higher fragility than with osteoporotic bones in postmenopausal

women.¹³ Further, Dex can decrease MSC mineralization when used at pharmacological doses.⁴² Glucocorticoids are antiinflammatory molecules, and Dex could disturb osteoclastogenesis and osteoclast function.¹⁵ In addition, Dex is not restricted to osteoblastic differentiation and can be used to induce adipogenic and chondrogenic pathways, depending on other associated factors.^{7,43,44} Thus, according to the context, Dex could induce adipocytes as well as osteoblasts. Regarding osteoblastic differentiation, continuous treatment with Dex can increase osteoblastic commitment of MSCs, but the cells are restrained to a premature osteoblastic or a less-differentiated state.⁴⁵ Other in vivo data demonstrated that glucocorticoids disturb osteoblastic functionalities in treated mice, with lower osteocalcin content than in control litter-mates and decreased amount of trabecular bone.⁴⁶ Therefore, Dex is still considered an osteoinducer with strong adverse effects, without consistent efficacies for generating functional osteoblasts.

In contrast to Dex, BMP2, 4, and 7 are physiological molecules involved in bone development and formation.⁴⁷⁻⁵⁰ BMPs also play a crucial role in chondroblastic and osteoblastic differentiation of uncommitted progenitor cells,⁵¹⁻⁵³ and these properties of BMP2 and BMP7 have been tested clinically to treat several bone abnormalities such as delayed union or nonunion postfracture and to improve spinal fusion.^{54,55} Although some in vitro and in vivo studies showed BMP2, 4, and 7 to have different biological responses in inducing bone formation, no data have yet demonstrated sharp differences in their molecular pathways. However, among the BMPs tested in our culture conditions, BMP4 emerged as the most efficient osteoblastic inducer at low FCS concentration. mRNA and protein expression of ALPL, PTHR1, and Osterix was greatly enhanced even after a short period (10 days) with BMP4-2% FCS, confirming previous data.^{56,57} Such induction is crucial to generate true mature osteoblasts because Osterix^{-/-} mice have normal cartilage but lack bone formations.⁵⁸ Physiologically, BMP4 acts as a neo-osteogenic inducer,⁵⁹ and several studies of BMP4 have demonstrated its major role during fracture healing.⁶⁰⁻⁶³ BMP4 was also shown to induce chondrogenesis, but we never observed chondroblasts in cultures, and more importantly, genes associated with chondrogenesis were downregulated (data not shown). Recent in vivo studies suggested that BMP2 and 4 have crucial roles in skeletogenesis because their deletion resulted in impaired bone formation without disturbing chondrogenesis.⁶⁴ However, in other in vivo models, a conditional BMP4 defect had no effect on bone reconstitution postfracture in adult mice.⁶⁵ Therefore, the role of BMP4 in neo-osteogenesis in adults and in skeletogenesis is crucial but remains to be further defined.

The strong osteoblastic stimulation we observed with BMP4 and low FCS culture could be of utmost importance for BTE at different levels: (1) depending on pathological context and on anatomical sites (e.g., limbs vs. mandibles), it could be more judicious to inject committed osteoblastic cells than immature MSCs. Indeed, some published data showed an improvement of bone/cartilage formation for MSCs when treated in vitro by osteoinducers before being implanted or when MSCs were coinjected with osteoinducers⁶⁶⁻⁶⁸; (2) in the cases where noninduced MSCs should be used, it could be interesting to evaluate ex vivo their osteogenic potentials and such evaluations need to have consistent in vitro meth-

ods. Similarly, these methods could be also performed to assess bone formation-supporting capabilities of new biocompatible materials.

Therefore, osteoblasts differentiated from MSCs must be as mature as possible and remain firmly engaged in this direction after implantation to form bone. In our experiments, human MSCs cultured on ceramic scaffolds and exposed simultaneously to low FCS concentration and BMP4 were undeniably engaged in a more mature osteoblastic state. Such commitment was shown by high ALPL and BSP gene expression as compared with expression with Dex-2% FCS incubation or proliferation media. Moreover, as compared with other media, BMP4-2% FCS boosted the differentiation process from day 1 of culture. Notably, we observed strong mRNA expression of late osteoblastic markers such as Osteocalcin and Osterix at this early time point.

Such effective osteoblastic differentiation obtained with BMP4-2% FCS was efficiently transcribed in vivo because of the amount of bone formation we found. Unlike the canonical osteoblastic medium (Dex-10% FCS), with BMP4-2% FCS, the amount of bone formation in vivo related strongly to the quality of osteoblastic differentiation observed in vitro. These results underline the controversial role of glucocorticoids in bone formation. Indeed, Dex-2% FCS successfully commits MSCs toward osteoblastic differentiation in vitro but surprisingly generates a low amount of bone deposition in vivo, which suggests a disturbance of osteoblastic functionality that could be related to the ineffective maturation in vitro.⁴⁵ On the other hand, cells cultured in Dex-10% FCS medium gave rise bone in vivo similarly to those treated by BMP4-2% FCS conditions. This result could be explained by the fact that cells cultured into Dex-10% FCS medium still proliferated unlike cells cultured in Dex-2% FCS. Therefore, Dex-10% FCS conditions could increase the number of osteogenic cells before being implanted improving bone formation potentials of biomaterials. This highlights the need to define the quantities of osteo-regenerative cells colonizing biomaterials before being implanted. In addition, their differentiation state seems crucial for bone formation in vivo. We described above some data showing the benefits to commit cells before their injection. Therefore, we can hypothesize that efficacy of a graft to regenerate bone is dependent on the number of differentiated cells contained within it. Data reported by Gronthos et al. support such assumption. Indeed, the use of telomerized MSCs demonstrated more ectopic bone formation potential in immuno-compromised mice than non-telomerized cells. These benefits were related to their proliferation rate and also to their high content of osteogenic molecular factors Runx2 and osterix.⁶⁹

In this work, we improved the osteoblastic differentiation of MSCs by reducing the FCS concentration in the culture medium. Concomitantly, we achieved fast and mature osteoblastic differentiation by substituting Dex with the osteogenic factor BMP4 in the medium. Unlike the standard differentiation medium, this alternative approach conferred consistent results between in vitro osteoblastic differentiation and effective in vivo bone formation. Such a relationship is crucial when studying bone biology to upgrade protocols for clinical use. The induction of osteoblasts from MSCs with low FCS concentration and BMP4 might be of interest for BTE and regenerative medicine. In addition, these latter aims

prompt research labs to develop expansion media without animal sera and preliminary results are promising. Therefore, it could be very interesting to evaluate the bone formation by using BMP4 into serum-free medium or media containing human platelet lysates.⁷⁰⁻⁷³ Nevertheless, these media favored the proliferation of multipotential cells. We assume that such conditions should be modified with regard to data described here.

Acknowledgments

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche Technologies pour la Santé et l'Autonomie, ATOS project no. 024-03 (2007-2010). The research leading to these results has also received funding from the European Commission Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the Grant agreement no. 241879, through the REBORNE project. The authors would like to acknowledge Paul Pilet for technical assistance in microscopy and microtomography.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Deschaseaux, F., Pontikoglou, C., and Sensebe, L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med* 14, 103, 2010.
- Deschaseaux, F., Sensebe, L., and Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15, 417, 2009.
- Friedlaender, G.E., Perry, C.R., Cole, J.D., Cook, S.D., Cierney, G., Muschler, G.F., Zych, G.A., Calhoun, J.H., LaForte, A.J., and Yin, S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S151, 2001.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borer, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzzen, A., and Wisniewski, T. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A, 2123, 2002.
- Silber, J.S., Anderson, D.G., Daffner, S.D., Brislin, B.T., Leland, J.M., Hilibrand, A.S., Vaccaro, A.R., and Albert, T.J. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28, 134, 2003.
- Lennon, D., Haynesworth, S., Bruder, S., Jaiswal, N., and Caplan, A. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32, 602, 1996.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143, 1999.
- Osyckza, A.M., and Leboy, P.S. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* 146, 3428, 2005.
- Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T., and Miyazono, K. Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J* 23, 552, 2004.
- Aubin, J.E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 72, 396, 1999.
- Purpura, K.A., Aubin, J.E., and Zandstra, P.W. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells* 22, 39, 2004.
- Smith, E., Redman, R.A., Logg, C.R., Coetze, G.A., Kasahara, N., and Frenkel, B. Glucocorticoids inhibit developmental stage-specific osteoblast cell cycle. Dissociation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 from E2F4-p130 complexes. *J Biol Chem* 275, 19992, 2000.
- Weinstein, R.S. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2, 65, 2001.
- Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102, 274, 1998.
- Kim, H.J., Zhao, H., Kitaura, H., Bhattacharyya, S., Brewer, J.A., Muglia, L.J., Patrick Ross, F., and Teitelbaum, S.L. Glucocorticoids and the osteoclast. *Ann NY Acad Sci* 1116, 335, 2007.
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., Dulong, J., Monnier, D., Gourmelon, P., Gorin, N.C., and Sensebe, L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tibergien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4 β CD25highFOXP3 β regulatory T cells. *Stem Cells* 26, 212, 2008.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T) Method. *Methods* 25, 402, 2001.
- Chang, W., Tu, C., Chen, T.H., Bikle, D., and Shoback, D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal* 1, ra1, 2008.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204, 2006.
- Torii, Y., Hitomi, K., Yamagishi, Y., and Tsukagoshi, N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 20, 459, 1996.
- Fellah, B.H., Gauthier, O., Weiss, P., Chappard, D., and Layrolle, P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate

- ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 29, 1177, 2008.
23. Fischer, E.M., Layrolle, P., Van Blitterswijk, C.A., and De Bruijn, J.D. Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng* 9, 1179, 2003.
24. Habibovic, P., Kruyt, M.C., Juhl, M.V., Clyens, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Theilgaard, N., and van Blitterswijk, C.A. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res* 26, 1363, 2008.
25. Le Nihouannen, D., Daculsi, G., Saffarzadeh, A., Gauthier, O., Delplace, S., Pilet, P., and Layrolle, P. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36, 1086, 2005.
26. Yuan, H., Kurashina, K., de Bruijn, J.D., Li, Y., de Groot, K., and Zhang, X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20, 1799, 1999.
27. Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L., and Gupta, A.K. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17, 77S, 1995.
28. Stein, G.S., and Lian, J.B. Regulation of cell cycle and growth control. *Bioelectromagnetics Suppl* 1, 247, 1992.
29. Stein, G.S., Lian, J.B., and Owen, T.A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4, 3111, 1990.
30. Canalis, E., Deregowki, V., Pereira, R.C., and Gazzero, E. Signals that determine the fate of osteoblastic cells. *J Endocrinol Invest* 28, 3, 2005.
31. Chau, J.F., Leong, W.F., and Li, B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol* 24, 1593, 2009.
32. Nemoto, E., Koshikawa, Y., Kanaya, S., Tsuchiya, M., Tamura, M., Somerman, M.J., and Shimauchi, H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone* 44, 805, 2009.
33. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143, 420, 1990.
34. Raucci, A., Bellosta, P., Grassi, R., Basilico, C., and Mansukhani, A. Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways. *J Cell Physiol* 215, 442, 2008.
35. van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., and Clevers, H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959, 2005.
36. Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127, 1755, 1994.
37. Drissi, H., Hushka, D., Aslam, F., Nguyen, Q., Buffone, E., Koff, A., van Wijnen, A., Lian, J.B., Stein, J.L., and Stein, G.S. The cell cycle regulator p27kip1 contributes to growth and differentiation of osteoblasts. *Cancer Res* 59, 3705, 1999.
38. Nishimori, S., Tanaka, Y., Chiba, T., Fujii, M., Imamura, T., Miyazono, K., Ogasawara, T., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Fujita, T., Tanaka, K., and Toyoshima, H. Smad-mediated transcription is required for transforming growth factor-beta 1-induced p57(Kip2) proteolysis in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 276, 10700, 2001.
39. Urano, T., Yashiroda, H., Muraoka, M., Tanaka, K., Hosoi, T., Inoue, S., Ouchi, Y., and Toyoshima, H. p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* 274, 12197, 1999.
40. Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81, 1992.
41. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., and Bruder, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295, 1997.
42. Shao, J., Xu, X., Li, G., Zhang, W., Qi, J., Wang, J., Cai, M., Cui, L., Zhang, L., Zhao, Q., and Deng, L. Inhibitory effects of pharmacological doses of dexamethasone on mineralization of mesenchymal progenitor cells in vitro. *Pharmazie* 64, 674, 2009.
43. Derfoul, A., Perkins, G.L., Hall, D.J., and Tuan, R.S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24, 1487, 2006.
44. Indrawattana, N., Chen, G., Tadokoro, M., Shann, L.H., Ohgushi, H., Tateishi, T., Tanaka, J., and Bunyaratvej, A. Human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 914, 2004.
45. Oshina, H., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Sugata, Y., Maehara, H., Marukawa, E., Omura, K., and Shinomiya, K. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone* 41, 575, 2007.
46. Lane, N.E., and Yao, W. Glucocorticoid-induced bone fragility. *Ann NY Acad Sci* 1192, 81.
47. Qi, X., Li, T.G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y., and Zhao, G.Q. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6027, 2004.
48. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893, 1965.
49. Warren, S.M., Brunet, L.J., Harland, R.M., Economides, A.N., and Longaker, M.T. The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature* 422, 625, 2003.
50. Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281, 2003.
51. Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., and Miyazono, K. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10, 3801, 1999.
52. Kawabata, M., Imamura, T., Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49, 1998.
53. Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R., and Yoneda, T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* 273, 1872, 1998.

54. Blokhuis, T.J., and Lindner, T. Allograft and bone morphogenetic proteins: an overview. *Injury* 39 Suppl 2, S33, 2008.
55. Cheung, A. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Curr Orthop* 20, 424, 2006.
56. Kawaguchi, J., Mee, P.J., and Smith, A.G. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36, 758, 2005.
57. Lee, M.H., Kwon, T.G., Park, H.S., Wozney, J.M., and Ryoo, H.M. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 689, 2003.
58. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrugghe, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17, 2002.
59. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105, 1995.
60. Ishidou, Y., Kitajima, I., Obama, H., Maruyama, I., Murata, F., Imamura, T., Yamada, N., ten Dijke, P., Miyazono, K., and Sakou, T. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* 10, 1651, 1995.
61. Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirata, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K., and Takaoka, K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9, 651, 1994.
62. Sato, M., Ochi, T., Nakase, T., Hirota, S., Kitamura, Y., Nomura, S., and Yasui, N. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 14, 1084, 1999.
63. Yoshimura, Y., Nomura, S., Kawasaki, S., Tsutsumimoto, T., Shimizu, T., Takaoka K. Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16, 876, 2001.
64. Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., and Tabin, C.J. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2, e216, 2006.
65. Tsuji, K., Cox, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B.D., Tabin, C.J., and Rosen, V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1, 14, 2008.
66. Siddappa, R., Martens, A., Doorn, J., Leusink, A., Olivo, C., Licht, R., van Rijn, L., Gaspar, C., Fodde, R., Janssen, F., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells *in vitro* results in robust bone formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 7281, 2008.
67. Wojtowicz, A.M., Templeman, K.L., Hutmacher, D.W., Guldberg, R.E., and Garcia, A.J. Runx2 overexpression in bone marrow stromal cells accelerates bone formation in critical-sized femoral defects. *Tissue Eng Part A* 16, 2795, 2010.
68. Zhou, G., Liu, W., Cui, L., Wang, X., Liu, T., and Cao, Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 12, 3209, 2006.
69. Gronthos, S., Chen, S., Wang, C.Y., Robey, P.G., and Shi, S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 18, 716, 2003.
70. Chase, L.G., Lakshmi, U., Solchaga, L.A., Rao, M.S., and Vemuri, M.C. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 8, 2010.
71. Felka, T., Schafer, R., De Zwart, P., and Aicher, W.K. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cyotherapy* 12, 143, 2010.
72. Schallmoser, K., Rohde, E., Reinisch, A., Bartmann, C., Thaler, D., Drexler, C., Obenauf, A.C., Lanzer, G., Linkesch, W., and Strunk, D. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng Part C Methods* 14, 185, 2008.
73. Sensebe, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., and Giordano, R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang* 98, 93, 2010.

Address correspondence to:

Frédéric Deschaseaux

Research Department

Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique

2 Bd Tonnellé, 37000 Tours

France

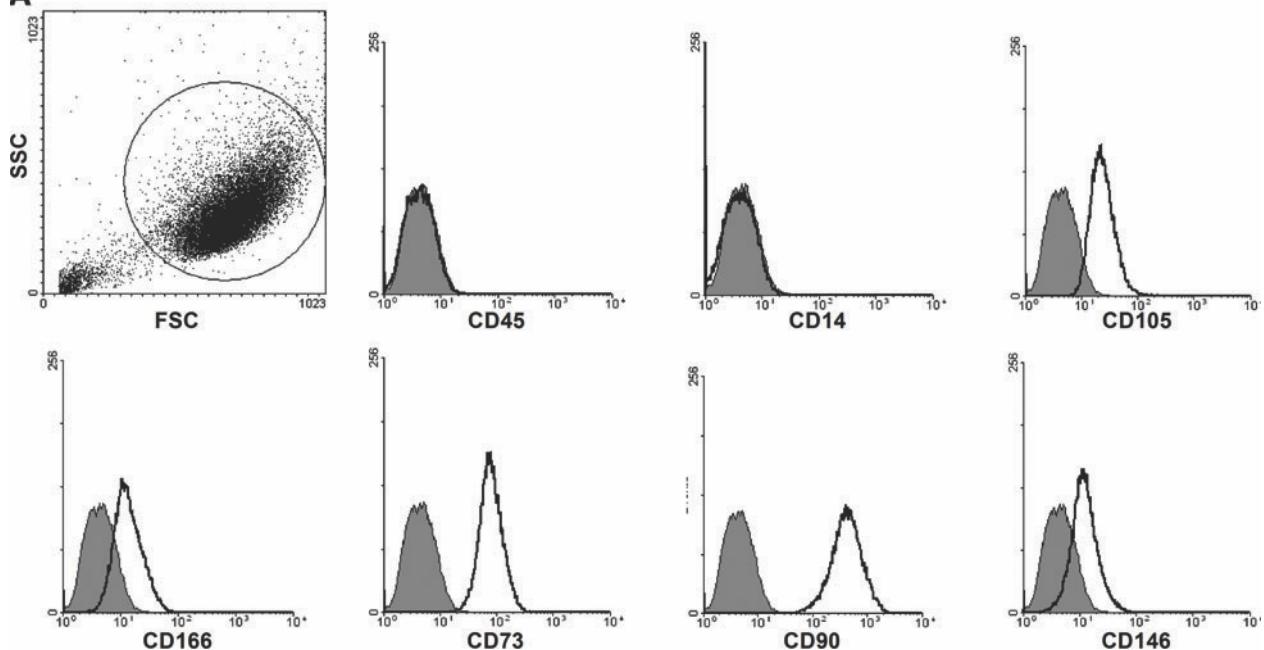
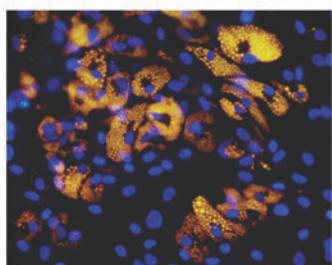
E-mail: frederic.deschaseaux@efs.sante.fr

Received: July 1, 2010

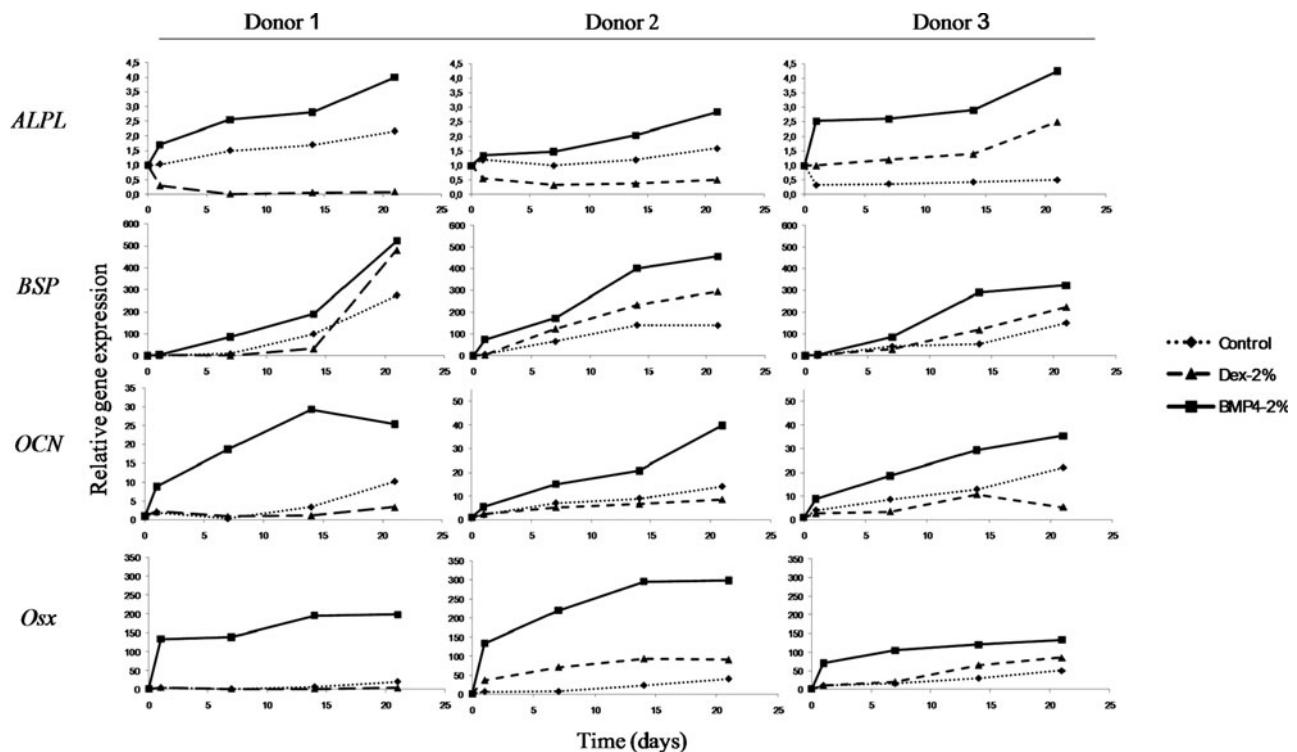
Accepted: September 7, 2010

Online Publication Date:

Supplementary Data

A**B**

SUPPLEMENTARY FIG. S1. MSC characterization. Before being treated for osteoblastic differentiation studies, samples of cells were assessed for MSC phenotype (A) and for adipogenic potential (B). (A) After their expansion, cells were incubated with different monoclonal antibodies against hematopoietic cells (CD45 and CD14) or those recognizing cultured MSCs (CD105, CD166, CD73, CD90, and CD146) and then analyzed by flow cytometry. Isotypic irrelevant antibody controls were used to define the negative area (gray filled curves). Fluorescence detected from labeled cells are depicted by bold open curves. (B) Cells were induced to differentiate to adipocytes and then stained with Nile Red Oil for the detection of lipid droplets accumulating within cytoplasm (magnification 400). Results are representative of 17 experiments. MSCs, mesenchymal stem cells.



SUPPLEMENTARY FIG. S2. Gene expression profile of cells from three different donors during osteogenesis on BCP discs. Cells were cultured for 21 days on BCP discs in control 10% FCS or osteogenic media (Dex-2% FCS or BMP4-2% FCS). Quantitative RT-polymerase chain reaction was performed for *ALPL*, *BSP*, *OCN*, and *Osx* mRNA. Gene expression was normalized relative to level of GAPDH and compare to the control (cells before seeding on BCP discs). The figures showed three independent experiments from three different donors. BCP, biphasic calcium phosphate; FCS, fetal calf serum; BMP, bone morphogenetic protein; Dex, dexamethasone; *ALPL*, alkaline phosphatase; *BSP*, bone sialoprotein; *OCN*, osteocalcin; *Osx*, osterix.

Discussion

Malgré les résultats prometteurs obtenus par l'ITO à l'aide de modèles animaux [249, 261, 266, 267, 296], peu d'études humaines ont été rapportées. Cette absence peut être liée au manque de connaissances concernant l'engagement des CSM vers le phénotype ostéoblastique et la difficulté de maintenir cette différenciation *in vivo*. Les intérêts de l'ITO et de la médecine régénérative nous ont incités à trouver de nouvelles méthodes pour réduire le temps nécessaire à l'obtention d'ostéoblastes matures dérivés de CSM humaines amplifiées *in vitro* à partir de procédures simples.

Notre méthode de réduction du taux de sérum au sein du milieu ostéogénique supplémenté avec de la BMP4 en tant qu'inducteur ostéogénique à faible concentration, 50 ng/ml, a permis la production de nombreux ostéoblastes fonctionnels dans un temps réduit. Nous avons également observé que si le milieu ostéogénique classique basé sur la dexaméthasone (Dex-10% SVF) permettait effectivement d'engager les CSM vers un phénotype ostéoblastique, il induisait aussi une importante prolifération cellulaire. Or, la prolifération et la différenciation cellulaire sont 2 phénomènes opposés mais interconnectés [324-326]. Notamment durant les phases précoce de l'ostéogenèse, les cellules multipotentes prolifèrent et augmentent leur expression de protéines matricielles extracellulaire. A ce stade, les gènes induisant la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire sont exprimés de façons prédominantes. A l'étape suivante, les cellules diminuent leur prolifération pour initier leur maturation. Au sein de ces cellules, les gènes postprolifératifs et ceux associés à la différenciation ostéoblastique sont ensuite exprimés. Enfin, les cellules matures minéralisent la matrice extracellulaire qu'elles ont synthétisée et réorganisée précédemment. Parallèlement à cela, des approches expérimentales ont montré que l'arrêt de la prolifération des ostéoprogéniteurs est une étape cruciale pour le déclenchement de la différenciation ostéoblastique [327-332]. Cependant, *in vitro*, le milieu couramment utilisé contenant du SVF est conçu pour favoriser l'expansion des CSM. La diminution de la concentration de SVF pourrait donc diminuer la prolifération des ostéoblastes et ainsi augmenter leur différenciation. Nos résultats ont confirmé ce lien direct notamment à travers la concentration de sérum au sein des milieux ostéogéniques. Une diminution de la concentration en SVF de 10 % (concentration couramment utilisée) à 2 % dans le milieu de culture a abouti à une nette diminution du taux de prolifération et une forte minéralisation ainsi qu'une maturation des cellules ostéoblastiques. En effet, la faible concentration en SVF

a diminué l'expression de marqueurs du stade immature (α SM actin) et a augmenté celle de marqueurs ostéoblastiques tels que l'ALPL et le CaSR. Ces résultats sont en accord avec les données rapportées par Katagiri et ses collaborateurs qui ont démontré la nécessité de diminuer la teneur en SVF pourachever la différenciation myogénique de la lignée cellulaire multipotente C2C12 [333].

De nombreuses publications ont étudié les mécanismes moléculaires induits par une diminution de la teneur en SVF ainsi que les protéines majeures impliquées. Bien qu'une grande variété de protéines contenues dans le SVF augmentent la survie et la prolifération cellulaire, d'autres facteurs ont un effet néfaste direct ou indirect sur l'engagement ostéoblastique des CSM. Parmi ces protéines, le TGF- β 1 (transforming growth factor-*bêta* 1) semble jouer un rôle important dans l'inhibition de la différenciation des CSM. Maeda et ses collègues ont démontré que le TGF- β 1 contenu dans le sérum inhibait la différenciation ostéoblastique à la fois des C2C12 et des CSM humaines et que l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur de type I du TGF- β 1 dans des conditions de culture à forte teneur en sérum améliorait le processus de différenciation [317]. De façon similaire, d'autres études ont démontré que le TGF- β 1 induisait la croissance cellulaire et retardait la différenciation ostéoblastique. Ces études ont déterminé l'effet du TGF- β 1 sur la stimulation de la prolifération et l'inhibition de la différenciation, notamment par la diminution de la quantité de p57 et p27, protéines inhibitrices des kinases cycline dépendantes (CDK) [334-336]. Ainsi, la diminution préalable de la prolifération des cellules ostéoprogénitrices est nécessaire à leur différenciation et cette diminution peut être aisément obtenue par la diminution du taux de SVF contenu dans le milieu.

Lors de nos expériences, les CSM humaines cultivées sur des matériaux en céramique et exposées simultanément à de faibles concentrations de SVF et de BMP4 ont été indéniablement engagées dans un état d'ostéoblastes matures plus important qu'avec les autres milieux de culture. Cet engagement a été mis en évidence par une forte expression génique de l'*ALPL* et la *BSP* en comparaison avec l'expression observée pour les cellules cultivées dans les milieux Dex-2% SVF ou de prolifération. De plus, comparativement aux autres milieux, le milieu BMP4-2% SVF accélère le processus de différenciation dès le premier jour de culture. Plus spécifiquement, nous avons observé une forte expression de marqueurs ostéoblastiques tardifs tels que l'ostéocalcine ou l'ostérix avec ce temps de culture précoce. Cette induction a pu être confirmée par l'induction de protéines ostéoblastiques de façon plus précoce avec le milieu BMP4-2% SVF. Cette forte stimulation ostéoblastique peut

s'avérer d'une importance majeure pour l'ITO. En effet, il est probable que les ostéoblastes différenciés à partir de CSM doivent être les plus matures possible et demeurer fermement engagés dans cette voie après l'implantation afin de former un nouveau tissu osseux.

Effectivement, la différenciation ostéoblastique efficace obtenue avec le milieu BMP4-2% SVF a été profitablement transcrise *in vivo* au vu de la quantité d'os néoformé obtenue. Contrairement au milieu ostéoblastique classique (Dex-10% SVF), la quantité d'os formé *in vivo* avec le milieu BMP4-2% SVF a pu être corrélée avec la qualité de la différenciation ostéoblastique observée *in vitro*. Ces résultats soulignent le rôle controversé des glucocorticoïdes dans la formation osseuse. En effet, le milieu Dex-2% SVF a induit avec succès les CSM vers la différenciation ostéoblastique *in vitro* mais de façon surprenante n'a généré qu'une très faible formation osseuse *in vivo*, suggérant une perturbation de la fonctionnalité des ostéoblastes qui peut être liée à une maturation inefficace *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec l'ostéoporose induite par les glucocorticoïdes survenant lors de traitements cliniques prolongés, liée à un état de différenciation ostéoblastique moindre [337]. Au contraire, le milieu BMP4-2% SVF a permis la formation d'ostéoblastes matures *in vitro* qui se sont avérés fonctionnels *in vivo*.

A des fins cliniques, les protocoles de culture doivent être bien définis avec des délais de production courts et impliquer un fort potentiel régénératif des cellules. Le milieu de culture, substituant la Dex par la BMP4, exposé dans ce chapitre nous a permis d'atteindre simultanément une différenciation rapide et terminale des CSM en ostéoblastes fonctionnels. Cette approche alternative a fourni des résultats cohérents entre la différenciation ostéoblastique *in vitro* et une formation osseuse efficace *in vivo*. Cette cohérence est indispensable pour approuver des protocoles d'études à usage clinique. Cependant, la formation osseuse obtenue bien qu'elle se produise au niveau d'un site peu favorable reste très limitée. Les résultats obtenus par cette étude montrant une différenciation terminale des CSM, nous nous sommes interrogés sur le biomatériau utilisé. Les disques utilisés ne sont peut-être pas les mieux adaptées pour offrir un support efficace à la formation osseuse. Nous nous sommes donc intéressés dans le chapitre suivant à rechercher un substrat qui permettrait aux cellules de se retrouver dans environnement plus proche de la situation physiologique.

Chapitre 5 : Importance de la Conformation 3D des CSM pour leur Différenciation *in vitro* et la Formation Osseuse *in vivo*.

Introduction à la problématique

Dans le but d'améliorer la quantité d'os formé par l'association de CSM à des céramiques, nous avons développé une nouvelle méthode de culture qui se rapproche le plus possible de l'environnement physiologique des cellules lors de la formation et régénération osseuse. Cette nouvelle méthode basée sur une approche biomimétique offre aux cellules un plus grand degré de liberté afin que celles-ci puissent se développer, agir et interagir plus naturellement.

Mimer *in vitro* l'environnement *in vivo* dans le but de générer des tissus ou un organe au sein d'un laboratoire est un défi majeur à relever. Les céramiques classiquement utilisées pour l'ingénierie tissulaire osseuse sont conçues sous la forme de matériau macroporeux de porosité et de tailles de pores variables qui facilitent la diffusion des nutriments et des métabolites et guident la croissance cellulaire afin de former un nouveau tissu osseux [338-341]. Cependant, ces structures reproduisent le tissu osseux mature et non le tissu osseux en formation ou réparation. En effet, l'os mature est composé d'une quantité importante de MEC et d'un nombre très limité de cellules. *A contrario*, durant l'ostéogenèse, l'os est formé par une série d'événements complexes et finement orchestrés qui en premier lieu impliquent un grand nombre de cellules et une importante phase de prolifération suivie de la déposition d'une importante MEC composée principalement de collagène de type I qui sera par la suite minéralisée. Les matériaux classiquement utilisés pour l'ITO ne permettent ni une vaste prolifération ni la déposition d'une MEC abondante. De plus, à l'échelle de la cellule, les pores de la céramique, ayant une taille allant de la centaine de micromètres au millimètre, peuvent être considérés comme des surfaces planes (tout au plus incurvées), très éloignées de l'environnement tridimensionnel (3D) de formation du tissu osseux. En effet, lors de la formation osseuse, les cellules prolifèrent et synthétisent des fibres de collagène qui procurent aux cellules un environnement 3D adéquat à leur différenciation. Les cellules à forte confluence vont donc se différencier en ostéoblastes pour ainsi initier la minéralisation de ces fibres de collagène et induire la formation d'un tissu osseux. Ces différences peuvent contribuer à expliquer le manque de résultats probants au niveau clinique à partir de ces approches traditionnelles d'ingénierie osseuse [281, 342, 343] et notamment la faible efficacité quant à la formation osseuse qui en découle [278]. Par conséquent, la configuration 3D des cellules pourrait jouer un rôle crucial pour l'organisation cellulaire après implantation et la formation osseuse.

Comme alternative à ces matériaux macroporeux, des particules biphasées de phosphate de calcium (BCP) peuvent être utilisées. L'objectif de ces travaux a tout d'abord été de créer un système de culture permettant aux CSM d'adopter par elles-mêmes une conformation 3D et qu'elles puissent synthétiser leur propre microenvironnement 3D. Les premiers travaux basés sur ce système de culture ont permis d'évaluer de façon macro et microscopique l'adhésion ainsi que la prolifération cellulaire *in vitro* sur ces particules de BCP. Ces études ont permis de mettre en évidence que les cellules étaient capables d'agglomérer les particules et ainsi de former une structure en 3 dimensions au sein de laquelle elles se retrouvaient. Cette étude décrite dans l'article « 3D Environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation for Bone Tissue Engineering » a pu mettre en évidence, après quelques jours, la synthèse par les cellules d'une abondante matrice de collagène et l'induction spontanée par cet environnement de la différenciation des CSM en ostéoblastes.

Les travaux présentés dans l'article suivant « Interest of a Biomimetic Approach Combining Ceramic and Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering » ont cherché à mettre en évidence de façon plus précise les effets de ces structures 3D sur la différenciation ostéoblastique. Cette étude explore la relative implication de l'environnement 3D synthétisé par les cellules et les propriétés propre aux céramiques sur l'engagement des CSM vers la lignée ostéoblastique et la formation osseuse *in vivo*. Pour cela, deux matériaux de taille et de forme similaire, mais de compositions et de microstructures différentes (particules de BCP et billes de verre) ont été comparés *in vitro* pour l'expression génique et protéique de marqueurs ostéoblastiques mais aussi pour leur capacité à former de l'os *in vivo* en site ectopique. En outre, les particules de BCP et les billes de verres ont pu être comparées *in vivo* à une céramique macroporeuse standard comme contrôle de formation osseuse induite par l'ingénierie osseuse classique.

Enfin, une étude supplémentaire placée en appendice de ce chapitre s'intéresse à la combinaison du milieu de différenciation ostéoblastique développé dans le chapitre 4 avec le système de culture biomimétique 3D et en évalue les bénéfices pour la formation osseuse.

Article 3 : 3D Environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation for Bone tissue Engineering.

3D Environment on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation for Bone Tissue Engineering

T. Cordonnier · P. Layrolle · Julien Gaillard ·

Alain Langonné · L. Sensebé · P. Rosset ·

J. Sohier

Received: 30 June 2009 / Accepted: 13 October 2009

Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract In this work a novel method was developed to create a three dimensional environment at a cellular level for bone tissue engineering. Biphasic calcium phosphate (BCP) particles of 140–200 μm were used in association with human mesenchymal stem cells (hMSCs). The cells seeded on these particles adhered and proliferated more rapidly in the first day of culture compared to culture on plastic. Analyses of hMSCs cultured without osteogenic factors on BCP particles revealed an abundant extracellular matrix production forming 3-dimensional (3D) hMSCs/BCP particles constructs after few days. Bone morphogenic protein 2 (BMP-2), bone sialoprotein (BSP) and ALP gene expression using real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) confirmed that expression profiles were modified by the culture substrate while the addition of osteogenic medium enhanced bone markers expression. These results indicate that BCP particles alone are able to induce an osteoblastic differentiation of hMSCs that might be of interest for bone tissue engineering.

1 Introduction

Each year, it is estimated that at least 1 million patients need treatment for skeletal disorders. Many of these interventions require bone graft substitutes. The current gold standard used is the autograft because of its osteogenic properties [1]. However, this technique has important limitations such as the need for a second site of surgery, associated morbidity and limited supply. An alternative is the use of biomaterials capable to reproduce bone structure. Various materials are used as synthetic bone substitutes, among which biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics are good candidates [2]. These materials mimic bone mineral features (hydroxyapatite) and have proved to be of interest for bone regeneration when associated with human progenitor cells [3, 4].

In recent years, human mesenchymal stem cells (hMSCs) have generated a great interest as potential source for cell based therapeutic strategies. hMSCs represent an adherent, fibroblast-like population [5] present not only in the bone marrow but in a number of tissues, including, blood, adipose tissue, muscle and dermis [6, 7]. Bone marrow derived hMSCs are multipotent cells capable to differentiate into several lineages such as adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. An important challenge for bone engineering is the development of treatment strategies for large bone defects [8–10] by association of hMSCs differentiated to osteoblasts and ceramics.

In most cases, ceramics for bone engineering are shaped as porous scaffolds. However, at the cellular level, pores are closer to flat surfaces that do not reproduce the 3D structure of bone native extracellular matrix. This configuration might be important for the cellular organization after implantation and the resulting bone formation. The aim of this study was to create a three dimensional (3D)

T. Cordonnier (@) P. Layrolle J. Sohier
INSERM U791, Center on Osteoarticular and Dental Tissue
Engineering, School of Dental Surgery, Nantes, France e-mail:
thomas.cordonnier@univ-nantes.fr

T. Cordonnier J. Gaillard A. Langonné L. Sensebé EFS
Centre-Atlantique and EA3855, Tours, France

P. Rosset
Orthopedic Service, Trousseau Hospital, University Hospital
Center, Tours, France

ceramic-based culture system for hMSCs for bone engineering. Additionally, the influence of this 3D environment on cell differentiation was investigated. To obtain 3D structures at cellular level, small ceramic particles of BCP were associated with hMSCs, so that they synthesize their own extracellular matrix (ECM) and create structures in 3D. The formation of these 3D constructs was first evaluated macroscopically and cell attachment and proliferation was measured *in vitro*. The ECM formation was investigated microscopically and the effect of 3D constructs on hMSCs differentiation was monitored and compared to two dimensional (2D) culture using metabolic assays and real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

2 Materials and methods

2.1 Ceramic particles

Biphasic calcium phosphate (BCP, 20/80) particles made of hydroxyapatite (20%) and beta-tri-calcium phosphate (80%) with a range size of 140–200 μm (MBCP+) were provided by Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France.

After processing, the particles were washed in demineralized water and ethanol for 10 min using an ultrasonic bath and finally air dried. The aliquots of BCP particles were double packaged and sterilized in an autoclave at 121 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The chemical purity of the BCP was analyzed using X-ray diffraction (XRD, Philips PW 1830, CuKa source) and Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR, Nicolet, Magna-IR 550). Finally, traces of CaO in the BCP were checked using a phenolphthalein test.

2.2 Cells isolation and expansion

According to the Ethical Committee of Tours University Hospital after written informed consent of three healthy donors, 20 ml of bone marrow were harvested by iliac crest aspiration using Jamshidi needle.

Nucleated bone marrow cells were seeded on polystyrene-treated culture flasks (Corning life sciences, Schiphol-Rijk, The Netherlands) at a density of 5×10^5 cells per cm^2 and human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated by their adherence capacity. Cells were then amplified in alpha-modified eagle's medium (a-MEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone) and 1 ng/ml of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO_2 at 37 $^{\circ}\text{C}$. Medium was renewed twice weekly until cells reached confluence. Cells were harvested enzymatically from plastic by an incubation of 3–4 min with 0.25% trypsin/EDTA. To obtain a large

number of cells, hMSCs were further expanded on polystyrene-treated culture flasks (Corning life sciences) for further expansion until passage 1. The cells were then harvested and seeded on ceramics particles or plastic dishes.

2.3 Cells culture on BCP particles

To minimize ion release from the biphasic calcium phosphate (BCP) particles during cell culture, particles were incubated 48 h in twice-refreshed proliferative medium (a-MEM, 10% FCS, 1% antibiotic/antimycotic). Prior culture, hMSCs were loaded on BCP particles at a density of 2×10^6 cells per 160 mg. To favor cellular adhesion on ceramic particles, the culture was performed in six low-attachment well plates (Corning life sciences, Schiphol-Rijk, The Netherlands). Cells were then cultured during 1, 4, 7, 14 and 21 days in proliferative medium or in osteogenic medium (proliferative medium supplemented with b-glycerophosphate (sigma G9891, 10 mM), ascorbic acid-2-phosphate (sigma A8960, 0.2 mM), dexamethasone (sigma D4902, 10^{-8} M). The culture mediums were refreshed every 3 days.

2.4 Microscopic evaluation of hMSC/BCP particles constructs

The microstructure of BCP particles after autoclave sterilization and of 3D constructs after culture were observed using a scanning electron microscope (SEM, Leo 1450VP, Zeiss, Germany). Prior to SEM observations, all samples were fixed, dehydrated and coated with gold–palladium at 20 mA for 3 min (EM Scope, UK).

2.5 Alkaline phosphatase staining

To precisely compare culture conditions, human mesenchymal stem cells at a density of 2×10^4 cells/ cm^2 were cultured during 21 days on both plastic dishes and ceramic particles (corresponding to 5×10^5 cells/160 mg of particles) in proliferative or osteogenic medium. At the end of the culture time, cells were fixed with an acetone/citrate solution during 1 min, washed with distilled water and incubated in a Fast-violet B solution containing Naphtol during 30 min at room temperature in the dark (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Samples were finally rinsed in distilled water during 2 min and observed with a binocular.

2.6 Proliferation

Cells from three different patients ($n = 3$) were cultured up to 21 days in proliferative or osteogenic medium onto BCP

particles or on polystyrene culture-treated 6-well plates (Corning life sciences, Schiphol-Rijk, The Netherlands). To quantitatively measure cell proliferation and evidence differences, the cellular density was reduced to 1×10^4 cells/cm² for both conditions. After 1, 4, 7, 14 and 21 days cells/BCP particles constructs were washed with PBS and 2 ml of a 10% Alamar blue solution (BioSource, Carlsbad, USA) was added to each sample. After 30 min of incubation (37°C, 5% CO₂) the alamar-containing medium was collected and read on a fluorescence plate reader with excitation filter at 490 nm and emission filter at 595 nm. Samples signal intensities were correlated to a standard curve obtained from increasing densities of hMSCs cultured on 6-well plastic plates. These cells were seeded 12 h prior to the assay to obtain an early metabolic proliferation stage. All samples and standards were assayed in triplicate.

2.7 RNA extraction and real time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's instructions. Briefly, the 3D constructs (constructed from three different bone marrow aspirates, n = 3) were transferred into a 1.5 ml tube and vigorously shaked to lyse the cells. A centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C in the presence of chloroform was then performed. The aqueous phase was collected, and the RNA precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 7,500 g for 10 min at 4°C. RNA pellets were washed with 75% cold ethanol, dried, reconstituted in sterile water, and quantified by spectrometry.

After desoxyribonuclease I digestion (Invitrogen, Paisley, UK), RNA samples (2 µg) were reverse transcribed using avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase (AMV-RT) and random primers in a total volume of 25 µl. Real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the iCycleriQDetection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using SYBR Green detection and Titanium Taq DNA polymerase according to the manufacturer's recommendations. The following temperature profile was used: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at

95°C, 1 min at 60°C and 30 s at 72°C. Expression of the target gene was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase levels (GAPDH). The sequences of primers are summarized in Table 1. Real time quantitative RT-PCR primers were synthesized by Applied Biosystems Inc (Foster City, USA). The $\Delta\Delta Ct$ (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels as previously described [11]. Results are reported as fold change in gene expression relative to basal conditions (hMSCs prior to seeding on plastic or on ceramic particles).

2.8 Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of three times and data are presented as mean values \pm standard deviation (SD). Statistical differences among groups were evaluated by one-way ANOVA, and Fisher's post hoc multiple-comparison tests (Tukey's) using significance at a P-value <0.05.

3 Results

3.1 Macroscopic evaluation of 3D constructs

The seeding of hMSCs on BCP particles (20/80 and 140–200 µm of diameter) (SEM, Fig. 1a) induced the formation of small aggregates immediately after addition of the cells and manual homogenization (swirling). Within one day, aggregates merged to form a skin-like layer containing the particles (Fig. 1b), suggesting a strong cellular adhesion and proliferation.

3.2 Cellular proliferation

To confirm the adhesion and proliferative capacities of hMSCs on BCP ceramic particles, the cell number over time was quantified. Results showed in Fig. 2 indicate that most of the hMSCs were capable to adhere on the particles and proliferate. In proliferation medium, the majority of seeded cells were attached on BCP particles and an

Table 1 Primers used for quantitative RT-PCR

Gene name	Sequences	Primers
Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	GCTCTTCAATGGACGTGTC	Forward primer 5' → 3' region (720–869)
Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	AGGACCTGGGAAGCAGCAA	Reverse primer 3' → 5' region (720–869)
Bone sialoprotein (BSP)	GGGCAGTAGTGACTCATCCGAAG	Forward primer 5' → 3' region (325–533)
Bone sialoprotein (BSP)	CTCCATAGCCCAGTGTAGCAG	Reverse primer 3' → 5' region (325–533)
Alkaline phosphatase (ALP)	TCAAGGGTCAGCTCACCACCA	Forward primer 5' → 3' region (471–677)
Alkaline phosphatase (ALP)	ATTGGCCTTCACCCACACAA	Reverse primer 3' → 5' region (471–677)

Fig. 1 Formation of 3D constructs. Association of biphasic calcium phosphate particles between 140 and 200 μm (A) with human mesenchymal stem cells forms a compact 3D construct (B)

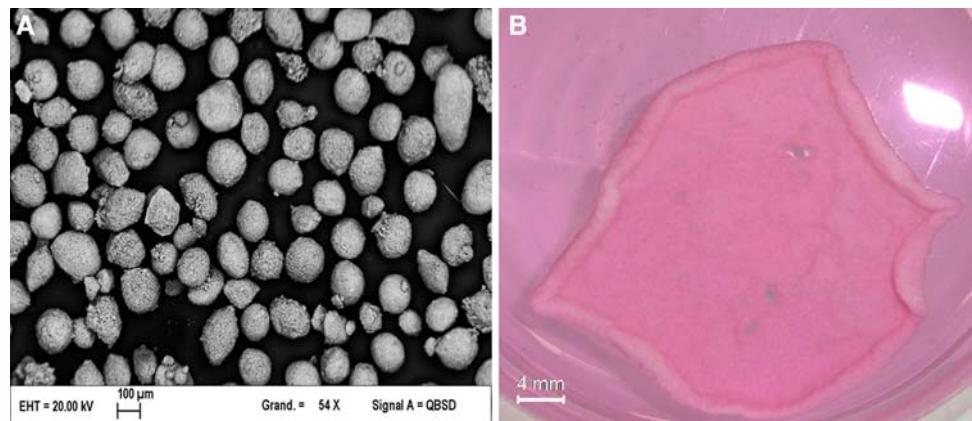
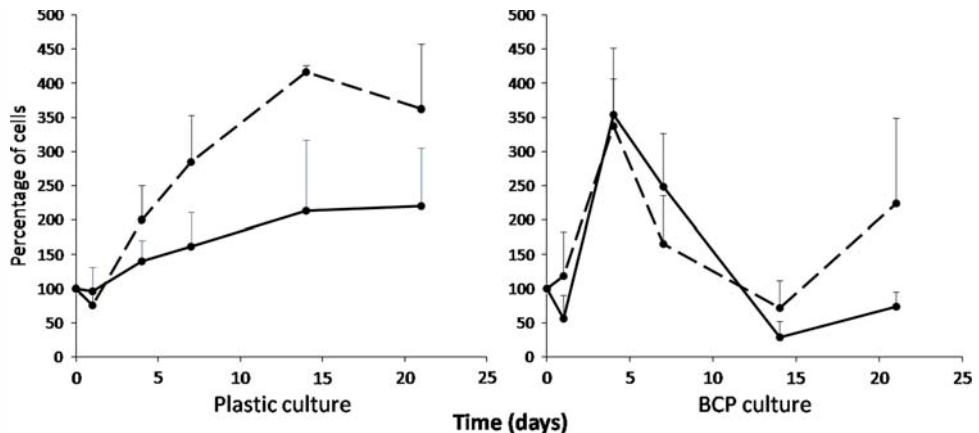


Fig. 2 hMSCs Proliferation on different substrate. A fraction of cells was cultured on polystyrene-treated culture plastic and another was cultured on BCP (20–80) ceramic particles (140–200 μm) in proliferative (dotted lines) or osteogenic medium (full lines) during 21 days



increase of cell number was measured after 1 day (110% of cells). As a comparison after one day of culture on plastic dishes, only 80% of cells remained in proliferative medium. In osteogenic medium, 60% of the seeded cells were attached on the particles after 1 day, while 90% were present on plastic.

With regard to proliferation, hMSCs number increased on plastic substrate at a constant rate in proliferative medium until 14 days. The cell number remained then constant. In osteogenic medium, hMSCs proliferation rate was less important with only one population doubling in 21 days. On BCP particles, hMSCs proliferated more rapidly during the first days of culture as compared to plastic. However, after 4 days, the number of cells on BCP particles seemed to decrease both in proliferation and osteogenic medium. On plastic and BCP particles, hMSCs proliferated less rapidly in osteogenic medium.

3.3 Microscopic evaluation of 3D constructs

Scanning electron microscopy (Fig. 3a, b) showed an extensive formation of extracellular matrix (ECM) after 14 days on the ceramic particles. This ECM was produced by hMSCs and covered entirely the particles after only

4 days of culture. Then, this strong cellular network remained around the particles for all culture times.

3.4 Alkaline phosphatase expression

Figure 4 shows alkaline phosphatase (ALP) staining realized on hMSCs after 21 days of culture in different conditions. The enzyme was expressed on plastic only for cells cultured in osteogenic medium. However, when cells were cultured on BCP particles, a positive staining appeared in both proliferative and osteogenic medium, with a slightly higher level in osteogenic medium.

3.5 Gene expression profile

The real time quantitative RT-PCR results are shown in Fig. 5. hMSCs cultured in proliferative medium (Fig. 5a) on particles (3D) showed a higher level expression of BMP-2 and BSP genes than on plastic (2D) after 1, 14 and 21 days of culture. ALP expression levels were similar for cells cultured on particles or on plastic but with different profiles over time. Indeed, cells cultured on plastic presented an increase of ALP expression level over 21 days while there was a decrease when cells were cultured on particles.

Fig. 3 Scanning electron microscopy of hMSCs/BCP particles construct. Human mesenchymal stem cells were cultured during 14 days on HA-TCP (20–80) BCP particles in proliferative medium. These pictures show the formation of a 3D construct with ECM production by hMSCs at different magnifications: $\times 80$ (A) and $\times 250$ (B)

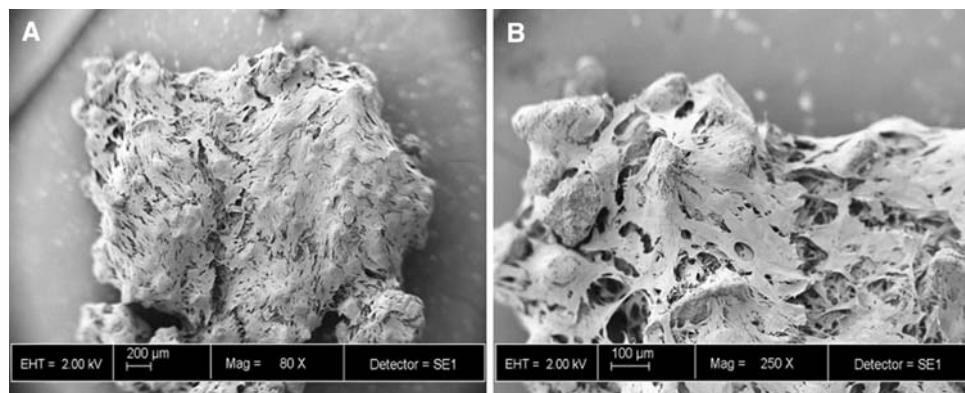


Fig. 4 Alkaline phosphatase staining of human mesenchymal stem cells. A density of 2×10^4 cells/cm 2 are seeded on plastic or on BCP particles and cultured during 21 days in different medium. A, B hMSCs on plastic culture dishes. C, D hMSCs on BCP (20/80) particles (140–200 μ m). A, C proliferative medium. B, D osteogenic medium

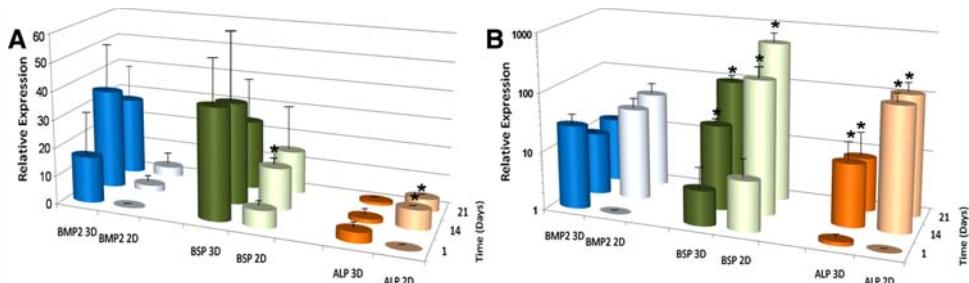
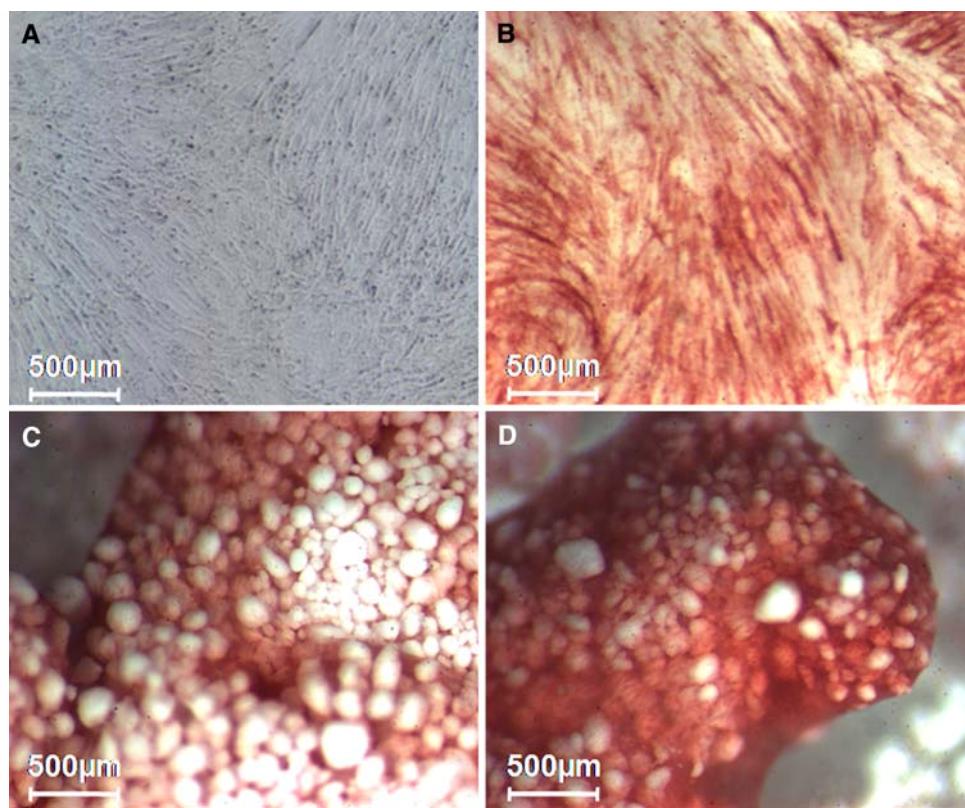


Fig. 5 Influence of 3D (hMSCs/BCP particles constructs) or 2D (plastic) culture on genes expression. Genes relative expressions were measured by real time quantitative RT-PCR SybrGreen. hMSCs were seeded at a density of 2 millions cells/160 mg of particles

(140–200 μ m) and cultured during 21 days in proliferative (A) or osteogenic medium (B). * Denotes a significant difference compared to day 1 of the same culture conditions ($P < 0.05$)

With osteogenic medium (Fig 5b) an important increase of genes expression levels was observed compared to proliferative medium. Expressions of BMP-2, BSP and ALP increased widely for hMSCs cultured on plastic (2D). On BCP particles (3D), cellular gene expressions of BSP and ALP were enhanced but not of BMP-2. Moreover, gene expressions profiles of cells cultured on BCP particles were closer to the ones of cells cultured on plastic when osteogenic medium was used instead of proliferative medium. Gene expression of BSP and ALP increased over time for both plastic and particles substrate.

4 Discussion

Within bone tissue engineering, ceramic scaffolds are commonly used to provide a template for cellular colonization and tissue organization. If ceramics are chemically very close to the natural mineral structure of bone, porous scaffolds are very far from bone structure at the cellular level. Instead of a three-dimensional matrix produced by cells and that enclose them, porous scaffolds offer only a flat surface to cells that has been nonetheless proven of interest in various studies [12–14].

Porous scaffolds are then associated with hMSCs that possess valuable proliferation and differentiation capacities [15–17]. To induce bone formation when associated with such scaffolds, extensive investigations have been conducted on the effect of culture medium on hMSCs osteoblastic differentiation [18–21]. As a result, differentiation mediums containing either hormones or growth factors are very often used in conjunction with ceramic porous scaffolds and stromal cells. However, very little interest has been given to the effect of the immediate cell environment on differentiation.

To create a 3D environment based on hydroxyapatite and tri-calcium phosphate ceramic, BCP particles ranging from 140 to 200 μm in diameter were associated with hMSCs. The hypothesis was that cells would adhere on particles surfaces and bridge them during their proliferation, producing so a 3D composite structure based on natural extracellular matrix. Indeed, hMSCs mixed at a specific ratio with BCP particles of a determined diameter range immediately cause their aggregation and form a solid and thick structure rapidly. Quantitative Alamar blue assays confirmed that almost all the seeded cells adhere on the particles after one day of culture. Furthermore, scanning electron microscopy clearly shows that cells cultured on particles produce an abundant extracellular matrix on and between particles. These results indicate the suitability of the particles arrangement as substrate for the creation of a cell-induced 3D environment.

The proliferation capacity of hMSCs within the formed 3D constructs was confirmed over the first four culture

days, independently of the culture medium used. At later time points, a decrease of cell number was noticed that could indicate cellular apoptosis. However, the Alamar blue assay is based on cellular metabolic activity. Therefore, a reduction of the assay fluorescence signal can be related to a decline of hMSCs metabolic activity instead of a decrease of cell number, similarly to osteogenic medium that induce a lower proliferation rate of hMSCs cultured on plastic. Such a decline suggests that the 3D environment, provided by extracellular matrix production and BCP particles, induces cellular differentiation.

To confirm that a ceramic-based 3D environment induces the differentiation of hMSCs and to evaluate the differentiation lineage followed, alkaline phosphatase (ALP) expression was investigated. ALP is a key enzyme released from osteoblasts and involved in bone mineralization that locally cleaves phosphates ions from organic phosphate at physiological pH and therefore induces the precipitation of calcium phosphate [22, 23]. Similarly to previous work [24, 25], a positive ALP staining was observed when hMSCs were cultured on BCP particles in osteogenic medium, indicating ALP expression and suggesting osteoblastic differentiation. Surprisingly, ALP expression was also observed when cells were cultured on particles without osteogenic factors. This suggests that the particle-based 3D environment can induce the osteoblastic differentiation of hMSCs. Such an effect could be related to the intrinsic properties of BCP particles or to the effect of the 3D environment produced by the cell. Further experiments will have to determine the relative importance of these parameters on ALP production. However ALP expression alone is not sufficient to confirm hMSCs osteoblastic differentiation induced by osteogenic medium or BCP particles.

Therefore, real time quantitative RT-PCR was performed to obtain an overview of other osteoblastic genes in addition to ALP. In proliferative medium, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), which plays a key role in osteoblasts differentiation, confirms the inductive effect of particles with an increase of mRNA expression compared to plastic culture. A similar result was obtained for bone sialoprotein (BSP), which is secreted by the osteoblasts and could be a nucleator for hydroxyapatite crystals formation [26, 27]. The higher gene expressions observed, as compared to plastic, tend to confirm the osteoblastic differentiation of hMSCs. Surprisingly, ALP gene expression was not related with the enzymatic expression observed.

In osteogenic medium, as expected from previous work [21, 28], gene expressions levels are enhanced on both plastic and particles substrates compared to proliferative medium. Gene expression of osteoblastic markers increased over time, with the same pattern regardless of culture substrate, suggesting that osteogenic medium levels off relative gene expression profile of hMSCs. The

differentiation factors present in osteogenic medium leads to an osteoblastic commitment of hMSCs independently of their environment.

5- Conclusion

Novel three dimensional constructs, associating biphasic calcium phosphate particles and human mesenchymal stem cells, were developed to study the influence of environment on osteoblastic differentiation. This paper demonstrates the capacity of hMSCs to adhere and proliferate on BCP particles and to form 3D constructs easy to handle. Moreover an induction effect of the cells/BCP particles constructs on hMSCs towards the osteoblastic lineage was observed. Although this effect was less pronounced on bone markers gene expression than the effect of osteogenic medium, it might be useful *in vivo*. Therefore these new 3D constructs appear as good candidates for bone tissue engineering and potentially clinical applications. Further *in vivo* studies will determine practically the bone formation potential of this scaffold in an ectopic site.

Acknowledgements

This work was supported financially by both the Inserm National Program for Research in Osteoarticular diseases (PRO-A) and the National Research Agency (ANR TecSan) through the ATOS project.

References

1. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* 1987;18:187.
2. Fischer EM, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD. Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng.* 2003;9:1179.
3. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, et al. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *J Orthop Res.* 2004;22:544.
4. Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72:96.
5. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2:83.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143.
7. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71.
8. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH and Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;S247.
9. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 2000;49:328.
10. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 2000;18:959.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402.
12. Cooper LF, Harris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res.* 2001;80:314.
13. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant.* 1992;1:23.
14. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 1999;75:424.
15. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992;13:81.
16. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Rimanucci M, Benayahu D, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation *in vivo*. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1335.
17. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987;20:263.
18. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641
19. de Bruijn JD, Van den Brink I, Mendes S, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells. *Adv Dent Res.* 1999;13:74.
20. Maegawa N, Kawamura K, Hirose M, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H. Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:306.
21. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988;254:317.
22. Lorch IJ. Alkaline phosphatase and the mechanism of ossification. *J Bone Joint Surg Am.* 1949;31B:94.
23. Kaysinger KK, Ramp WK. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1998;68:83.
24. Di Silvio L, Gurav N, Sambrook R. The fundamentals of tissue engineering: new scaffolds. *Med J Malays.* 2004;59(Suppl B):89.
25. Saldana L, Sanchez-Salcedo S, Izquierdo-Barba I, Bensiamar F, Munuera L, Vallet-Regi M, et al. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 2009;5:1294.
26. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:8562.
27. Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 1994;302(Pt 1):175.
28. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, et al. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation *in vitro*. *J Cell Biochem.* 2002;85:737.

Article 4 : Interest of a biomimetic Approach Combining Ceramic and Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering.

Tissue Engineering

Tissue Engineering Manuscript Central: <http://mc.manuscriptcentral.com/ten>

Interest of a Biomimetic Approach Combining Ceramic and
Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering

31-Aug-2010

SCHOLARONE™
Manuscripts

Interest of a Biomimetic Approach Combining Ceramic and Cell-Synthesized 3D Environment for Bone Tissue Engineering

Thomas Cordonnier ^{1,4}, Pierre Layrolle ^{1,*}, Alain Langonné ^{2,4}, Pierre Corre ⁵,
Audrey Renaud ¹, Luc Sensebé ^{2,4}, Philippe Rosset ^{3,4} and Jérôme Sohier ¹

¹ Inserm, U957, Laboratory for Bone Resorption Physiopathology and Primary Bone Tumor Therapy, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

² EFS Centre-Atlantique, Research Department, Tours, France

³ Departments of Orthopaedic Surgery, University Hospital, François Rabelais University, Tours, France.

⁴ EA3855, Laboratory of Hematopoesis, University François Rabelais, Tours, France

⁵ CHU Nantes, Maxillofacial department, Hotel-Dieu Hospital, Nantes, France

* corresponding author : Prof. Pierre Layrolle, PhD, Inserm U957, Faculty of Medicine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Tel: +33 2 72 64 11 43 ; fax: +33 2 40 41 28 60 ; e-mail: pierre.layrolle@inserm.fr

Abstract

Bone tissue engineering, associating macroporous scaffolds and osteoprogenitor cells, has not yet demonstrated its superiority to current clinical solutions for repairing bone defects. This study investigated both *in vitro* and *in vivo* a different strategy that more closely mimics the natural osteogenesis process than do conventional approaches. Biphasic calcium phosphate (BCP) particles or inert glass beads of similar sizes were used as scaffolding for human mesenchymal stem cell (hMSC) culture. The high degree of freedom provided with such scaffolds permitted cell proliferation and extensive extracellular matrix production and resulted in the rapid formation of thick cell-synthesized 3D constructs. The ability of these hybrid constructs to induce spontaneous osteoblastic differentiation *in vitro* was confirmed at the mRNA and protein level by monitoring the expression of runt-related transcription factor 2, bone morphogenic protein 2, type I collagen, bone sialoprotein and osteocalcin. The hMSC-BCP particle construct implanted in nude mice induced abundant ectopic bone formation (~35% volume). However, the hMSC-glass bead construct did not form any bone. These results highlight the relative importance of the BCP intrinsic properties for bone synthesis and show the synergistic effect of cell-synthesized 3D environments in achieving high bone yield.

Keywords: bone tissue engineering, mesenchymal stem cells, biphasic calcium phosphate, glass beads, three dimensional constructs, osteoblastic differentiation

Introduction

Each year in the world, millions of patients need treatment for skeletal disorders ^{1,2}. Many acute and chronic injuries or defects require bone tissue grafting. Bone grafting is a vital component in many surgical procedures to facilitate the repair of bone defects or fusions ³⁻⁸. Current options include autografts or allografts, with fresh autologous bone remaining the “gold standard” in bone reconstruction because of its osteogenic properties ^{9,10}. However, each of these options has significant limitations such as the need for a second surgical site and the associated morbidity as well as limited supply and inadequate size and shape. Thus, new options are needed ¹¹⁻¹³.

Mimicking *in vitro* the *in vivo* environment to generate tissues and organs in the laboratory is a major challenge. Tissue engineering can address this challenge by combining cells, suitable synthetic biomaterials and signaling molecules ^{14,15}. As a cell source for bone engineering, human mesenchymal stem cells (hMSCs) have generated great interest. In particular, the multipotency of bone-marrow-derived hMSCs ¹⁶⁻¹⁸ allows for obtaining a high number of osteoblast-derived cells after amplification and differentiation ¹⁹. The biomaterials for bone engineering must exhibit appropriate chemistry, morphology, and structure to promote cellular adhesion, migration and differentiation of osteoblasts and osteoprogenitor cells for the synthesis of new bone tissue. Hydroxyapatite and tri-calcium phosphate ceramics fit well within this profile because these materials mimic natural bone mineral features, offer bioactivity, osteoconductivity ¹¹ and, in some cases, osteoinductivity ²⁰⁻²⁶; and have been suitable for bone engineering ²⁷.

Most of the ceramic formulations used for bone engineering are shaped as porous scaffolds of various pore sizes and porosity to facilitate nutrient and metabolite distribution and guide cell growth to new bone tissue formation ²⁸⁻³¹. However, scientists have primarily focused on

the development of materials and scaffolds mimicking mature bone tissue, thus looking more at the end product rather than at its formation and healing. Indeed, mature bone tissue is composed of a high amount of extracellular matrix (ECM) and few cells. In contrast, during osteogenesis or bone healing, bone is formed by a series of complex events involving at first a high cell number and increased proliferation, followed by extensive ECM deposition and collagen type I mineralization. Classical porous scaffolds used in bone engineering do not allow for extensive cellular proliferation and matrix production. Furthermore, at the cellular level, the ceramic pores (hundreds of micrometers to millimeters) can be considered 2D curved surfaces, which differ from the natural 3D environment of bone tissue. Such dissimilarities could explain the lack of consistent clinical outcomes with the canonical bone engineering approach ³²⁻³⁴ and the resulting low efficacy in bone regeneration ³⁵.

As an alternative to porous scaffolds, particles (140-200 μm) of biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics can be used. hMSCs seeded on such particles can proliferate and abundant inter-particle ECM is formed ³⁶. Within hours, solid 3D structures are formed, composed of BCP particles embedded in a 3D cell-synthesized ECM. Interestingly, unlike the classical bone tissue engineering approach, these constructs seem to induce hMSC osteoblastic differentiation during *in vitro* culture without osteogenic factors. This spontaneous osteoblastic induction raises questions about the roles of ceramic structures and properties, cellular interactions, ECM formation and the resulting 3D environment in the osteogenesis of hybrid constructs. However, few studies have investigated these aspects.

Therefore, this study examined in more detail the effect of 3D constructs made with BCP particles seeded with hMSCs on osteoblastic differentiation and bone formation. Additionally, it explored the relative involvement of cell-synthesized 3D environments and ceramic properties on the 3D constructs effects. We compared scaffolds of similar sizes and shapes but

with different compositions and microstructures (BCP particles and glass beads) *in vitro* in terms of osteoblastic mRNA and protein expression and *in vivo* in terms of their capacity to form new bone in an ectopic site. Furthermore, we compared *in vivo* both BCP-particle and glass bead constructs to a standard porous ceramic scaffold in terms of bone formation induced by classical bone engineering.

Materials and methods

Scaffold characterization

BCP particles made of hydroxyapatite (20%) and beta-tri-calcium phosphate (80%) of 140–200 μm (MBCP+®) were provided by Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France). The purity of the BCP particles was analyzed by x-ray diffraction (XRD, Philips PW 1830, CuK α source) and Fourier transform infrared spectroscopy (Nicolet, Magna-IR 550). Traces of CaO in the BCP particles were checked by a phenolphthalein test. The surface of BCP particles was measured by mercury intrusion porosimetry (AutoPoreIII, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France) with a threshold of 10 μm and was found to be $863 \pm 72 \text{ cm}^2/\text{g}$ ($n=3$). BCP particles were sterilized by beam irradiation (gamma, 25 kGray). Silicate glass microcarrier beads (GB) measuring 150-210 μm in diameter were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and sterilized in an autoclave (alphaklave23, HMCE, Taillis, France) at 121 °C for 20 min. BCP discs of 75% porosity, 8 mm in diameter and 3 mm thick (average weight 0.14 g and pore size 400 μm) were provided by Biomatlante. The chemical composition and surface microstructure of BCP discs and particles were similar. Mercury intrusion porosimetry of the BCP discs indicated a surface area of $323 \pm 35 \text{ cm}^2/\text{g}$ ($n=3$, threshold of 10 μm). BCP porous discs were sterilized by irradiation (gamma, 25 kGray). The microstructure was observed by scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450 VP Carl Zeiss, Oberkochen,

Germany) to characterize the shape and surface of the different types of materials. All samples were gold-sputtered before analysis (Denton Vaccum LLC, desk III, Moorestown, NJ).

Cell isolation and *in vitro* expansion

Mononuclear cells were derived from bone marrow from donors who gave their informed consent for its use, and the protocol was approved by the Tours University Hospital ethics committee (Tours, France). Bone-marrow aspirates were obtained from 3 healthy donors during orthopedic surgical procedures after exposure of the iliac crest. Aspirates of 5 to 20 ml were harvested by use of a bone-marrow biopsy needle inserted through the cortical bone and a plastic syringe of 20 cm³ rinsed with heparin and containing 1 ml heparin (15,000 IU). Bone-marrow cells were resuspended in alpha-modified Eagle's medium (α -MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone, South Logan, UT) and 1 ng/ml fibroblast growth factor-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cells were seeded at 1 x 10⁵ mononucleated cells per cm² and cultured in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Medium was refreshed twice weekly until cells reach 80% confluence. Then cells were enzymatically removed from the plate by 3-min incubation in 0.25% trypsin/EDTA (Lonza, Basel, Switzerland) at 37°C and seeded at 1 x 10³ cells/cm² in culture flasks for further expansion until passage 2.

***In vitro* cell culture**

A cellular suspension of 500 μ l containing 4.5 x 10⁵ hMSCs was loaded on BCP particles or glass beads in ultra-low-attachment 24-well plates (Corning Life Sciences, Lowell, MA). Both BCP particles and glass beads (35 mg) uniformly and entirely covered the bottom of

each well as a monolayer, which corresponded to an available surface area of 30 cm². The same seeding density of 15,000 cells/cm² was used for both BCP particles and glass beads. To minimize ion release from the ceramic, BCP particles were incubated for 48 hours in twice-refreshed basic medium (α-MEM, 10% FCS, 1% antibiotic/antimycotic) before cell seeding. Cells were then cultured for several days in basic or osteogenic medium (basic medium supplemented with β-glycerophosphate [10 mM], ascorbic acid-2-phosphate [0.2 mM], dexamethasone [10⁻⁸ M, all Sigma-Aldrich]). The culture medium was refreshed every 3 days. As a control, hMSCs were seeded on 24-well plastic plates and cultured under the same conditions as for BCP particles or glass beads.

Morphological evaluation and cellular proliferation of scaffold–hMSC constructs

Samples obtained after 1, 10 and 21 days of culture were dehydrated in successive and increasing ethanol baths and then in increasing grades of 1,1,2-trichloro-1,2,2 trifluoroethane. Samples were then carbon sputtered (Cressington 108 carbon/A) before analysis by SEM. The chemical composition of elements was determined by an energy dispersive x-ray analysis system (EDX). Cell proliferation was monitored by alamar blue assay. At different times (days 1, 4, 7, 14 and 21), scaffold–hMSC constructs in triplicate were washed in phosphate buffered saline (PBS, 1X, Lonza) before incubation for 45 min at 37°C and 5% CO₂ in PBS 1X solution containing 10% (v/v) alamar blue (BioSource, Caramillo, CA). For each sample, 200 µl was collected in duplicate and transferred to a 96-well plate before measurement by a fluorescent reader (Tristar LB 941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Microscopy evaluation of cell proliferation involved use of LIVE/DEAD® cell viability assays (Invitrogen) after 1 and 7 days of culture in proliferation medium. Scaffold-hMSC constructs were washed with PBS 1X before incubation for 30 min at 37°C and 5% CO₂ in 500 µl of a solution containing 0.5 µM of calcein AM and 2 µM of ethidium homodimer-1 in

PBS 1X. Scaffold-hMSC constructs were washed a second time before observation under a Leica DMRXA fluorescent microscope (Leica Microsystems).

Real-Time RT-PCR

Real-time RT-PCR was used to evaluate the relative level of genes characteristic of osteoblastic commitment. Briefly, hMSCs from the 3 different donors cultured on BCP particles, glass beads or plastic dishes were washed in PBS 1X before being transferred to a 1.5-ml tube with lysis buffer and vigorously shaken to lyse the cells. Total RNA was extracted with use of an RNA extraction kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Thereafter, RNA samples (1 μ g) were reverse transcribed with use of avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase and random primers in a total volume of 25 μ l. Real-time quantitative PCR was performed in the Chromo4 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with SYBR Green detection and Taq DNA polymerase according to the manufacturer's recommendations. PCR amplification involved 39 cycles of 30 sec at 98°C, 15 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. Expression of the target gene was normalized to that of the endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels as previously described³⁷. Primer sequences are in Table 1.

Immunohistochemistry

After 14 days of culture, cells cultured on BCP particles, glass beads or plastic dishes were removed from culture. Before staining, scaffold-hMSC constructs were frozen in liquid nitrogen and embedded in *Tissue-Tek® O.C.T™ Compound* (Sakura, Villeneuve d'Ascq, France). To study the expression of different proteins, 7- μ m-thick sections were cut with use of a cryostat microtome (Leica Cryocut 3000, Leica Microsystems Wetzlar, Germany) and stained by use of an immunohistochemistry kit (EnVision®+ Dual Link System-HRP

(DAB+), Dako, Trappes, France). Slides were rinsed in PBS (1X) for 5 min before the endogenous enzymes were blocked for 10 min with the Dual endogenous enzyme block reagent. Samples were then washed (washing buffer, PBS 1X, 3% bovine serum albumin) before incubation with the primary antibody for 1 hour at room temperature. Antibodies for the following were diluted as follows: bone morphogenetic protein 2 (BMP-2, Abcam), 1/200; collagen type I (ColI, Sigma-Aldrich), 1/4000; bone sialoprotein (BSP, Abcam), 1/600; and osteocalcin (OCN, R&D Systems), 1/200. For BMP-2, washing buffer was supplemented with 0.2% triton (Sigma-Aldrich) for cell membrane permeation. Subsequently, samples were rinsed with washing buffer and then incubated for 30 min with labeled polymer-horseradish peroxidase. Then, slides were washed before incubation with substrate-chromogen solution for 10 min. Samples were finally mounted with use of aqueous mounting medium. Immunohistochemistry staining was assessed with positive (human bone chips) and negative controls (human cartilage) (data not shown).

***In vivo* study**

All animal procedures were performed in accordance with a protocol approved by the local committee for animal care and ethics. Immunocompromised mice, Swiss nude female mice, 7 weeks old, were purchased from a professional breeder (Charles River Laboratory, France). Animals were placed in groups of 5 in cages inside HEPA-filtered isolators with food and water given *ad libitum* for 14-day quarantine before surgery. hMSCs were loaded at 4.5×10^5 cells onto 35 mg of BCP particles or glass beads (15,000 cell/cm²). Alternatively, 7×10^5 hMSCs were seeded onto BCP macroporous discs corresponding individually to an available surface area of 46.5 cm² and therefore to a seeding density of 15,000 cells/cm². Cells were cultured for 7 days on these substrates in ultra-low-attachment plates with proliferation or osteogenic medium. Medium was refreshed every 3 days. Then, scaffold-hMSC constructs

(n=5) were implanted subcutaneously in the backs of 15 Swiss nude mice. Animals were under general anesthesia with isoflurane gas (Halothane, Baxter, Zurich, Switzerland), and the surgery was performed under aseptic conditions. Two 1-cm incisions were made along each side of the dorsum of the back. Then, blunt dissection was performed to separate the skin from the subcutaneous connective tissue and form pockets under the skin into which constructs were inserted. Skin was closed with biodegradable sutures (Monocryl 4/0 Ethicon, Johnson&Johnson, USA). After 8 weeks, animals were anesthetized and killed by intra-cardiac injection of an overdose of sodium pentobarbital (dolethal, 0.5 ml). Implants were retrieved by dissection and immediately placed in fixative (neutral 4% formaldehyde) for 2 days.

Histology

Bone explants were processed for non-decalcified histology according to standard procedures. After fixation, samples were dehydrated in a graded series of ethanol, acetone, incubated in methylmethacrylate and finally embedded in polymethylmethacrylate resin. After polymerization, 25- μ m-thick cross sections of the samples were cut by use of a diamond-saw microtome (Leica SP 1600, Leica Microsystems), stained with methylene blue and basic fuchsin and analyzed by light microscopy (Leica Microsystems).

Bone quantification

Newly formed bone within each explant was quantified by back-scattered electron microscopy (BSEM). Sections of the explants were polished and gold sputter-coated. Contiguous BSEM images were taken at $\times 30$ magnification and 15 kV by use of an electron microscope (Leo 1450 VP Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). This technique allows for separating mineralized bone from the implanted scaffolds on the basis of their respective electronic densities. For each explant, 2 sections at different heights were analyzed. The

occurrence of bone formation was first determined. After selecting the region of interest corresponding to the overall fibrous tissue capsule, the amount of mineralized bone tissue, BCP and non-mineralized tissue was determined by using an image analysis system (QWin, Leica Microsystems). The percentage of bone was calculated by dividing the surface of mineralized bone by the available surface within the region of interest.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Analysis involved use of SPSS v16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

3D constructs

SEM revealed that BCP ceramic particles and glass beads had similar shape and size (Fig. 1a and 1b) but different surface structures. BCP substrates showed microporosity, whereas glass beads exhibited a smooth surface. Stereoscopic images (Fig. 1c and 1d) showed hMSCs adhered identically on BCP particles and glass beads and, after 1 day of culture, formed the same type of strong hybrid construct. At high SEM magnification (Fig. 1e and 1f), cells were attached by pseudopodia on multiple adjacent BCP particles or glass beads. Over 4 culture days, the particles or beads moved closer to each other and resulted in a compact structure, thus reducing the construct areas while increasing the thickness. After 7 culture days, the constructs were firm and could be handled with tweezers. After 10 culture days, SEM revealed that hMSCs synthesized an abundant ECM around and between BCP particles or glass beads, which resulted in thick cell-synthesized 3D constructs (Fig. 1g and 1h). Within this synthesized matrix, EDX revealed mineralized calcium phosphate crystals deposited on collagen fibers for the hMSC–BCP particle construct after 21 days in both proliferation and osteogenic media (Supplementary fig. 1). These crystals were mainly composed of phosphorus and calcium, in proportions similar to the apatite found in human trabecular bone. In contrast, such crystal formation was not observed in the ECM synthesized on the hMSC–glass bead construct cultured under the same conditions (Supplementary fig. 1).

Cell proliferation on scaffolds (BCP particles and glass beads)

hMSCs were capable of adhering to BCP particles or glass beads and could proliferate on these substrates (Fig. 2). At the first culture measurement time, more of the seeded cells adhered on glass beads than on BCP particles. Over 14 days, the cells proliferated slowly but

steadily on all substrates. These proliferation rates were followed by a slight decrease in rate until day 21. The ability of the different particulate substrates to support hMSC proliferation was further confirmed by LIVE/DEAD® cell viability assays. Indeed, the number of living cells on BCP particles or glass beads increased over 7 days. Furthermore, the cells presented an elongated phenotype characteristic of hMSCs in expansion phase.

***In vitro* osteoblastic differentiation**

Real time RT-PCR

3D constructs formed by seeding hMSCs on BCP particles or glass beads showed an upregulation of all observed osteoblastic markers as compared with cells cultured on plastic wells, regardless of culture media used. Real time RT-PCR revealed an expression peak after 1-day culture for all genes except for *bone sialoprotein (BSP)* (Fig. 3). Subsequently, the expression of some genes remained at a low level (*BMP-2*) or gradually increased over culture time. An exception was observed for *OCN*, whose expression decreased during culture on glass beads. In contrast, *BSP* expression regularly increased during culture on BCP particles or glass beads. Overall, for most of the genes, levels of expression were higher in cells cultured on glass beads than on BCP particles, notably during the initial expression peak. Interestingly, these expression profiles and magnitudes were in general similar in proliferation medium (without any soluble differentiation factors) or in differentiation medium, regardless of culture substrate. An exception was found for *Coll*, which showed a stronger gene expression initially with culture in proliferation than osteogenic medium. Similarly, *Runx2* showed a higher initial expression with culture on BCP particles than on glass beads in osteogenic medium.

Immunohistochemistry of bone tissue proteins

We used immunohistochemistry to confirm the gene expression profiles in terms of hMSC osteoblastic differentiation. Culture of cells on BCP particles or glass beads for 14 days without osteogenic factors revealed positive staining for osteoblastic markers (Fig. 4). Indeed, early (BMP-2, ColI) and late (BSP, OCN) markers were expressed in the cell-synthesized 3D environments of BCP particles or glass beads produced in proliferation medium. Staining for ColI was greater than for any other evaluated protein, for the 2 different substrates. The 2 substrates produced no difference in protein expression. As expected, similar results were observed when cells were cultured in osteogenic medium (Supplementary fig. 2). In contrast, culture in plastic induced the expression of these osteoblastic proteins only on culture with osteogenic factors (Fig. 4).

***In vivo* implantation of cell-synthesized 3D constructs**

After 8 weeks of subcutaneous implantation in mice, the hMSC–BCP particle construct induced abundant bone formation in all samples (Fig. 5A). For samples cultured in proliferation medium before implantation, bone was formed homogeneously through all the implanted samples (5/5). BCP particles were surrounded by newly formed bone and bone bridges appeared between particles, as well as osteocyte lacunas. The bone formation was lower in the BCP construct cultured in osteogenic than proliferation medium. Furthermore, bone formation for constructs osteogenically induced was restrained more to the periphery of samples. Unlike for the BCP-particle construct, for the glass bead construct, no bone was formed in any of the implanted samples (0/5) (Fig. 5C). Glass particles were closely packed and surrounded by fibrous tissue. As a control, all implanted macroporous BCP discs induced

the formation of bone. However, the amount of newly formed bone within these explants was low, whether the seeded scaffolds were cultured in proliferation or osteogenic medium before implantation. Furthermore, bone formation was limited to the outer surface of the porous BCP discs.

Bone quantification analysis by BSEM confirmed histological observations and showed important bone formation for cell-synthesized 3D environments without osteogenic factors (Fig. 6). Indeed, more than 35% of the available space between BCP particles was filled with mature bone. Supplementing the culture medium with osteogenic factors resulted in only 10% bone formation. The lowest amount of newly formed bone was obtained with porous BCP discs used as a substrate for cell culture. Indeed, only 3% of bone was quantified with this condition with or without osteogenic factors. The cell-synthesized 3D environment produced with BCP particles, without osteogenic medium, was the best condition to form bone in an ectopic site *in vivo*.

Discussion

To mimic more closely the natural conditions observed during osteogenesis or bone healing, hMSCs originating from bone marrow should be given the opportunity to proliferate extensively and synthesize ample amounts of ECM. A previous study showed that BCP particles (140-200 μm) could be used in place of dense scaffolds for such expansion and matrix synthesis. Indeed, hMSCs seeded on this substrate were able to swiftly form a strong 3D construct ³⁶. Furthermore, *in vitro*, gene expression analysis of hMSCs within these constructs suggested a spontaneous induction towards the osteoblastic lineage.

Our current results confirm these previous observations. hMSCs seeded on BCP particles adhered to and proliferated during the early days of culture and quickly formed a strong hybrid construct. Therefore, the BCP particle sizes (140-200 μm) and resulting spatial arrangement as a monolayer at the bottom of 24-well plates are suitable for hMSC expansion. SEM analysis during the first culture days further showed that hMSCs were able to bridge the interspaces between adjacent BCP particles by multiple attachment sites or by cell-cell contact from individual particle surfaces (Fig. 1e), which agreed well with previous reports showing the ability of human osteoblasts to form bridges across large gaps ($> 100 \mu\text{m}$) between poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres ³⁸. Over culture time, in addition to cellular proliferation, ECM was synthesized around and between the particles, which resulted in thick, solid cell-synthesized 3D constructs (Fig. 1e and 1f). Intergranular spaces between the BCP particles provide a negative porosity template as compared with traditional macroporous scaffolds. As a result, the BCP particles offer a fully open porosity, a high degree of freedom and a large surface area for the cells to proliferate in 3D and produce an abundant ECM.

The hMSC–BCP particle construct showed spontaneous osteoblastic differentiation (without culture in osteogenic factors) at the mRNA and protein levels (Figs. 3 and 4). Indeed, all studied osteoblastic genes increased in expression during early and/or late culture. Of particular interest, genes of early transcription (Runx2) and growth factors (BMP-2) were overexpressed after 1 day of culture. These 2 proteins are of primary importance for osteoblastic commitment and osteoblast maturation. BMP-2 activates Smads pathways that act on osteoblastic gene expression via first Runx2 and then osterix, which in turn act on the synthesis of proteins such as Coll, BSP and OCN ³⁹⁻⁴¹. The osteoblastic phenotype was further corroborated by positive immunohistological staining of early markers such as BMP2 and Coll and late markers such as BSP and OCN. Cell–cell contact observed in the constructs may have played a role in this spontaneous differentiation. Indeed, a high number of cellular interactions are known to favor hMSC osteoblastic differentiation ^{42,43}. Moreover, the number of cell–cell interactions is potentially higher with our 3D culture conditions than with 2D culture. This spontaneous osteogenic differentiation could also be enhanced by the abundant ECM formation, which favors hMSC proliferation and differentiation ⁴⁴⁻⁴⁶. This ECM, mainly composed of Coll, could induce proliferation of cells, which in turn continue to synthesize ECM until a certain degree of cellular confluence and ECM density is reached. At this point, hMSCs stop proliferating and start to differentiate into an osteoblastic lineage to prepare for ECM mineralization.

In addition to analyzing the differentiation state of the cells, we evaluated the capacity of the hMSC–BCP construct to support bone formation *in vivo*. Interestingly, subcutaneous implantation of the BCP construct in nude mice resulted in important formation of mature bone (35% of available space). Numerous osteocytes were present, with bone bridges between particles, which suggested the structure of trabecular bone. Surprisingly, the use of osteogenic

factors during culture of these BCP construct before implantation resulted in significantly less abundant bone formation.

Cell-synthesized 3D matrix might be sufficient to induce bone formation. However, many studies have highlighted the importance of ceramic properties with regard to bone formation⁴⁷⁻⁴⁹. To better understand the respective role of the cell-synthesized 3D environment and BCP particle properties, we used inert glass beads with the same size and shape as BCP particles and a smooth surface for cell culture. Glass beads behaved similarly to BCP particles in forming cell-synthesized constructs *in vitro*. Seeded hMSCs were able to adhere to, proliferate and synthesize abundant ECM on glass beads. Interestingly, spontaneous osteoblastic differentiation was observed at mRNA and protein levels. The gene expression patterns on glass beads and BCP particles were similar, with some genes showing more intense expression (BMP-2). In addition, all proteins analyzed (BMP-2, ColI, BSP and OCN) showed positive immunohistological staining. Therefore, the spontaneous differentiation of hMSCs into an osteoblastic lineage is linked to the cell-synthesized 3D environment and not to the intrinsic properties of the BCP particles. However, when implanted subcutaneously in mice, the hMSC–glass bead construct failed to form bone. Therefore, in contrast to *in vitro* results, these surprising *in vivo* results emphasize the crucial role of BCP intrinsic properties in bone formation. To clarify these seemingly opposite conclusions, we evaluated macroporous BCP discs commonly used in bone engineering^{50,51} in the same mouse model. These scaffolds do not allow for the formation of abundant cell-synthesized 3D ECM but rather produce a cell monolayer at the surface^{35,52}. In line with previously reported studies^{53,54}, our use of this kind of scaffold produced ectopic bone formation in low quantity and limited to the outer surface. Therefore, both BCP properties and the specific 3D environment are important for inducing abundant bone tissue formation in the hMSC–BCP particle construct.

BCP ceramics are known to be bioactive because of their balance between a stable HA and a more soluble TCP phase⁵⁵⁻⁵⁸, particularly in the ratio of 20% HA and 80% TCP⁵⁰. This specific composition is soluble and gradually dissolves in the body, thereby releasing calcium and phosphate ions⁵⁹⁻⁶². This release, associated with the important surface microporosity of the BCP particles (Fig. 1a), may increase the dissolution-precipitation process of CaP on the surface. This process can be coupled with co-precipitation^{63,64} or adsorption^{65,66} of proteins such as BMPs that favor bone formation *in vivo*⁶⁷. Furthermore, the ion release leads to the formation of apatite microcrystals⁶⁸. During bone formation, after ECM deposition, mature osteoblasts transfer extracellular calcium to nucleation sites located on collagen fibers, thus resulting in a crystal formation and mineralized matrix. ECM proteins such as ColI and BSP possess calcium binding sites, and OCN can favor calcium binding⁶⁹. Consequently, calcium ions released by BCP particles in the cell-synthesized constructs could explain the abundant bone we observed *in vivo*. Ion release associated with the high amount of ECM present before implantation and the expression of key proteins could favor the rapid mineralization of the matrix after implantation and subsequent abundant bone formation. Macroporous BCP discs do not permit the synthesis of abundant ECM and therefore result in limited bone deposition, mainly at the location of cell seeding on the outer pores. For glass beads, the lack of calcium and phosphate release might hamper this mineralization and therefore the formation of bone. This hypothesis is strengthened by the presence of apatite crystals in the ECM of the hMSC-BCP particle construct after 21 days of culture *in vitro* as compared with the glass bead construct (Supplementary fig. 1).

Conclusions

The BCP particle substrate can provide a good environment for hMSCs to proliferate and synthesize their own ECM in a cell-synthesized 3D construct. *In vitro*, this 3D environment can spontaneously induce osteoblastic commitment without the need for osteogenic factors, and *in vivo*, the hMSC-BCP particle 3D construct forms abundant, mature bone tissue. These results highlight the importance of mimicking the natural environment of MSCs and recreating events that occur during bone healing. In terms of bone tissue engineering, the BCP construct, with its abundant bone formation, short culture time to obtain the construct (7 days) and excellent handling properties and plasticity, suggests future prospects for the development of novel bone regeneration strategies, especially in stabilized orthotopic sites, to repair large bone defects or to improve implant integration. Future studies will focus on the formation of larger cell-synthesized constructs, in multiple layers, for example, to repair large bone defects.

Acknowledgments

The authors are grateful to Paul Pilet for precious scientific discussion and the institution microscopy department for micro-analysis and micro-characterization, U791 Nantes microscopy. The authors thank the department of Cryopreservation, Distribution, Typage et Archivage Animal (CDTA, CNRS, Orléans, France) for housing mice and Dr Cécile Frémond for her precious help.

This work was supported by the French national research agency (ATOS project) and partially funded by a grant from the Directorate-General for research of the European Commission (no. 241879), through the REBORNE project.

References

1. Langer, R. & Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926 (1993).
2. Lawrence, R.C. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* **41**, 778-799 (1998).
3. Oklund, S.A., Prolo, D.J., Gutierrez, R.V. & King, S.E. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin. Orthop. Relat. Res* 269-291 (1986).
4. Brown, K.L. & Cruess, R.L. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* **64**, 270-279 (1982).
5. de Boer, H.H. The history of bone grafts. *Clin. Orthop. Relat. Res* 292-298 (1988).
6. MacEwen, W. I. Intrahuman Bone Grafting and Reimplantation of Bone. *Ann. Surg* **50**, 959-968 (1909).
7. Urist, M.R. & Strates, B.S. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. *Clin. Orthop. Relat. Res* **71**, 271-278 (1970).
8. Damien, C.J. & Parsons, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* **2**, 187-208 (1991).
9. Helm, G.A., Dayoub, H. & Jane, J.A. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus* **10**, E4 (2001).
10. Burchardt, H. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am* **18**, 187-196 (1987).
11. LeGeros, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res* 81-98 (2002).
12. Johnson, K.D. et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J. Orthop. Res* **14**, 351-369

- (1996).
13. Vaccaro, A.R. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* **25**, s571-578 (2002).
14. Petite, H. et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol* **18**, 959-963 (2000).
15. Derubeis, A.R. & Cancedda, R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* **32**, 160-165 (2004).
16. Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. & Kulagina, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol* **4**, 267-274 (1976).
17. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
18. Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
19. Bruder, S.P. et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res* S247-256 (1998).
20. Sun, H. et al. The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductivity of hydroxyapatite/tricalcium phosphate biomaterial. *Transplant. Proc* **40**, 2645-2648 (2008).
21. Habibovic, P. et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* **26**, 3565-3575 (2005).
22. Gosain, A.K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast. Reconstr. Surg* **109**, 619-630 (2002).
23. Klein, C., de Groot, K., Chen, W., Li, Y. & Zhang, X. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. *Biomaterials* **15**, 31-34 (1994).
24. Ripamonti, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of

- different animal models. *Biomaterials* **17**, 31-35 (1996).
25. Winter, G.D. & Simpson, B.J. Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs. *Nature* **223**, 88-90 (1969).
26. Yamasaki, H. & Sakai, H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* **13**, 308-312 (1992).
27. Akao, M., Aoki, H. & Kato, K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *Journal of Materials Science* **16**, 809-812 (1981).
28. Zhang, R. & Ma, P.X. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *J. Biomed. Mater. Res* **52**, 430-438 (2000).
29. Okamoto, M. et al. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med* **17**, 327-336 (2006).
30. Nair, M.B., Suresh Babu, S., Varma, H.K. & John, A. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. *Acta Biomater* **4**, 173-181 (2008).
31. Ito, Y. et al. Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic hybridized with cultured marrow stromal stem cells derived from Green rat. *J Biomed Mater Res A* **69**, 454-461 (2004).
32. Quarto, R. et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med* **344**, 385-386 (2001).
33. Marcacci, M. et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* **13**, 947-955 (2007).
34. Chapman, M.W., Bucholz, R. & Cornell, C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* **79**, 495-502 (1997).
35. Meijer, G.J., de Bruijn, J.D., Koole, R. & van Blitterswijk, C.A. Cell based bone tissue

- engineering in jaw defects. *Biomaterials* **29**, 3053-3061 (2008).
36. Cordonnier, T. et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* **21**, 981-987 (2010).
37. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
38. Borden, M., El-Amin, S.F., Attawia, M. & Laurencin, C.T. Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials* **24**, 597-609 (2003).
39. Javed, A. et al. Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs (Print)* **189**, 133-137 (2009).
40. Shirakawa, K. et al. CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates osteoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol* **26**, 6105-6116 (2006).
41. Chen, D. et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif. Tissue Int* **60**, 283-290 (1997).
42. Li, Z., Zhou, Z., Yellowley, C.E. & Donahue, H.J. Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone* **25**, 661-666 (1999).
43. Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B.A. & Howard, G.A. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* **28**, 362-369 (2001).
44. Liu, G. et al. Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin. J. Traumatol* **7**, 358-

- 362 (2004).
45. Valarmathi, M.T., Yost, M.J., Goodwin, R.L. & Potts, J.D. A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* **14**, 491-504 (2008).
46. Cool, S.M. & Nurcombe, V. Substrate induction of osteogenesis from marrow-derived mesenchymal precursors. *Stem Cells Dev* **14**, 632-642 (2005).
47. Habibovic, P. & de Groot, K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* **1**, 25-32 (2007).
48. Daculsi, G., LeGeros, R.Z., Nery, E., Lynch, K. & Kerebel, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* **23**, 883-94 (1989).
49. Winter, M. et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **2**, 159-160 (1981).
50. Arinzech, T.L., Tran, T., Mcalary, J. & Daculsi, G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* **26**, 3631-3638 (2005).
51. Malard, O. et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* **36**, 323-330 (2005).
52. Mendes, S.C., Sleijster, M., Van Den Muyzenberg, A., De Bruijn, J.D. & Van Blitterswijk, C.A. A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach. *J Mater Sci Mater Med* **13**, 575-581 (2002).
53. Eniwumide, J.O., Yuan, H., Cartmell, S.H., Meijer, G.J. & de Bruijn, J.D. Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft. *Eur Cell Mater* **14**, 30-38; discussion 39 (2007).
54. Yuan, H. et al. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate

- ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* **13**, 1271-1275 (2002).
55. Klein, C.P., Driessens, A.A., de Groot, K. & van den Hooff, A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res* **17**, 769-784 (1983).
56. de Groot, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* **1**, 47-50 (1980).
57. Shimazaki, K. & Mooney, V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J. Orthop. Res* **3**, 301-310 (1985).
58. Hollinger, J.O. & Battistone, G.C. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin. Orthop. Relat. Res* 290-305 (1986).
59. Daculsi, G., LeGeros, R.Z., Nery, E., Lynch, K. & Kerebel, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res* **23**, 883-894 (1989).
60. Daculsi, G., LeGeros, R.Z., Heughebaert, M. & Barbieux, I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Int* **46**, 20-27 (1990).
61. Heughebaert, M., LeGeros, R.Z., Gineste, M., Guilhem, A. & Bonel, G. Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J. Biomed. Mater. Res* **22**, 257-268 (1988).
62. Jung, G., Park, Y. & Han, J. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med* **21**, 1649-1654 (2010).
63. Liu, Y., Layrolle, P., de Bruijn, J., van Blitterswijk, C. & de Groot, K. Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy. *J. Biomed. Mater. Res* **57**, 327-335 (2001).

64. Liu, Y., Hunziker, E.B., Layrolle, P., De Bruijn, J.D. & De Groot, K. Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity. *Tissue Eng* **10**, 101-108 (2004).
65. Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & García, A.J. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* **25**, 5947-5954 (2004).
66. Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & García, A.J. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 5953-5957 (2005).
67. Yuan, H. et al. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med* **9**, 717-721 (1998).
68. Rohanizadeh, R. et al. Apatite precipitation after incubation of biphasic calcium-phosphate ceramic in various solutions: influence of seed species and proteins. *J. Biomed. Mater. Res* **42**, 530-539 (1998).
69. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* **3 Suppl 3**, S131-139 (2008).

Table legends

Table 1. Primers used for real time PCR experiments.

Figure captions

Fig. 1. Formation of 3D construct with biphasic calcium phosphate (BCP) particles (a, c, e, g) or glass beads (b, d, f, h). (a, b) SEM images of a particle or bead without cells. (c, d) stereoscopic images of human mesenchymal stem cells (hMSCs) after 1 day of culture. (e, f) high-magnification SEM image after 1 day of culture showing cells attached by pseudopodia on multiple adjacent particles or beads. (g, h) SEM images showing formation of thick, strong 3D constructs with high extracellular matrix (ECM) synthesis after 10 culture days.

Fig. 2. Cell proliferation on BCP particles (BCP) or glass beads (GB) evaluated after 2, 4, 7, 14 and 21 days of culture in proliferation or osteogenic medium by alamar blue assay (upper graph). Cell morphology and proliferation observed on BCP particles (a, b) or GB (c, d) after 1 (a, c) or 7 days (b, d) by LIVE/DEAD® cell viability assays. Scale bars are 200 μ m.

Fig. 3. Real-time RT-PCR analysis of mRNA expression of osteoblastic markers (*Runx2*, *BMP-2*, *Coll*, *BSP*, *OCN*) in cells seeded on BCP particles, glass beads (GB) or plastic in proliferation medium (left graphs) or osteogenic medium (right graphs) at different times (1, 7, 14, 21 days). Graphs from 1 donor are representative of independent experiments performed with cells from 3 donors.

Fig. 4. Immunohistological staining of BMP-2, Coll, BSP and OCN on BCP particles (B) or glass beads (GB) in proliferation medium or on plastic dishes in proliferation and osteogenic medium after 10 days of culture. B is BCP and G is glass beads. Arrows indicate positive staining. Scale bars are 300 μ m.

Fig. 5. Histological staining of hMSC-BCP particle (A) or -GB (C) construct explanted after 8 weeks of subcutaneous implantation in nude mice. High magnification shows formation of bone bridges with BCP particles and fibrous tissue (FT) with glass beads (right

panel). (B) BSEM image showing mature mineralized bone in hMSC-BCP particles. Arrows indicate osteocyte lacunae.

Fig. 6. Quantification of bone formation of hMSC-BCP particles, hMSC-GB or BCP-disc constructs implanted in mice. These constructs were cultured for 7 days in proliferation or osteogenic medium before implantation. * P < 0.05.

Supplemental figure captions

Supplementary fig. 1. SEM pictures of hMSC-GB construct (A, B) or -BCP-particle construct (C, D) in proliferation (A, C) or osteogenic medium (B, D). Energy dispersive x-ray analysis of crystals formed within the hMSC-BCP particle construct. Arrows indicate crystals.

Supplementary fig. 2. Immunohistological staining of BMP-2, ColI, BSP and OCN on BCP (B) particles or glass beads (G) in osteogenic medium after 10 days of culture. Arrows indicate positive staining. Scale bars are 300 μ m.

Prime r	Sequence (5'-3')	PCR product length
humain GAPDH Left Primer	agccacatcgctcagacac	66 nt
humain GAPDH Right Primer r	gcaccaatacgcaccaaatcc	
humain Runx2 LeftPrimer r	ggcccacaaatctcagatcgtt	
humain Runx2 Right Primer r	cactggcgctgcaacaagac	184 nt
humain BMP-2/LeftPrimer r	aggacactggggaaagcagcaa	
humain BMP-2/ Right Primer r	gtctttcaatggacgtgtccc	117 nt
humain Col1/ LeftPrimer r	acatggaccaggcagactggca	
humain Col1/ Right Primer r	tcactgtttttcccgact	153 nt
humain BSP/ LeftPrimer r	cgaatacacggggcgtcaatg	
humain BSP/ Right Primer r	gttagctgtactcattttaggg	109 nt
humain DCN/ Left Primer r	ggcgcttacctgtatcaatgg	
humain DCN/ Right Primer r	tcaggccaaactcgtcacagt c	106 nt

Table 1. Primer sequences for real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

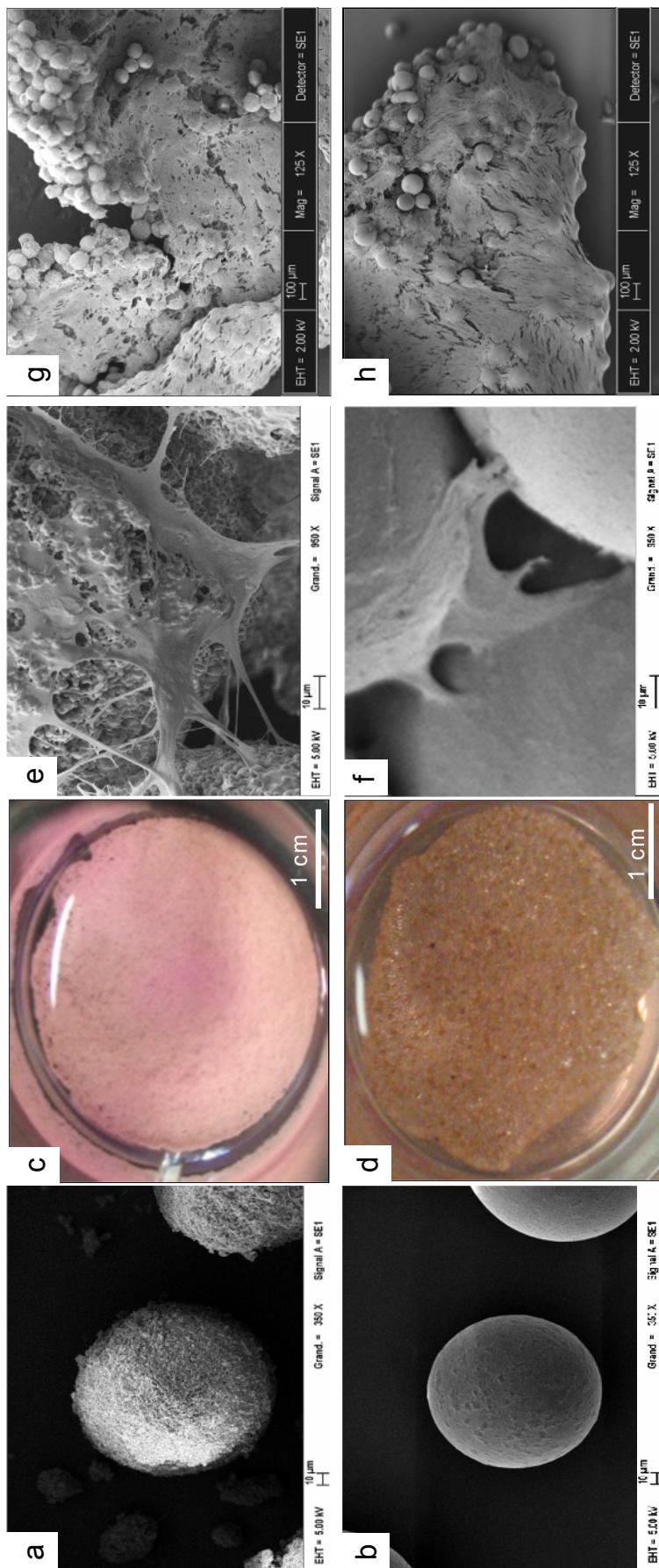


Fig 1. Formation of 3D structures from BCP particles (a, b, c, e, g) or glass beads (d, f, h). (a, b) SEM images of a particle bead with human mesenchymal stem cells (hMSCs) after 1 day of culture. (c, d) optical micrographs showing a 1 cm scale bar. (e, f) high magnification SEM images showing the attachment of cells onto the particles. (g, h) SEM images showing the formation of a porous, interconnected structure after 10 days of culture.

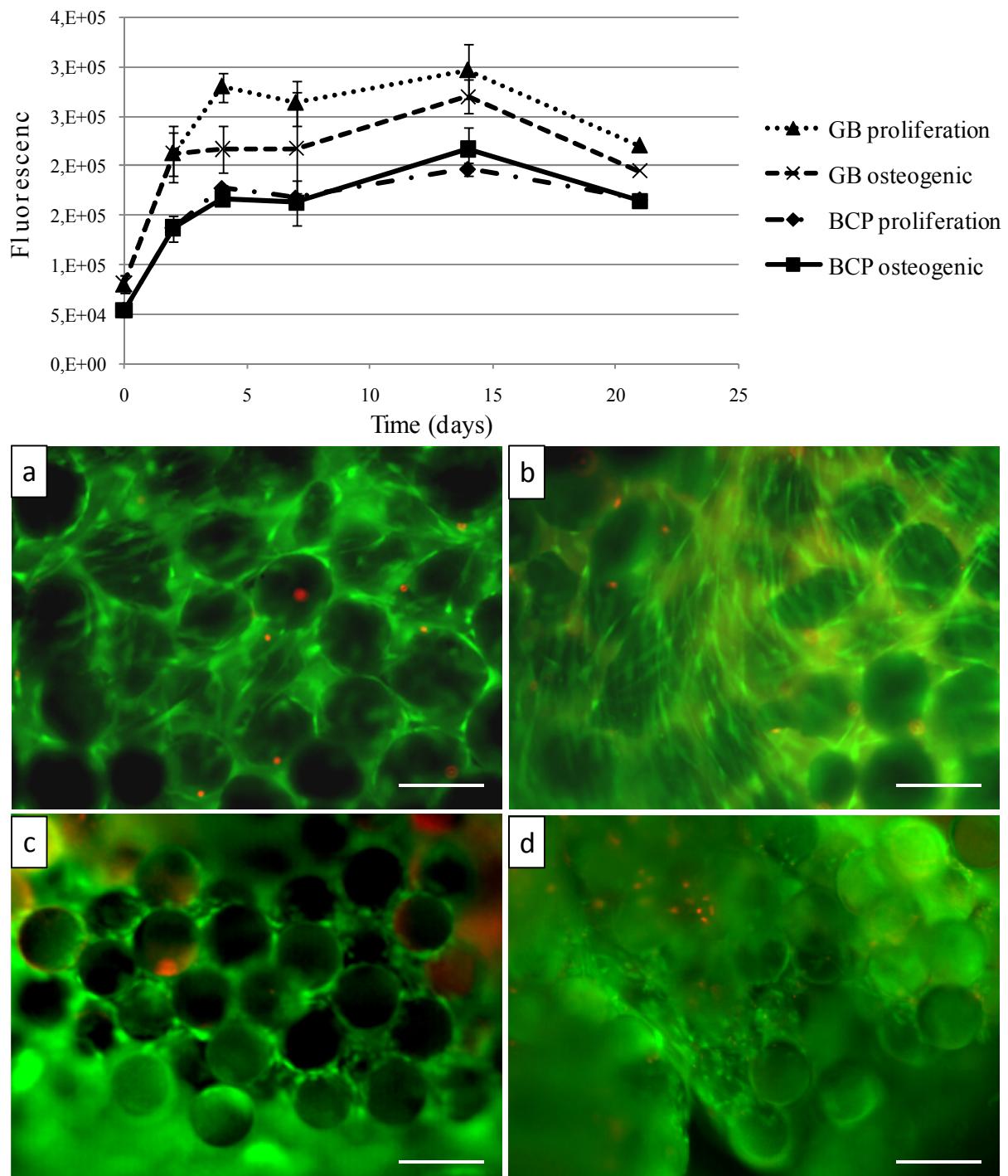


Fig. 2. Cell proliferation on BCP particles (BCP) or glass beads (GB) evaluated after 2, 4, 7, 14 and 21 days of culture in proliferation or osteogenic medium by alamar blue assay (upper graph). Cell morphology and proliferation observed on BCP particles (a, b) or GB (c, d) after 1 (a, c) or 7 days (b, d) by LIVE/DEAD® cell viability assays. Scale bars are 200 μ m.

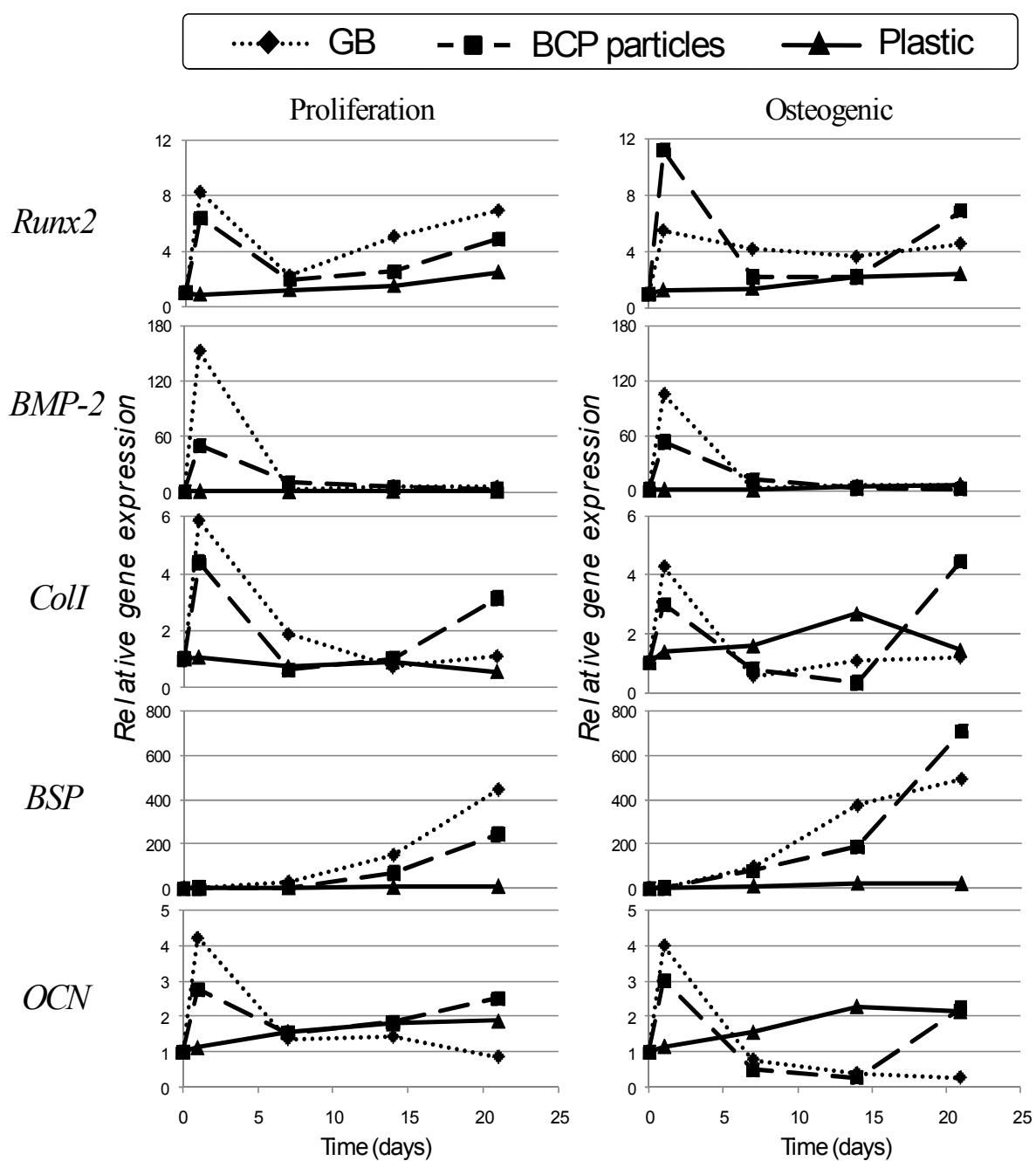


Fig. 3. Real-time RT-PCR analysis of mRNA expression of osteoblastic markers (*Runx2*, *BMP-2*, *Coll*, *BSP*, *OCN*) in cells seeded on BCP particles, glass beads (GB) or plastic in proliferation medium (left graphs) or osteogenic medium (right graphs) at different times (1, 7, 14, 21 days). Graphs from 1 donor are representative of independent experiments performed with cells from 3 donors.

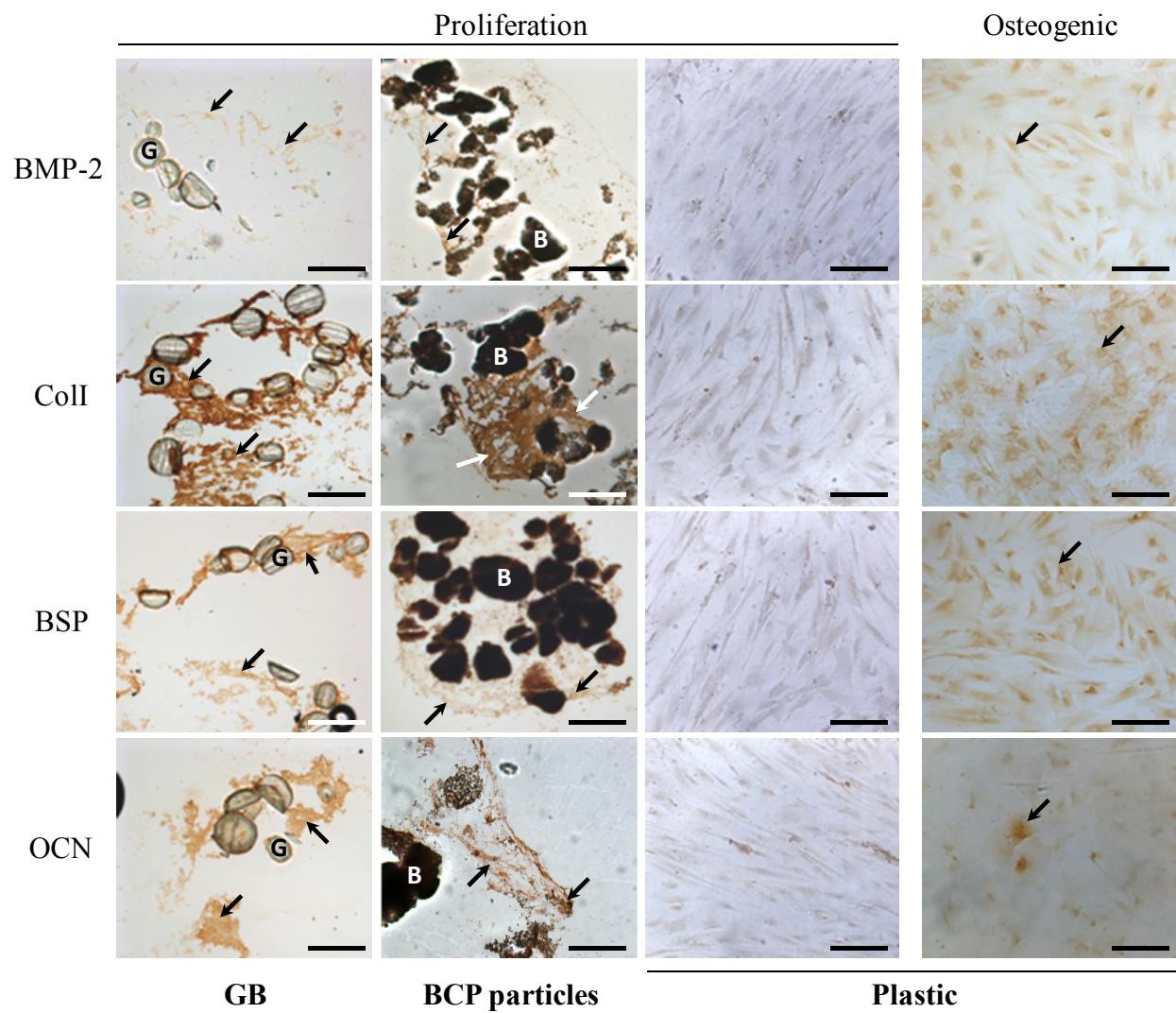


Fig. 4. Immunohistological staining of BMP-2, Coll, BSP and OCN on BCP particles (B) or glass beads (GB) in proliferation medium or on plastic dishes in proliferation and osteogenic medium after 10 days of culture. B is BCP and G is glass beads. Arrows indicate positive staining. Scale bars are 300 μ m.

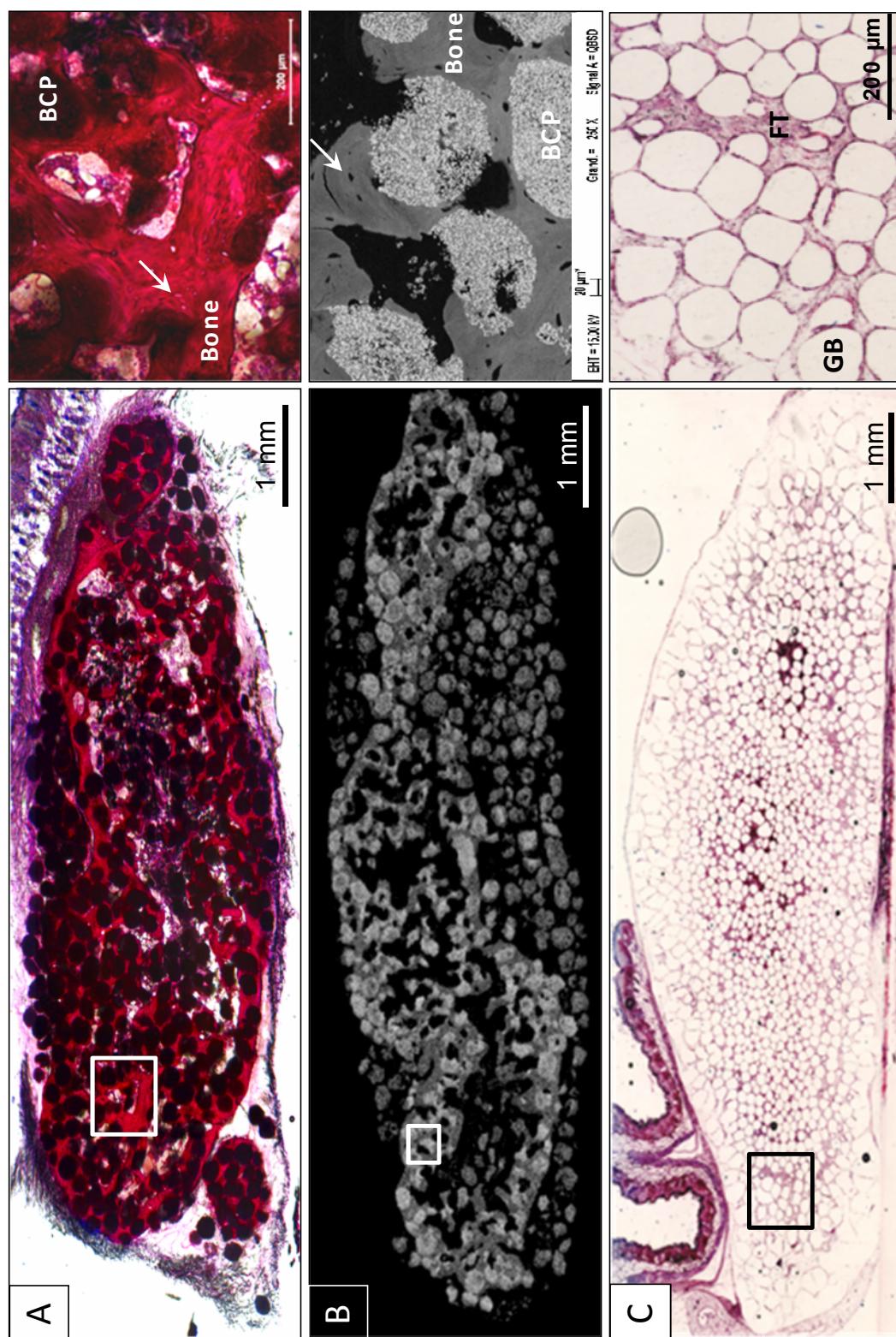


Fig 5. Histological staining of hMSC-BCP particle (A) or -GB (C) constructs explanted after 8 weeks of subcutaneous implantation in nude mice. (B) SEM image shows formation of bone bridges with BCP particles and fibrous tissue (FT) with glass beads (right panel). (B) BSEM image shows formation of bone tissue in hMSC-BCP particles. Arrows in A and C indicate BCP particles.

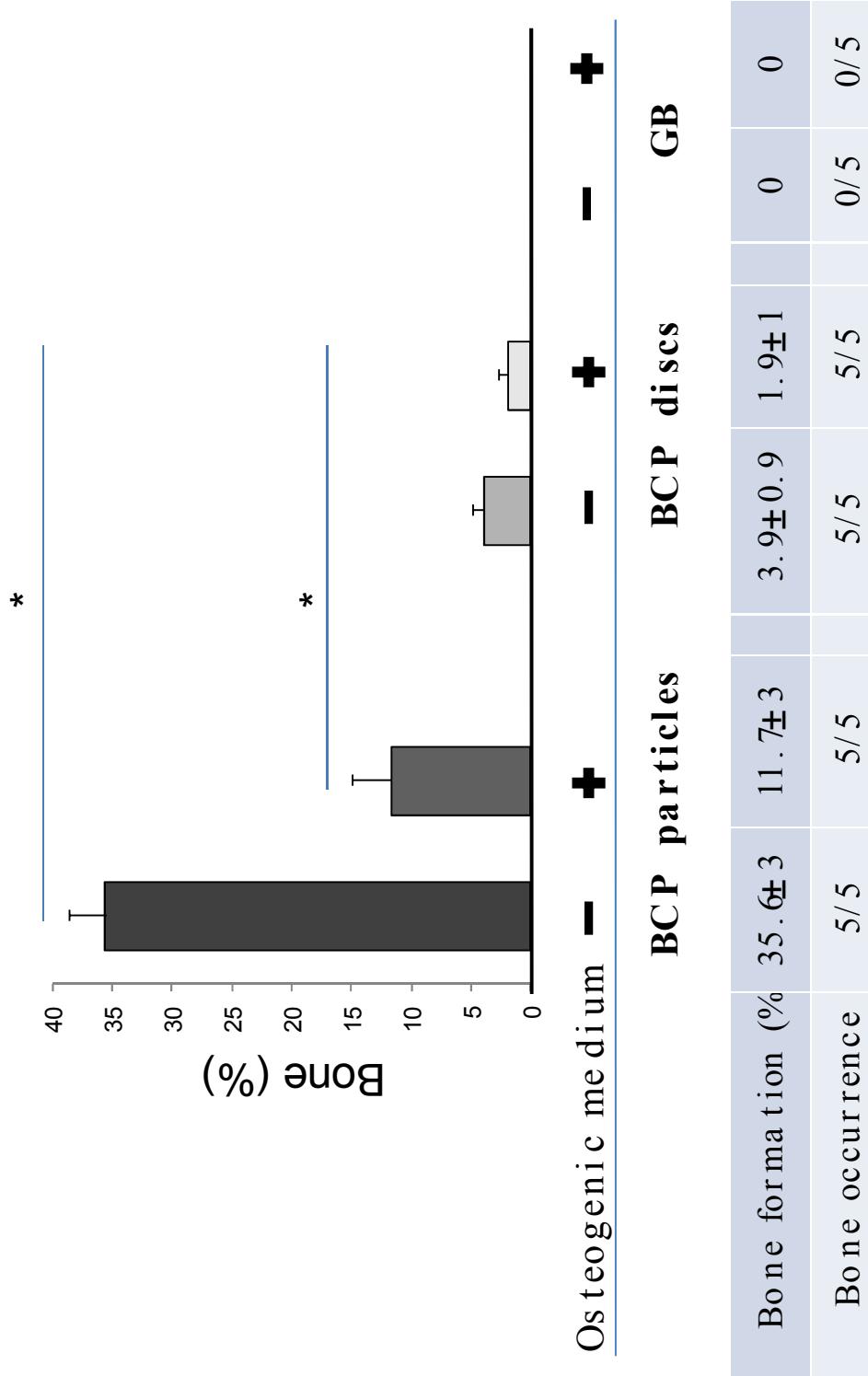
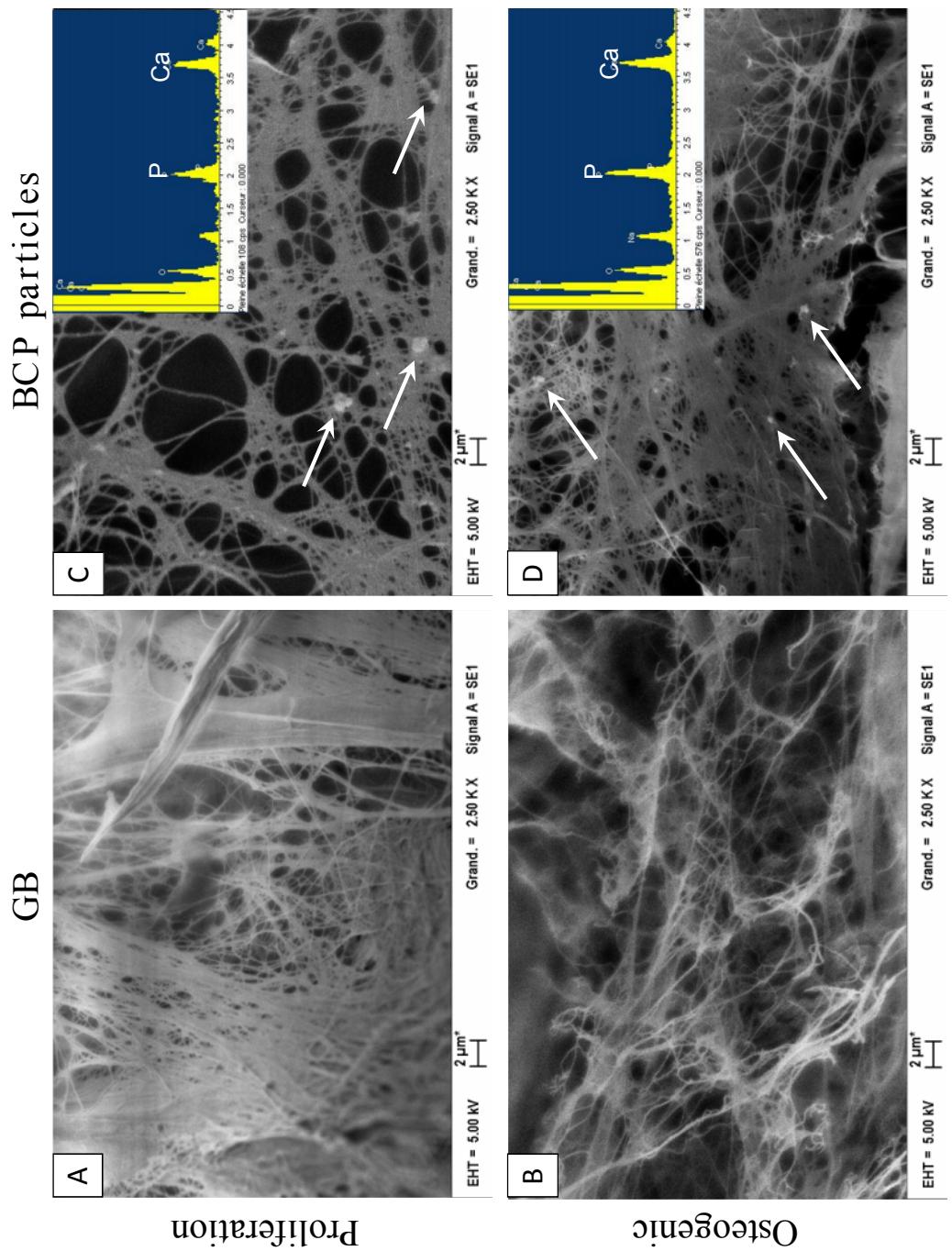
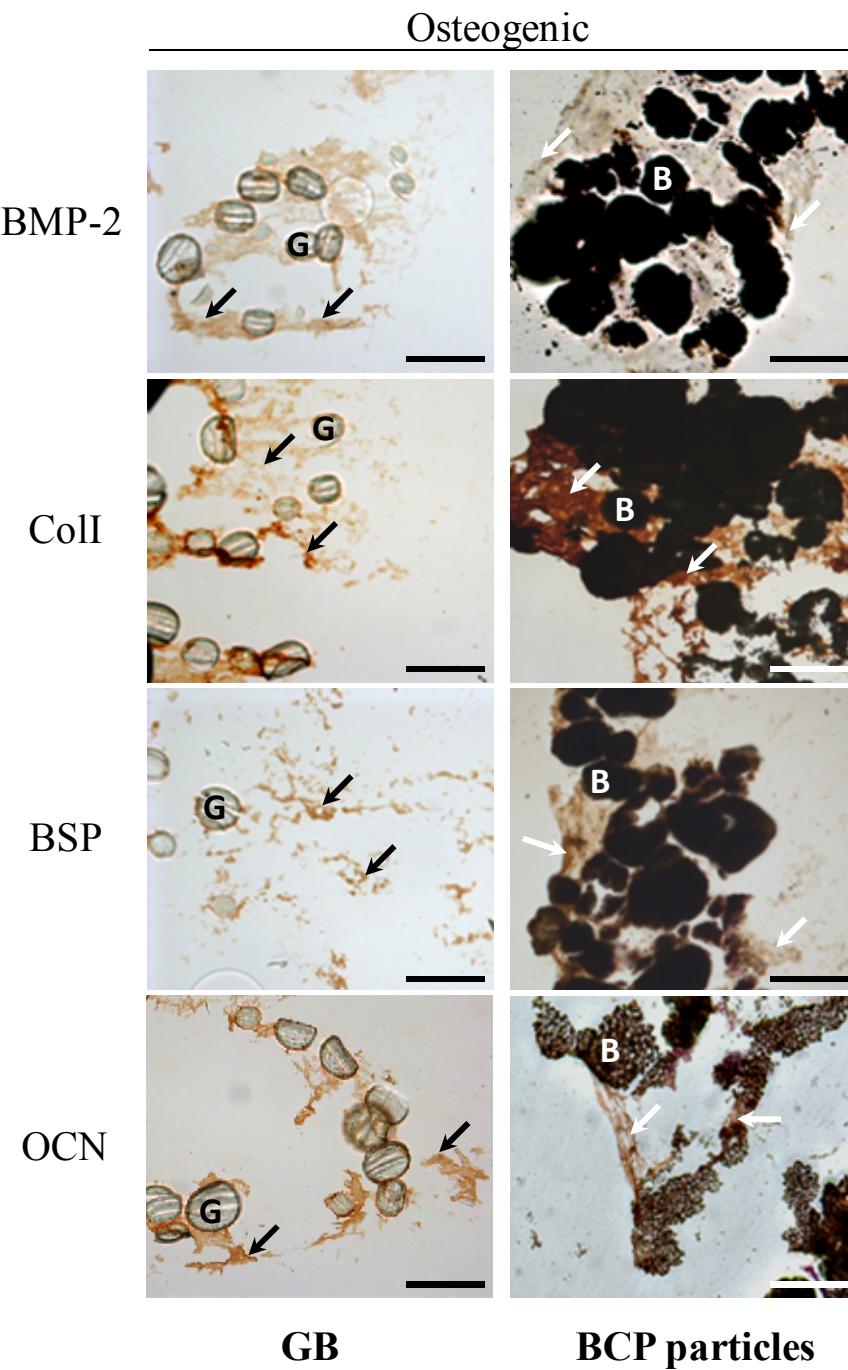


Fig 6. Quantification of bone formation of hMS GBCP particles GGB or BCP.
di sc construct∓ lant en mi ce These reconstruct were cultured for 7 days in
proliferation osteogenic di culture for 3 days. $P < 0.05$.



Supplément fig. 1. SEM pictures of hMSCs G-GB construct (A, B) or -BCP-particle construct (C, D) in proliferation (A, C) or osteogenic medium (B, D). Energy-dispersive X-ray analysis of crystal formed with the hMSCs G-BCP particles construct at various times.



Supplementary fig. 2. Immunohistological staining of BMP-2, Coll, BSP and OCN on BCP (B) particles or glass beads (G) in osteogenic medium after 10 days of culture. Arrows indicate positive staining. Scale bars are 300 μ m.

Appendice au chapitre 5

Introduction

Les études réalisées dans le chapitre 4 ont montré l'effet bénéfique d'un milieu de culture contenant un faible taux de sérum et supplémenté avec de la BMP4 sur la différenciation des CSM *in vitro* et la formation osseuse *in vivo*. Cette condition de culture favorable à la différenciation ostéoblastique pourrait permettre de potentialiser l'approche biomimétique développée dans le chapitre 5. Nous avons donc évalué l'association de ces deux méthodes dans le modèle de formation osseuse sous-cutanée utilisé précédemment.

Matériel & méthodes

La majorité des conditions expérimentales utilisées lors de cette étude étaient identiques à celles du chapitre 5. Les méthodes variant sont exposées ci-après. Après ensemencement des cellules sur les particules de BCP (140-200 µm, 40 mg, 400 000 cellules), différents milieux de culture spécifiques ont été utilisés : milieu de prolifération (10 % SVF), milieu ostéogénique Dex (10 % SVF + Dex 10^{-7} M + β -gly + a.a.) ou milieu BMP4 (2 % SVF + BMP4 50 ng/ml). Après 7 jours de culture, les hybrides cellules/particules de BCP (n=5) ont été implantés en sous-cutanée chez la souris immunodéprimée pendant 8 semaines.

Résultats

Toutes les conditions de culture avant implantation ont abouti à une formation osseuse (figure 1). Les hybrides cultivés en milieu ostéogénique (Dex ou BMP4) ont conduit à une formation osseuse limitée à la périphérie des implants. La quantité d'os néoformé était de respectivement 10 et 14 % du volume disponible pour le milieu ostéogénique contenant de la Dex ou de la BMP4. À l'inverse, les hybrides cultivés dans un milieu de prolifération ont présenté une formation osseuse plus homogène, observable jusqu'au centre de l'implant, et plus importante (35 % du volume disponible).

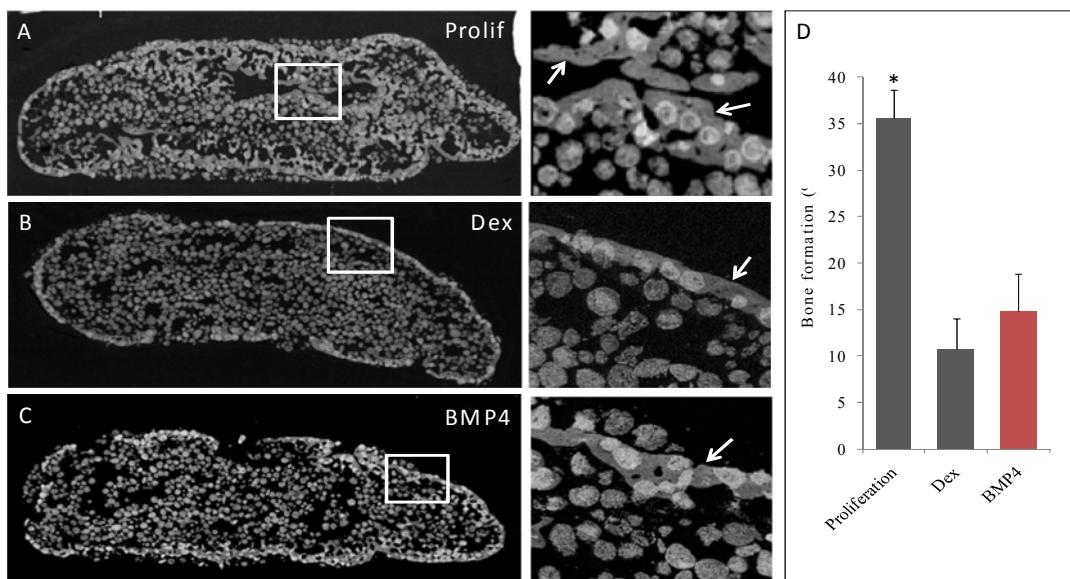


Fig 1 : Images MEB d'échantillons cultivés 7 jours en milieu de prolifération (A) ou dans un milieu ostéogénique supplémenté avec de la Dex (B) ou de la BMP4 (C) après 8 semaines d'implantation en sous-cutanée chez la souris nude. Les flèches indiquent les zones de néo-formation osseuse. L'histogramme représente la quantification de l'os néoformé (D). * p < 0,05

Discussion

Les travaux présentés dans le chapitre 4 ont montré que la BMP4 était un milieu ostéogénique efficace pour l'obtention d'ostéoblastes matures et fonctionnels. De façon surprenante, dans les conditions de cultures biomimétiques développées dans le chapitre 5, nos résultats montrent que le milieu le plus favorable à la formation osseuse est le milieu de prolifération cellulaire. Néanmoins, malgré l'absence de différence significative, le milieu supplémenté en BMP4 semble être plus efficace pour la formation osseuse que le milieu ostéogénique classique contenant de la Dex. Ces résultats corroborent ceux présentés dans le chapitre 4, et suggèrent que le milieu BMP4 permet une meilleure différenciation des CSM en ostéoblastes matures et fonctionnels que le milieu classiquement utilisé. Cependant, comme évoqué dans le chapitre 4, le milieu BMP4 limite la prolifération cellulaire et donc le nombre d'ostéoblastes induit. Ceci pourrait expliquer la moindre formation osseuse en comparaison de celle induite par le milieu de prolifération. Il semble plus judicieux d'implanter un grand nombre de cellules engagées dans une moindre différenciation ostéoblastique par l'environnement 3D qu'un plus faible nombre d'ostéoblastes matures induit par le milieu BMP4. Toutefois, l'utilisation du milieu supplémenté en BMP4 pourrait s'avérer intéressante après une période de prolifération cellulaire importante dans les hybrides. Une courte période de stimulation *in vitro* avec le milieu BMP4 avant implantation pourrait induire rapidement un grand nombre de cellules en ostéoblastes matures et ainsi améliorer la formation osseuse.

Discussion

L'ingénierie tissulaire osseuse utilise couramment, des matériaux en céramique pour procurer une matrice servant de support pour la colonisation cellulaire et l'organisation tissulaire. Si les céramiques sont très proches de la structure minérale de l'os naturel, l'architecture des céramiques macroporeuses est très éloignée de celle de l'os, notamment à l'échelle de la cellule. Comparées à la matrice tridimensionnelle (3D) produite par les cellules, à l'échelle cellulaire, les céramiques macroporeuses n'offrent qu'une surface presque plane. Malgré tout, de nombreuses études ont pu démontrer que ces céramiques macroporeuses présentaient un intérêt pour l'ITO [344-346] et que ces matériaux pouvaient être associés à des CSM possédant des capacités de prolifération et de différenciation [347-351]. Afin d'induire une formation osseuse à l'aide de cette association, une action du milieu de culture sur la différenciation ostéoblastique des CSM a été recherchée [145, 352-354]. Pour cela des milieux contenant des hormones ou des facteurs de croissance (ou une combinaison des deux) sont très souvent utilisés pour la culture des CSM isolées ou sur des biomatériaux. Par contre, l'effet de la disposition spatiale en 3D du microenvironnement sur la différenciation des CSM a été moins étudié. Pour recréer un environnement 3D basé sur des céramiques biphasées de phosphate de calcium (BCP), des particules de BCP denses et ovoïdes de diamètre compris entre 140 et 200 μm ont été associés à des CSM. L'hypothèse de départ était que les cellules pourraient adhérer sur la surface des particules et les lier entre elles lors de leur prolifération, puis synthétiser de la matrice extracellulaire (MEC), produisant ainsi une structure tridimensionnelle basée sur une MEC naturelle. Les premiers travaux réalisés ont pu mettre en évidence que les CSM associées à des particules de BCP dans un ratio spécifique provoquaient une agrégation immédiate de ces particules due à leur taille et aux interactions intercellulaires. Rapidement, une structure 3D solide et épaisse est formée. Nos expériences de quantification de la prolifération au bleu d'Alamar ont confirmé que presque toutes les cellules adhéraient sur les particules de BCP après quelques heures. De plus, les images réalisées en microscopie électronique à balayage ont pu montrer qu'une même cellule adhérente pouvait se lier à plusieurs particules de BCP ou encore se lier à d'autres cellules pour agglomérer ces matériaux. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui a pu démontrer que les ostéoblastes étaient capables de faire le lien entre des microsphères éloignées de plus de 100 μm [355]. Après quelques jours, les cellules ont pu synthétiser une abondante MEC autour et entre les particules de BCP formant une structure 3D encore plus dense et rigide. Ensuite, la même expérience effectuée avec des billes de

verres de taille et forme identiques aux particules de BCP, mais ne présentant pas de microporosité de surface, a montré que la capacité des cellules à proliférer et à produire une MEC abondante était indépendante de la composition du substrat. Ces données ont permis de souligner le fait que les matériaux macroporeux pouvaient être remplacés par une monocouche de granules de 140 à 200 µm susceptibles de favoriser la prolifération cellulaire et de servir de matrice initiale pour faciliter la création d'un environnement 3D produit par les cellules elles-mêmes. Les matériaux macroporeux classiques possèdent une porosité interne c'est-à-dire des pores à l'intérieur d'un substrat fixe. Dans le cas des particules, nous procurons une porosité inversée car la porosité est représentée par l'espace entre les particules ou les billes, ce qui représente un espace très important pour la prolifération cellulaire que les cellules peuvent moduler via les tractions qu'elles exercent en se liant à plusieurs particules. Nous avons pu montrer que la prolifération des cellules dans cet environnement 3D procuré par les particules de BCP ou les billes de verre durait pendant plusieurs jours indépendamment du milieu de culture. Cette prolifération diminue ensuite en suivant le même profil pour les cellules cultivées dans un environnement 3D qu'elles soient en milieu de prolifération ou de différenciation ostéogénique classique (Dex). Cette diminution de prolifération pourrait provenir de l'environnement 3D, de l'enchevêtrement cellulaire dans la MEC et de la forte densité et interactions cellulaires qui induiraient un engagement des cellules vers la lignée ostéoblastique.

Afin de confirmer que l'environnement 3D synthétisé par les cellules était capable d'induire la différenciation des CSM et pour évaluer l'état de différenciation des cellules, différentes expériences *in vitro* ont été menées. L'analyse de l'expression génique par PCR en temps réel nous a permis d'obtenir une vue d'ensemble de l'état de différenciation ostéoblastique des CSM. L'étude de marqueurs précoces comme *Runx2* ou la *BMP-2* a permis de montrer qu'en milieu de prolifération, les cellules dans cet environnement 3D étaient induites vers la voie de différenciation ostéoblastique dès le premier jour de culture. Ces facteurs précoces ont un rôle clef dans l'engagement des CSM vers le phénotype ostéoblastique et leur synthèse protéique est indispensable au bon déroulement de la différenciation. L'étude des protéines par immunohistochimie a pu mettre en évidence que les protéines *Runx2* et *BMP-2* étaient effectivement synthétisées par les cellules cultivées dans un environnement 3D sans ajouts de facteurs ostéogéniques extérieurs. Comme nous avons pu le décrire lors du chapitre 1, ces deux protéines jouent un rôle majeur dans le processus de différenciation et de maturation des ostéoblastes. En effet, la *BMP-2* va pouvoir activer les

voies Smads qui agissent sur l'expression de gènes ostéoblastiques, via Runx2 au stade précoce de la différenciation, puis via Ostérix à un stade plus tardif, entraînant la synthèse de protéines ostéoblastiques telles que l'ALPL, le Collagène I, la BSP et l'OCN [172, 173, 356]. Nos travaux ont pu mettre en évidence l'expression du gène de l'*ALPL* mais également son expression protéique lorsque les cellules se trouvent dans un environnement 3D, contrairement aux cellules cultivées en 2D qui ne peuvent exprimer cette protéine qu'en présence de facteurs ostéogéniques extérieurs. L'étude de gènes plus tardifs (*Collagène I*, *BSP* et *OCN*) a confirmé leur expression quelque soit l'environnement 3D (particules de BCP ou billes de verre) et cela de façon spontanée, sans facteurs ostéogéniques. L'analyse protéique de ces marqueurs tardifs a pu mettre en évidence que l'environnement 3D synthétisé par les cellules, et non la composition du substrat, induisait une différenciation spontanée des CSM en ostéoblastes. Il est très probable que le contact cellules/cellules observé dans cet environnement 3D joue un rôle dans la différenciation spontanée des CSM. En effet, nos conditions de culture augmentent le nombre d'interactions comparativement à la culture 2D classique et il est connu qu'un grand nombre d'interactions cellulaire favorise la différenciation ostéoblastique des CSM [357, 358].

Cette différenciation spontanée vers les ostéoblastes peut également être expliquée par le fait que les CSM sont naturellement orientées vers un phénotype ostéogénique et que cette méthode de culture leur procure un environnement plus naturel. En effet la formation d'une MEC abondante peut favoriser la prolifération ainsi que la différenciation [359-361]. Il a été démontré que des cellules extraites de leur environnement 3D naturel présentaient un comportement inhabituel et que leur métabolisme ainsi que leur profil d'expression génique étaient altérés [362]. En plus de cela, de récentes études ont mis en évidence l'importance de l'utilisation d'un environnement 3D approprié mimant les processus qui surviennent naturellement [363, 364]. Lors de ces travaux il a été démontré que la viabilité ainsi que les fonctions des cellules étaient améliorées grâce à leur attachement à de larges protéines comme le collagène, la laminine et la fibronectine. Ces différentes études ont pu prouver que le microenvironnement 3D synthétisé par les cellules jouait un rôle central dans la différenciation ostéoblastique des CSM et dans la formation osseuse. Les cellules encastrées dans cette MEC ressentent les forces mécaniques au travers des interactions entre les intégrines qu'elles expriment à leur surface et les sites de liaisons de la MEC. Ces éléments de liaisons sont essentiels à la migration et aux fonctions cellulaires mais permettent aussi le clivage de la MEC et la déposition de nouveaux éléments matriciels. Howe et ses

collaborateurs ont démontré que le processus de liaison via les intégrines était essentiel pour l'adhésion cellulaire et dans la plupart des processus cellulaires [365]. Une autre étude a montré que la MEC synthétisée par les CSM pouvait faciliter l'expansion des cellules progénitrices et contenir leur différenciation ostéoblastique [366]. Peu après, des travaux ont démontré l'importance d'une MEC dense pour procurer un environnement naturel propice à la différenciation ostéoblastique [367, 368]. Durant cette étude, les auteurs soulignent l'importance des interactions cellules/cellules via les jonctions gap, résultant de la densité cellulaire, qui inhiberaient la prolifération et induiraient la différenciation ostéoblastique à de fortes densités cellulaires. L'ensemble de ces études renforce l'idée que la culture en 3D des CSM permet de reproduire les évènements survenant naturellement *in situ*. En d'autres termes, les CSM de par leur environnement et leurs interactions vont se retrouver dans une conformation 3D qui va les pousser à synthétiser une MEC abondante. Cette abondante matrice, principalement formée de collagène, va leur permettre de considérablement proliférer tout en continuant à synthétiser de la MEC jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine confluence. A forte confluence cellulaire et forte densité matricielle, les cellules vont stopper leur prolifération et s'engager dans un processus de différenciation ostéoblastique afin de préparer la minéralisation de cette MEC.

En plus de cet état de différenciation cellulaire *in vitro*, la capacité de ces hybrides 3D basés sur les particules de BCP à supporter la formation osseuse a été évaluée *in vivo*. De façon très intéressante, ces hybrides cellules/particules de BCP cultivés dans un milieu de prolifération et implantés en sous-cutanée chez la souris nude ont abouti à la formation d'une quantité élevée d'os mature (35 % du volume disponible). Nous avons également noté la présence de nombreux ostéocytes et de ponts osseux entre les particules, rappelant la structure d'un os trabéculaire mature. Nous avons également étudié le potentiel de ces hybrides 3D cellules/particules de BCP cultivés dans le milieu BMP4 développé dans le chapitre 4. Étonnamment cette association a abouti à une quantité d'os formé plus faible qu'en présence du milieu de prolifération, ce qui pourrait être expliqué par le fait que ce milieu induit une différenciation rapide et terminale des CSM en ostéoblastes et donc limite la prolifération cellulaire. Ceci suggère l'importance d'une phase de prolifération avant d'induire la différenciation cellulaire.

De façon surprenante, les structures 3D comprenant des billes de verres et induisant *in vitro* la même différenciation ostéoblastique spontanée que les particules de BCP, ne permettent pas de formation osseuse *in vivo*. Ces résultats tendent, contrairement aux résultats

in vitro, à souligner le rôle crucial des propriétés intrinsèques des céramiques de BCP pour la formation osseuse. Afin de clarifier ces conclusions apparemment opposées, des disques macroporeux, aux propriétés et compositions identiques aux particules ont été implantés dans le même modèle murin. Ces disques, utilisés lors des travaux exposés dans le chapitre 4, sont couramment employés en ingénierie osseuse [255, 369]. Leur formulation ne permet pas la synthèse par les cellules d'une MEC abondante et donc la formation d'un environnement 3D mais aboutit plutôt à la formation d'une monocouche cellulaire à leur surface [278, 370]. Après implantation, une formation osseuse très limitée est obtenue, restreinte à la périphérie des disques. Ces résultats, en accord avec la littérature [249, 371], et ceux obtenus dans le chapitre 4, confirment que les propriétés de la céramique sont indispensables pour la formation osseuse, aussi faible soit elle.

Les céramiques de BCP sont connues pour être bioactives du fait de leur balance entre la phase stable d'HA et la phase plus soluble qu'est le β -TCP [372-375], plus particulièrement à un ratio de respectivement 20 et 80 % en volume [255]. Cette composition permet aux BCP d'être solubles et d'être graduellement dégradés dans le corps tout en libérant des ions phosphates et calcium dans l'environnement proche [307, 308, 376, 377]. Cette libération associée avec une microporosité de surface importante des particules de BCP peut augmenter les phénomènes de dissolution/précipitation de phosphate de calcium se produisant à la surface. De plus, ce phénomène peut être couplé à une co-précipitation [378, 379] ou une adsorption [380, 381] de protéines d'intérêts telles que les BMPs qui peuvent favoriser la formation osseuse *in vivo* [382]. En outre, la libération d'ions permet la formation de microcristaux d'apatite [383]. Durant la formation osseuse, après la déposition de MEC, les ostéoblastes matures transfèrent le calcium extracellulaire aux sites de nucléation situés sur les fibres de collagène, ce qui aboutit à la formation de cristaux et à la minéralisation de la matrice. Il a été montré que les protéines de la matrice telles que le Coll et la BCP possédaient des sites de liaisons au calcium et que l'OCN pouvait favoriser la liaison du calcium [384]. Par conséquent, la libération d'ions calcium par les particules de BCP dans un environnement 3D synthétisé par les cellules peut expliquer l'importante quantité de tissu osseux obtenue *in vivo*. La libération d'ions associée à la présence d'une MEC abondante avant l'implantation ainsi que l'expression de protéines clefs pourraient favoriser la rapide minéralisation de la MEC après implantation et l'abondante formation osseuse qui en découle. Les disques macroporeux ne permettent pas la synthèse d'une MEC abondante et aboutissent à la formation d'un tissu osseux en très faible quantité, principalement aux endroits où les cellules

ont été ensemencées, au niveau des pores périphériques. Pour les billes de verre, l'absence de libération d'ions pourrait entraver cette minéralisation et donc empêcher la formation osseuse. Cette hypothèse est soutenue par la présence de cristaux d'apatite dans la MEC des hybrides cellules/particules de BCP après 21 jours de culture *in vitro*, contrairement aux hybrides basés sur les billes de verre qui en sont dépourvus. Les particules de BCP, du fait de leur composition, en association avec un environnement 3D synthétisé par les cellules permettent l'obtention d'une structure, combinant phase minérale et organique, propice à une abondante formation osseuse en site ectopique.

En conclusion, nos données montrent que l'élément indispensable pour obtenir une formation osseuse abondante à partir de CSM *in vivo* est la présence de granules de petite taille (140 à 200 μm) ayant les propriétés physico-chimiques des BCP. Ce substrat bien spécifique permet aux CSM ensemencées sur ces granules de synthétiser leur propre environnement 3D qui pourra ensuite se minéraliser.

Discussion générale

Depuis quelques décennies, de nombreuses expériences et expérimentations animales d'ingénierie tissulaire osseuse ont été menées par divers laboratoires dans le monde. Ces études ont apporté leur part de résultats attrayants, mais ont également démontré l'absence de reproductibilité inter-espèces et n'ont pas permis d'aboutir à des essais pertinents chez l'homme. La compréhension globale des phénomènes impliqués lors de l'association de matériaux avec des cellules reste imprécise et soulève de nombreuses interrogations. Les différentes branches de l'ingénierie tissulaire osseuse tentent donc d'améliorer les méthodes actuelles en essayant de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la régénération osseuse.

Tout au long de cette thèse, nous avons étudié les associations entre cellules et biomatériaux ainsi que le rôle du micro-environnement cellulaire dans la régénération osseuse. Pour ce faire, nous avons d'abord évalué l'ITO classiquement utilisée pour aboutir au développement de nouvelles méthodes prometteuses pour le traitement des pertes de substances osseuses.

La première étude de cette thèse, décrite dans le chapitre 3, a permis de tester notre biomatériaux (granules de BCP) *in vivo* en présence de CSM autologues au niveau d'un site orthotopique. Par la réalisation d'une étude très proche de la réalité clinique, nous avons pu mettre en évidence certaines des limites de l'ITO actuelle et en définir les points susceptibles d'être améliorés. Les résultats de cette étude ont montré une formation osseuse au contact du biomatériaux avec une persistance du matériau après 12 semaines et une corticalisation incomplète. Des études à plus long terme pourraient montrer si la lente résorption de ce matériau peut être corrélée à une formation osseuse plus importante et ainsi qu'à une corticalisation plus nette de l'os néo-formé liée aux contraintes provoquées par l'appui. Une des limites majeures de cette étude a été la courte durée d'association du matériau avec une suspension cellulaire qui n'a par ailleurs pas pu être retenu par la membrane fibrovasculaire induite par la technique de Masquelet du fait de sa trop faible viscosité. Il est donc plausible que le nombre de cellules associées ait été trop faible pour mettre en évidence un effet bénéfique, pourtant probable, au niveau de la formation osseuse. On peut se demander s'il est possible de se passer du premier temps opératoire d'induction de la membrane. Il serait donc intéressant de réaliser le comblement de la perte de substance en un seul temps en associant les granules de BCP et les cellules au sein d'un hydrogel ; ce qui permettrait de contenir les cellules au niveau du défaut osseux et de leur permettre d'adhérer au biomatériaux *in situ*. Ceci permettrait de résoudre le problème du comblement en un seul temps opératoire au lieu de

deux. Il faudrait uniquement prévoir dans les semaines précédant cette intervention le prélèvement de moelle pour permettre la culture de CSM. Ce geste est simple et se fait par voie percutanée sous anesthésie légère. Une autre possibilité pour améliorer l'adhésion cellulaire sur le biomatériau serait de réaliser une période de culture *in vitro* préimplantatoire.

Ces résultats soulignent les limites de l'ITO actuelle et la difficulté de trouver la balance entre des procédures cliniques optimales et une association CSM/matiériaux appropriée à l'obtention de résultats satisfaisants par l'ingénierie tissulaire. La différenciation des CSM en ostéoblastes ainsi que l'adhésion cellulaire semblent donc être des facteurs cruciaux que nous avons voulu étudier et améliorer lors des études suivantes.

A des fins cliniques, les protocoles de culture doivent être bien définis avec des délais de production courts et impliquer un fort potentiel régénératif des cellules. Le milieu de culture développé dans le chapitre 4 nous a permis, en réduisant le taux de sérum et en substituant la Dex par la BMP4, d'induire simultanément une différenciation rapide et terminale des CSM en ostéoblastes fonctionnels. Cette approche alternative a fourni des résultats cohérents entre la différenciation ostéoblastique *in vitro* et une formation osseuse efficace *in vivo*. Cette cohérence est indispensable pour approuver des protocoles d'études à usage clinique. Cependant, la formation osseuse obtenue, bien que dans un site sous-cutané peu favorable, reste très limitée. Malgré l'induction ostéoblastique terminale induite par le milieu modifié, le nombre d'ostéoblastes matures résultant semble être faible, ce qui pourrait expliquer la formation osseuse limitée. Ceci implique la nécessité d'obtenir un nombre important de cellules avant d'induire leur différenciation. Une culture dynamique permettant la perfusion de milieu de culture dans le disque macroporeux pourrait stimuler la prolifération cellulaire et améliorer la faible colonisation du biomatériau et sans doute la formation osseuse. Par ailleurs, les disques de BCP utilisés pour ces expériences ne sont peut-être pas les plus adapté pour offrir un support adéquat aux cellules. Nous nous sommes donc intéressés dans le chapitre suivant à la granulométrie du matériau utilisé et avons recherché un substrat qui permettrait aux cellules de se retrouver dans un environnement plus proche de la situation physiologique lors de la régénération osseuse.

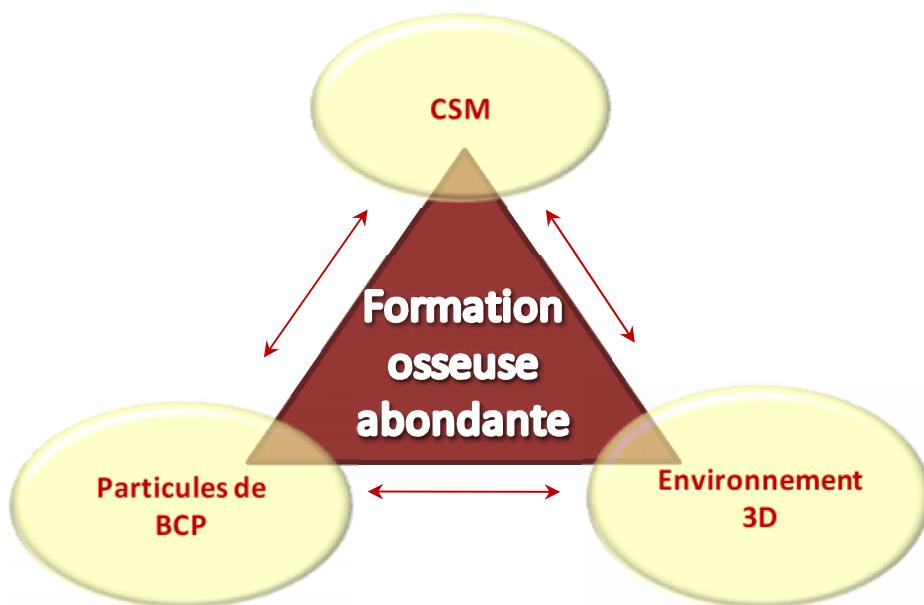
Le dernier chapitre de cette thèse a donc traité de la mise en place d'une méthode de culture procurant aux cellules un tel environnement. L'utilisation de petites particules de BCP, de par leur porosité inversée, offre aux cellules une orientation spatiale et un degré de liberté important qui amène les cellules à produire abondamment leur propre

microenvironnement. Cette matrice, composée principalement de collagène de type I est propice à leur prolifération puis à leur différenciation ostéoblastique dans un milieu de prolifération probablement du fait de la forte densité cellulaire et du nombre important de connexions intercellulaire. Cette méthode de culture permet donc d'obtenir un environnement naturel qu'il nous est impossible de reproduire artificiellement. Cette approche biomimétique reproduit les processus de formation osseuse survenant chez l'homme. En effet, c'est par la prolifération cellulaire, la synthèse d'une matrice abondante puis par le contact intercellulaire que va être produit l'os. L'importante formation osseuse observée *in vivo* avec cette approche en milieu de prolifération soutient l'idée qu'il est crucial d'obtenir une matrice abondante *in vitro* avant implantation. Néanmoins, cette matrice abondante n'est pas suffisante pour induire la synthèse de tissu osseux. L'utilisation d'un substrat composé de phosphate de calcium apparaît comme un paramètre indispensable à la formation osseuse, par la mise à disposition de composés minéraux pour les cellules ostéoformatrices. Des matériaux inertes comme les billes de verres enchâssés dans une matrice abondante sont en effet incapables de permettre la formation osseuse par impossibilité de libérer ces composants minéraux.

Les résultats obtenus dans le chapitre 4 concernant l'induction des CSM par la BMP4 et les résultats du chapitre 5 sur la prolifération cellulaire et la production d'une matrice abondante soulignent l'importance de la prolifération et de la différenciation ostéoblastique terminale des CSM pour l'ossification. Par ailleurs, ils représentent des solutions intéressantes pour améliorer les thérapies basées sur l'ingénierie tissulaire osseuse. Afin de profiter au mieux de ces deux approches, des CSM cultivées sur des petites particules de BCP pourraient être induites de façon tardive par le milieu contenant de la BMP4. En effet, une rapide différenciation ostéoblastique terminale des cellules pourrait être obtenue peu avant implantation et ainsi pourrait accélérer ou améliorer la formation osseuse après implantation.

Les travaux effectués lors de cette thèse soulignent certaines limites de l'ITO tout en offrant des solutions pour améliorer la transition vers des applications cliniques. Toutefois, en dehors des points étudiés ici, il sera important pour l'ITO d'apporter des réponses à d'autres questions. La nécessité de préincuber les biomatériaux phosphocalciques avant de les associer aux cellules doit, en pratique clinique, être la plus courte possible. Son rôle (élimination d'éventuels éléments toxiques, préparation des granules pour faciliter l'adhésion des cellules, *etc.*) et ses modalités (milieu utilisé, durée, *etc.*) doivent être précisés. Enfin pour le comblement de pertes osseuses importantes il est impératif de trouver un moyen permettant la

mise en place d'une néo-vascularisation de façon rapide et abondante après implantation afin d'éviter les risques de nécrose cellulaire par défaut de vascularisation.



Conclusion générale

L'ensemble de ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence les limites de l'ingénierie tissulaire osseuse actuelle et d'ouvrir de nouvelles voies. Le travail bibliographique effectué dans un premier temps ainsi que la première étude réalisée chez la brebis dans un site orthotopique proche du cas clinique nous a permis de définir les points susceptibles d'être améliorés dans le but de concevoir de nouveaux moyens pour le traitement des pertes osseuses.

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à la qualité de la différenciation ostéoblastique des cellules associées aux biomatériaux. Ceci nous a permis de développer un milieu de culture induisant de façon rapide et efficace la différenciation des CSM en ostéoblastes fonctionnels. L'utilisation de BMP4, qui contrairement à la dexaméthasone est un facteur ostéogénique physiologique, a permis d'améliorer significativement la différenciation ostéoblastique des CSM dans un milieu en faible teneur en sérum, par rapport à la dexaméthasone. Par ailleurs, ce milieu permet d'avoir une meilleure corrélation entre les caractéristiques cellulaires *in vitro* et la formation osseuse résultante *in vivo*. Cet aspect est particulièrement important pour la mise en place de validations cliniques de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Puis, nous nous sommes focalisés sur la structure des biomatériaux associés aux cellules et les interactions résultantes. Nous avons montré dans le dernier chapitre qu'un support cellulaire s'inspirant des mécanismes de formation et de réparation osseuse physiologique présentait de nombreux avantages. La méthode de culture biomimétique développée, basée sur des particules de céramiques induisant une synthèse abondante de matrice extracellulaire par les CSM, procure aux cellules un microenvironnement 3D propice à la différenciation et à une abondante formation osseuse. L'importante quantité d'os obtenue, le temps de culture *in vitro* court pour l'obtention d'hybrides CSM/particules de BCP ainsi que leur excellente maniabilité et plasticité ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies. Ces hybrides, de taille plus importante et associés à des facteurs solubles dans une chronologie bien précise ou encore avec d'autres types cellulaires pourraient aboutir à une rapide formation osseuse de qualité profitable à la régénération osseuse de défauts importants.

L'ingénierie tissulaire osseuse devra s'inspirer de ces études qui démontrent que des hybrides associant CSM et granules, mimant l'environnement 3D des cellules possèdent un potentiel plus important que la culture traditionnelle sur des matériaux macroporeux plus

proches de la 2D. La possibilité pour les cellules d'avoir accès à la 3D ainsi qu'un rapport cellules/matériaux élevé favorise l'uniformité de l'ensemencement, la prolifération cellulaire, la production de MEC, les interactions cellules/cellules et la différenciation cellulaire *in vitro*. Cela pourrait également permettre une meilleure diffusion des nutriments et de faciliter la vascularisation *in vivo*.

Références bibliographiques

1. Glimcher, M.J., *The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification*. Instr Course Lect, 1987. **36**: p. 49-69.
2. Hollinger, J. and M.E. Wong, *The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1996. **82**(6): p. 594-606.
3. Rho, J.Y., L. Kuhn-Spearing, and P. Ziopoulos, *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*. Med Eng Phys, 1998. **20**(2): p. 92-102.
4. Lee, N.K., et al., *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. Cell, 2007. **130**(3): p. 456-69.
5. Fulzele, K., et al., *Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition*. Cell, **142**(2): p. 309-19.
6. Tortora, G. and B. Derrickson, *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2007. 4ème ed.
7. Weiner, S., W. Traub, and H.D. Wagner, *Lamellar bone: structure-function relations*. J Struct Biol, 1999. **126**(3): p. 241-55.
8. Buckwalter, J.A., et al., *Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. Instr Course Lect, 1996. **45**: p. 371-86.
9. Buckwalter, J.A., et al., *Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function*. Instr Course Lect, 1996. **45**: p. 387-99.
10. Masson, E., *Imagerie musculosquelettique: Pathologies générales*. 2005: Anne Cotten. 795.
11. Sommerfeldt, D.W. and C.T. Rubin, *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton*. Eur Spine J, 2001. **10 Suppl 2**: p. S86-95.
12. Christoffersen, J. and W.J. Landis, *A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo*. Anat Rec, 1991. **230**(4): p. 435-50.
13. Heymann, D. and S. Lepreux, *Le tissu osseux*, in *Histologie - Bases fondamentales*, OmniScience, Editor. 2008.
14. Rho, J.Y., T.Y. Tsui, and G.M. Pharr, *Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation*. Biomaterials, 1997. **18**(20): p. 1325-30.
15. Autefage, A., *The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture*. Injury, 2000. **31 Suppl 3**: p. C50-5.
16. Glowacki, J., et al., *A role for osteocalcin in osteoclast differentiation*. J Cell Biochem, 1991. **45**(3): p. 292-302.
17. Swaminathan, R., *Biochemical markers of bone turnover*. Clin Chim Acta, 2001. **313**(1-2): p. 95-105.
18. Hunter, G.K. and H.A. Goldberg, *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein*. Biochem J, 1994. **302 (Pt 1)**: p. 175-9.
19. Lawler, J.W., H.S. Slayter, and J.E. Coligan, *Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets*. J Biol Chem, 1978. **253**(23): p. 8609-16.
20. Wiesmann, H.P., et al., *Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation*. Int Rev Cytol, 2005. **242**: p. 121-56.
21. Fratzl, P., *Collagen: Structure and Mechanics*. 1 (25 juin) ed. 2008, New-York: Springer-Verlag. 510.
22. Owen, M., *Marrow stromal stem cells*. J Cell Sci Suppl, 1988. **10**: p. 63-76.
23. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.

24. Hattersley, G. and T.J. Chambers, *Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro*. J Cell Physiol, 1989. **140**(3): p. 478-82.
25. Suda, T., N. Takahashi, and T.J. Martin, *Modulation of osteoclast differentiation*. Endocr Rev, 1992. **13**(1): p. 66-80.
26. Matsuo, K., *Cross-talk among bone cells*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(4): p. 292-7.
27. Malaval, L., C. Chenu, and P.D. Delmas, *Protéine de l'os : maladies systémiques osseuses de l'adulte*. D. Kuntz, édition Flammarion, 1996: p. 17-35.
28. Gorski, J.P., *Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization*. Calcif Tissue Int, 1992. **50**(5): p. 391-6.
29. Termine, J.D., et al., *Osteoneectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen*. Cell, 1981. **26**(1 Pt 1): p. 99-105.
30. Chavassieux, P., *Histologie et cytologie de l'os normal*. 2003. **14**(002-A-10).
31. Marks, S.C., Jr. and S.N. Popoff, *Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton*. Am J Anat, 1988. **183**(1): p. 1-44.
32. Toppets, V., et al., *Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux*. Ann. Méd. Vét, 2004. **148**: p. 1-13.
33. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
34. Franz-Ondelaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*. Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 176-90.
35. Knothe Tate, M.L., et al., *The osteocyte*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 1-8.
36. Palumbo, C., *A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos*. Cell Tissue Res, 1986. **246**(1): p. 125-31.
37. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 188-92.
38. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 577-87.
39. Aarden, E.M., E.H. Burger, and P.J. Nijweide, *Function of osteocytes in bone*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 287-99.
40. Poole, K.E., et al., *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation*. FASEB J, 2005. **19**(13): p. 1842-4.
41. van Bezooijen, R.L., et al., *SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 319-27.
42. Noble, B.S., *The osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 106-11.
43. Noble, B.S., et al., *Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(4): p. C934-43.
44. Rodan, G.A., *Introduction to bone biology*. Bone, 1992. **13 Suppl 1**: p. S3-6.
45. Chow, J.W., et al., *Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(11): p. 1760-7.
46. Bonewald, L.F. and M.L. Johnson, *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*. Bone, 2008. **42**(4): p. 606-15.
47. Genitos, D.C., et al., *Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes*. J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 207-14.
48. Udagawa, N., et al., *Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment*

- prepared by bone marrow-derived stromal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7260-4.
49. Massey, H.M. and A.M. Flanagan, *Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes.* Br J Haematol, 1999. **106**(1): p. 167-70.
50. Nicholson, G.C., et al., *Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL).* Clin Sci (Lond), 2000. **99**(2): p. 133-40.
51. Sorensen, M.G., et al., *Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood.* J Bone Miner Metab, 2007. **25**(1): p. 36-45.
52. Rivollier, A., et al., *Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment.* Blood, 2004. **104**(13): p. 4029-37.
53. Wakkach, A., et al., *Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts.* Blood, 2008. **112**(13): p. 5074-83.
54. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation by local factors.* Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 87S-91S.
55. Mulari, M., J. Vaaraniemi, and H.K. Vaananen, *Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts.* Microsc Res Tech, 2003. **61**(6): p. 496-503.
56. Holtrop, M.E. and G.J. King, *The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications.* Clin Orthop Relat Res, 1977(123): p. 177-96.
57. Bruzzaniti, A. and R. Baron, *Molecular regulation of osteoclast activity.* Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(1-2): p. 123-39.
58. Blair, H.C., et al., *Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone.* J Cell Biol, 1986. **102**(4): p. 1164-72.
59. Sandell, L.J. and P. Adler, *Developmental patterns of cartilage.* Front Biosci, 1999. **4**: p. D731-42.
60. Chung, U.I., et al., *Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins.* J Orthop Sci, 2004. **9**(4): p. 410-4.
61. Calmar, E.A. and R.J. Vinci, *The anatomy and physiology of bone fracture and healing.* Clinical Pediatric Emergency Medicine, 2002. **3**(2): p. 85-93.
62. Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 221-33.
63. Butler, J.M., et al., *Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells.* Cell Stem Cell. **6**(3): p. 251-64.
64. Parfitt, A.M., *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.* J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 273-86.
65. Frost, H.M., *A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians.* Angle Orthod, 2004. **74**(1): p. 3-15.
66. Turner, C.H. and F.M. Pavalko, *Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation.* J Orthop Sci, 1998. **3**(6): p. 346-55.
67. Hill, P.A., *Bone remodelling.* Br J Orthod, 1998. **25**(2): p. 101-7.
68. Chambers, T.J. and K. Fuller, *Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact.* J Cell Sci, 1985. **76**: p. 155-65.

69. Sims, N.A. and J.H. Gooi, *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 444-51.
70. Wu, X., et al., *Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5545-55.
71. Pederson, L., et al., *Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20764-9.
72. Canalis, E., A. Giustina, and J.P. Bilezikian, *Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 905-16.
73. Elbeshir, E.I., *Spontaneous regeneration of the mandibular bone following hemimandibulectomy*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1990. **28**(2): p. 128-30.
74. Taljanovic, M.S., et al., *Fracture fixation*. Radiographics, 2003. **23**(6): p. 1569-90.
75. Hollinger, J.O. and J.C. Kleinschmidt, *The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials*. J Craniofac Surg, 1990. **1**(1): p. 60-8.
76. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
77. Einhorn, T.A., *Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S59-67.
78. Babhulkar, S. and K. Pande, *Nonunion of the diaphysis of long bones*. Clin Orthop Relat Res, 2005(431): p. 50-6.
79. Marsh, D., *Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S22-30.
80. Ring, D., W.T. Barrick, and J.B. Jupiter, *Recalcitrant nonunion*. Clin Orthop Relat Res, 1997(340): p. 181-9.
81. Cuckler, J.M., *Bone loss in total knee arthroplasty: graft augment and options*. J Arthroplasty, 2004. **19**(4 Suppl 1): p. 56-8.
82. Gamradt, S.C. and J.R. Lieberman, *Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications*. Clin Orthop Relat Res, 2003(417): p. 183-94.
83. Desandes, E., et al., *Cancer incidence among children in France, 1990-1999*. Pediatr Blood Cancer, 2004. **43**(7): p. 749-57.
84. Virk, M.S. and J.R. Lieberman, *Tumor metastasis to bone*. Arthritis Res Ther, 2007. **9** Suppl 1: p. S5.
85. Philip, T., et al., *[Standards, options and recommendations (SOR) for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. Groupe de travail SORJ]*. Bull Cancer, 1999. **86**(2): p. 159-76.
86. Bonnick, S.L., *Osteoporosis in men and women*. Clin Cornerstone, 2006. **8**(1): p. 28-39.
87. Labovitz, J.M. and K. Revill, *Osteoporosis: pathogenesis, new therapies and surgical implications*. Clin Podiatr Med Surg, 2007. **24**(2): p. 311-32.
88. Horwitz, E.M., et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 309-13.
89. Mahboubi, S., et al., *Fibrodysplasia ossificans progressiva*. Pediatr Radiol, 2001. **31**(5): p. 307-14.
90. Thompson, K.G., et al., *An outbreak of rickets in Corriedale sheep: evidence for a genetic aetiology*. N Z Vet J, 2007. **55**(3): p. 137-42.
91. Bauer, T.W. and D. Togawa, *Bone graft substitutes: towards a more perfect union*. Orthopedics, 2003. **26**(9): p. 925-6.

92. Petite, H., *La bio-ingénierie de la régénération osseuse*. MS. Médecine sciences, 2002. **18**(10): p. 995-1002.
93. Fischer, L.P., et al., *OLLIER : le père de la chirurgie ostéo-articulaire et réparatrice (1830-1900) Traité expérimental et clinique de la régénération des os*. Maitrise orthopédique, 1995. **47**.
94. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S20-7.
95. Damien, C.J. and J.R. Parsons, *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. J Appl Biomater, 1991. **2**(3): p. 187-208.
96. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
97. Desai, B.M., *Osteobiologics*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2007. **36**(4 Suppl): p. 8-11.
98. Boone, D.W., *Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery*. Foot Ankle Clin, 2003. **8**(1): p. 1-14.
99. Arrington, E.D., et al., *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
100. Rajan, G.P., et al., *Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial*. J Trauma, 2006. **60**(6): p. 1322-9.
101. Younger, E.M. and M.W. Chapman, *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma, 1989. **3**(3): p. 192-5.
102. Berengo, M., et al., *Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods*. Minerva Stomatol, 2006. **55**(4): p. 189-98.
103. Perry, C.R., *Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes*. Clin Orthop Relat Res, 1999(360): p. 71-86.
104. Taylor, G.I., G.D. Miller, and F.J. Ham, *The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques*. Plast Reconstr Surg, 1975. **55**(5): p. 533-44.
105. Levin, L.S., *Vascularized fibula graft for the traumatically induced long-bone defect*. J Am Acad Orthop Surg, 2006. **14**(10 Spec No.): p. S175-6.
106. Friedrich, J.B., et al., *Free vascularized fibular graft salvage of complications of long-bone allograft after tumor reconstruction*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(1): p. 93-100.
107. Ghert, M., N. Colterjohn, and M. Manfrini, *The use of free vascularized fibular grafts in skeletal reconstruction for bone tumors in children*. J Am Acad Orthop Surg, 2007. **15**(10): p. 577-87.
108. Ohnishi, I., et al., *Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a multicenter study in Japan*. J Pediatr Orthop, 2005. **25**(2): p. 219-24.
109. Sakamoto, A., et al., *Long-term follow-up on the use of vascularized fibular graft for the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia*. J Orthop Surg Res, 2008. **3**: p. 13.
110. Aronson, J., *Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method*. J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(8): p. 1243-58.
111. Aro, H.T. and A.J. Aho, *Clinical use of bone allografts*. Ann Med, 1993. **25**(4): p. 403-12.
112. Oklund, S.A., et al., *Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 269-91.
113. Prolo, D.J. and J.J. Rodrigo, *Contemporary bone graft physiology and surgery*. Clin Orthop Relat Res, 1985(200): p. 322-42.

114. Macewen, W., *I. Intrahuman Bone Grafting and Reimplantation of Bone*. Ann Surg, 1909. **50**(6): p. 959-68.
115. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins*. Clin Orthop Relat Res, 1970. **71**: p. 271-8.
116. Catanzariti, A. and L. Karlock, *The application of allograft bone in foot and ankle surgery*. J Foot Ankle Surg, 1996. **35**(5): p. 440-51.
117. Edwards, J.T., M.H. Diegmann, and N.L. Scarborough, *Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model*. Clin Orthop Relat Res, 1998(357): p. 219-28.
118. Delloye, C., *How to improve the incorporation of massive allografts?* Chir Organi Mov, 2003. **88**(4): p. 335-43.
119. Dick, H.M. and R.J. Strauch, *Infection of massive bone allografts*. Clin Orthop Relat Res, 1994(306): p. 46-53.
120. Boyce, T., J. Edwards, and N. Scarborough, *Allograft bone. The influence of processing on safety and performance*. Orthop Clin North Am, 1999. **30**(4): p. 571-81.
121. Friedlaender, G.E., et al., *Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome*. Orthop Clin North Am, 1999. **30**(4): p. 583-8.
122. Costain, D.J. and R.W. Crawford, *Fresh-frozen vs. irradiated allograft bone in orthopaedic reconstructive surgery*. Injury, 2009. **40**(12): p. 1260-4.
123. Delloye, C., et al., *Bone allografts: What they can offer and what they cannot*. J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**(5): p. 574-9.
124. Dion, N. and F.H. Sim, *The use of allografts in musculoskeletal oncology*. Instr Course Lect, 2002. **51**: p. 499-506.
125. Rifkinson-Mann, S., *Cranial surgery in ancient Peru*. Neurosurgery, 1988. **23**(4): p. 411-6.
126. Sanan, A. and S.J. Haines, *Repairing holes in the head: a history of cranioplasty*. Neurosurgery, 1997. **40**(3): p. 588-603.
127. Maatz, R., W. Lentz, and R. Graf, *Spongiosa test of bone grafts for transplantation*. J Bone Joint Surg Am, 1954. **36-A**(4): p. 721-31.
128. Arnaud, E., *Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical prospects*. Childs Nerv Syst, 2000. **16**(10-11): p. 659-68.
129. Cunin, G., et al., *Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material*. Spine (Phila Pa 1976), 2000. **25**(9): p. 1070-6.
130. Yukna, R.A., *Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects*. J Periodontol, 1994. **65**(2): p. 177-85.
131. Begley, C.T., et al., *Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes*. Biomaterials, 1995. **16**(15): p. 1181-5.
132. Mueller, Y.M., C. Davenport, and S.T. Ildstad, *Xenotransplantation: application of disease resistance*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(12): p. 1009-12.
133. Habibovic, P. and K. de Groot, *Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 25-32.
134. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, *Synthetic bone graft substitutes*. ANZ J Surg, 2001. **71**(6): p. 354-61.
135. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.

136. Chen, T.L., *Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment*. Bone, 2004. **35**(1): p. 83-95.
137. Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86-A**(7): p. 1541-58.
138. D'Ippolito, G., et al., *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(7): p. 1115-22.
139. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
140. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. **4**(5): p. 267-74.
141. Beresford, J.N., *Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*. Clin Orthop Relat Res, 1989(240): p. 270-80.
142. Banfi, A., et al., *Reproductive aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells*. Tissue Eng, 2002. **8**(6): p. 901-10.
143. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
144. Mendes, S.C., et al., *Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age*. Tissue Eng, 2002. **8**(6): p. 911-20.
145. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
146. Banfi, A., et al., *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy*. Exp Hematol, 2000. **28**(6): p. 707-15.
147. Stenderup, K., et al., *Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells*. Bone, 2003. **33**(6): p. 919-26.
148. Tarte, K., et al., *Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation*. Blood. **115**(8): p. 1549-53.
149. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(6): p. 432-63.
150. Peterson, L., *Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee*. Acta Orthop Belg, 1996. **62 Suppl 1**: p. 196-200.
151. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. Cells Tissues Organs, 2003. **174**(3): p. 101-9.
152. Matsubara, T., et al., *Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(3): p. 399-409.
153. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5807-12.
154. Im, G.I., Y.W. Shin, and K.B. Lee, *Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?* Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(10): p. 845-53.
155. Digirolamo, C.M., et al., *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 275-81.
156. Grassel, S. and N. Ahmed, *Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 4946-56.

157. Gronthos, S. and P.J. Simmons, *The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro*. Blood, 1995. **85**(4): p. 929-40.
158. Gindraux, F., et al., *Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule*. Cell Tissue Res, 2007. **327**(3): p. 471-83.
159. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 2004. **95**(1): p. 9-20.
160. Stewart, K., et al., *STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro*. Cell Tissue Res, 2003. **313**(3): p. 281-90.
161. Sabatini, F., et al., *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities*. Lab Invest, 2005. **85**(8): p. 962-71.
162. Komori, T., *Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development*. J Cell Biochem, 2002. **87**(1): p. 1-8.
163. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturationarrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
164. Otto, F., et al., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997. **89**(5): p. 765-71.
165. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
166. Marie, P.J., *Transcription factors controlling osteoblastogenesis*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 98-105.
167. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, 2002. **108**(1): p. 17-29.
168. Ulsamer, A., et al., *BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 3816-26.
169. Hay, E., et al., *Bone morphogenetic protein receptor IB signaling mediates apoptosis independently of differentiation in osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1650-8.
170. Lee, M.H., et al., *BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(3): p. 689-94.
171. Lee, K.S., et al., *Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8783-92.
172. Chen, D., et al., *Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts*. Calcif Tissue Int, 1997. **60**(3): p. 283-90.
173. Javed, A., et al., *Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation*. Cells Tissues Organs, 2009. **189**(1-4): p. 133-7.
174. Gehron Robey, P., *The biochemistry of bone*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1989. **18**(4): p. 858-902.
175. Wennberg, C., et al., *Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(10): p. 1879-88.

176. Anderson, H.C., R. Garimella, and S.E. Tague, *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 822-37.
177. Beck, G.R., Jr., B. Zerler, and E. Moran, *Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8352-7.
178. Murshed, M., et al., *Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone*. Genes Dev, 2005. **19**(9): p. 1093-104.
179. Gordon, J.A., et al., *Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro*. Bone, 2007. **41**(3): p. 462-73.
180. Fujisawa, R., Y. Nodasaka, and Y. Kuboki, *Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen*. Calcif Tissue Int, 1995. **56**(2): p. 140-4.
181. Malaval, L., et al., *Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1145-53.
182. Alford, A.I. and K.D. Hankenson, *Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration*. Bone, 2006. **38**(6): p. 749-57.
183. Ducey, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 448-52.
184. Hunter, G.K., et al., *Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins*. Biochem J, 1996. **317** (Pt 1): p. 59-64.
185. Hauschka, P.V. and S.A. Carr, *Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin*. Biochemistry, 1982. **21**(10): p. 2538-47.
186. Matsunaga, S., H. Ito, and T. Sakou, *The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss*. Calcif Tissue Int, 1999. **65**(4): p. 285-9.
187. Choi, K.M., et al., *Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation*. J Biosci Bioeng, 2008. **105**(6): p. 586-94.
188. Kotobuki, N., et al., *Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow*. Artif Organs, 2004. **28**(1): p. 33-9.
189. Ohgushi, H., et al., *In vitro bone formation by rat marrow cell culture*. J Biomed Mater Res, 1996. **32**(3): p. 333-40.
190. Ohgushi, H., et al., *Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair*. Yonsei Med J, 2004. **45 Suppl**: p. 61-7.
191. Grigoriadis, A.E., J.N. Heersche, and J.E. Aubin, *Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone*. J Cell Biol, 1988. **106**(6): p. 2139-51.
192. zur Nieden, N.I., G. Kempka, and H.J. Ahr, *In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts*. Differentiation, 2003. **71**(1): p. 18-27.
193. Bellows, C.G., A. Ciaccia, and J.N. Heersche, *Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone*. Bone, 1998. **23**(2): p. 119-25.
194. Phinney, D.G., et al., *Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation*. J Cell Biochem, 1999. **72**(4): p. 570-85.
195. Cheng, S.L., et al., *Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 277-86.
196. Weinreb, M., A. Grosskopf, and N. Shir, *The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. E376-83.

197. van Leeuwen, J.P., et al., *Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2001. **11**(1-3): p. 199-226.
198. Kuznetsov, S.A., M.H. Mankani, and P.G. Robey, *Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation*. Transplantation, 2000. **70**(12): p. 1780-7.
199. Abdallah, B.M., et al., *Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females*. Bone, 2006. **39**(1): p. 181-8.
200. Kruyt, M.C., et al., *Optimization of bone-tissue engineering in goats*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2004. **69**(2): p. 113-20.
201. Holtorf, H.L., J.A. Jansen, and A.G. Mikos, *Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone*. J Biomed Mater Res A, 2005. **72**(3): p. 326-34.
202. Shin, H., et al., *Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and beta-glycerol phosphate*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3645-54.
203. Koike, M., et al., *Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2*. J Bone Miner Metab, 2005. **23**(3): p. 219-25.
204. Mauney, J.R., et al., *Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro*. Calcif Tissue Int, 2004. **74**(5): p. 458-68.
205. Connolly, J.F., et al., *Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1991(266): p. 259-70.
206. Horwitz, E.M., et al., *Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1227-31.
207. Hernigou, P., et al., *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(7): p. 1430-7.
208. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
209. Le Blanc, K., et al., *Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta*. Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1607-14.
210. Grisendi, G., et al., *GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion*. Cytotherapy, **12**(4): p. 466-77.
211. Sensebe, L., *Clinical grade production of mesenchymal stem cells*. Biomed Mater Eng, 2008. **18**(1 Suppl): p. S3-10.
212. Sensebe, L., et al., *Mesenchymal stem cells for clinical application*. Vox Sang. **98**(2): p. 93-107.
213. Wright, J.G., et al., *A randomized clinical trial comparing intralesional bone marrow and steroid injections for simple bone cysts*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(4): p. 722-30.
214. Llambes, F., F.J. Silvestre, and R. Caffesse, *Vertical guided bone regeneration with biodegradable barriers*. J Periodontol, 2007. **78**(10): p. 2036-42.
215. Lutolf, M.P., et al., *Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 513-8.
216. Caplan, A.I., *Stem cell delivery vehicle*. Biomaterials, 1990. **11**: p. 44-6.

217. Jarcho, M., *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*. Clin Orthop Relat Res, 1981(157): p. 259-78.
218. Daculsi, G., *Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute*. Biomaterials, 1998. **19**(16): p. 1473-8.
219. Chang, B.S., et al., *Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations*. Biomaterials, 2000. **21**(12): p. 1291-8.
220. Gosain, A.K., et al., *A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I*. Plast Reconstr Surg, 2002. **109**(2): p. 619-30.
221. Ripamonti, U., *The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(5): p. 692-703.
222. Ripamonti, U., *Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models*. Biomaterials, 1996. **17**(1): p. 31-5.
223. Yuan, H., et al., *Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs*. Biomaterials, 2000. **21**(12): p. 1283-90.
224. Barrere, F., et al., *Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants*. J Biomed Mater Res A, 2003. **66**(4): p. 779-88.
225. Habibovic, P., et al., *Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(4): p. 747-62.
226. Goshima, J., V.M. Goldberg, and A.I. Caplan, *The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks*. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 298-311.
227. Klein, C., et al., *Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues*. Biomaterials, 1994. **15**(1): p. 31-4.
228. Ohgushi, H., V.M. Goldberg, and A.I. Caplan, *Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells*. J Orthop Res, 1989. **7**(4): p. 568-78.
229. Yang, Z., et al., *Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals*. Biomaterials, 1996. **17**(22): p. 2131-7.
230. Cornell, C.N. and J.M. Lane, *Current understanding of osteoconduction in bone regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S267-73.
231. Basle, M.F., et al., *Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone*. Calcif Tissue Int, 1993. **53**(5): p. 348-56.
232. Benahmed, M., et al., *Monocyte activity in the presence of calcium phosphate activated by 1,25 (OH)2 VD3 and interferon-gamma*. Biomaterials, 1994. **15**(1): p. 25-30.
233. Benahmed, M., et al., *Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate by human monocytes in vitro: a morphological study*. Biomaterials, 1996. **17**(22): p. 2173-8.
234. Gross, U.M., C.M. Muller-Mai, and C. Voigt, *The interface of calcium-phosphate and glass-ceramic in bone, a structural analysis*. Biomaterials, 1990. **11**: p. 83-5.
235. Daculsi, G., J.M. Bouler, and R.Z. LeGeros, *Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials*. Int Rev Cytol, 1997. **172**: p. 129-91.
236. Winter, G.D. and B.J. Simpson, *Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs*. Nature, 1969. **223**(5201): p. 88-90.
237. Ripamonti, U., *Tissue morphogenesis and tissue engineering by bone morphogenetic proteins*. SADJ, 1999. **54**(6): p. 257-62.

238. Yuan, H., et al., *Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier*. J Mater Sci Mater Med, 2001. **12**(9): p. 761-6.
239. Lu, J., et al., *Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 361-5.
240. Malard, O., et al., *Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study*. J Biomed Mater Res, 1999. **46**(1): p. 103-11.
241. Solheim, E., et al., *Biocompatibility and effect on osteogenesis of poly(ortho ester) compared to poly(DL-lactic acid)*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 257-63.
242. Xia, Z.D., et al., *Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite(CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An in vivo study*. Chin Med J (Engl), 1994. **107**(11): p. 845-9.
243. Danon, D., M.A. Kowatch, and G.S. Roth, *Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 2018-20.
244. Champagne, C.M., et al., *Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2*. Bone, 2002. **30**(1): p. 26-31.
245. Takebe, J., et al., *Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(2): p. 207-16.
246. Crowther, M., et al., *Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 478-90.
247. Okazaki, T., et al., *Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7531-8.
248. Uchida, A., et al., *Growth of bone marrow cells on porous ceramics in vitro*. J Biomed Mater Res, 1987. **21**(1): p. 1-10.
249. Eniwumide, J.O., et al., *Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft*. Eur Cell Mater, 2007. **14**: p. 30-8; discussion 39.
250. Toquet, J., et al., *Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(1): p. 98-108.
251. Livingston, T.L., et al., *Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration*. J Mater Sci Mater Med, 2003. **14**(3): p. 211-8.
252. Jafarian, M., et al., *Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **105**(5): p. e14-24.
253. Espitalier, F., et al., *A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone*. Biomaterials, 2009. **30**(5): p. 763-9.
254. Bruder, S.P., et al., *The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(7): p. 985-96.
255. Arinzeh, T.L., et al., *A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3631-8.
256. Boden, S.D., et al., *Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium*

- phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999. **24**(12): p. 1179-85.
257. Yamamoto, N., et al., *Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells*. *J Med Dent Sci*, 2003. **50**(1): p. 63-9.
258. Kruyt, M., et al., *Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats*. *Tissue Eng Part A*, 2008. **14**(6): p. 1081-8.
259. Reddi, A.H., *Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(3): p. 247-52.
260. Ripamonti, U., *Bone induction by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, BMP-7) in the primate Papio ursinus with expression of mRNA of gene products of the TGF-beta superfamily*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(4): p. 911-28.
261. Mao, X.Z., et al., *Hydroxyapatite/tricalcium phosphate matrix scaffold as cell carriers in vitro*. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2004. **29**(4): p. 371-5.
262. Barrilleaux, B., et al., *Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(11): p. 3007-19.
263. Derubeis, A.R. and R. Cancedda, *Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances*. *Ann Biomed Eng*, 2004. **32**(1): p. 160-5.
264. Gravel, M., et al., *Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coralline composites microstructured using coralline as gas forming agent*. *Biomaterials*, 2006. **27**(9): p. 1899-906.
265. Kakudo, N., et al., *Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold*. *J Biomed Mater Res A*, 2008. **84**(1): p. 191-7.
266. Kim, H.J., et al., *Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells*. *Biomaterials*, 2005. **26**(21): p. 4442-52.
267. Lee, J.H., et al., *Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **370**(3): p. 456-60.
268. Meinel, L., et al., *Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow*. *Ann Biomed Eng*, 2004. **32**(1): p. 112-22.
269. Ng, A.M., et al., *Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone*. *J Biomed Mater Res A*, 2008. **85**(2): p. 301-12.
270. Xu, C., et al., *Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **88**(1): p. 264-73.
271. Botchwey, E.A., et al., *Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system*. *J Biomed Mater Res*, 2001. **55**(2): p. 242-53.
272. Grayson, W.L., et al., *Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone*. *Tissue Eng Part A*, 2008. **14**(11): p. 1809-20.
273. Goldstein, A.S., et al., *Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds*. *Biomaterials*, 2001. **22**(11): p. 1279-88.
274. Marolt, D., et al., *Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors*. *Biomaterials*, 2006. **27**(36): p. 6138-49.
275. Sikavitsas, V.I., G.N. Bancroft, and A.G. Mikos, *Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor*. *J Biomed Mater Res*, 2002. **62**(1): p. 136-48.

276. Braccini, A., et al., *The osteogenicity of implanted engineered bone constructs is related to the density of clonogenic bone marrow stromal cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 60-5.
277. Braccini, A., et al., *Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts*. Stem Cells, 2005. **23**(8): p. 1066-72.
278. Meijer, G.J., et al., *Cell based bone tissue engineering in jaw defects*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3053-61.
279. Morishita, T., et al., *Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells*. Artif Organs, 2006. **30**(2): p. 115-8.
280. Pradel, W., U. Eckelt, and G. Lauer, *Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. 285-90.
281. Quarto, R., et al., *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 385-6.
282. Schimming, R. and R. Schmelzeisen, *Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation*. J Oral Maxillofac Surg, 2004. **62**(6): p. 724-9.
283. Cordonnier, T., et al., *3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, **21**(3): p. 981-7.
284. Fischer, E.M., et al., *Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles*. Tissue Eng, 2003. **9**(6): p. 1179-88.
285. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
286. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
287. Ameziane, N., M. Bogard, and J. Lamoril, *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. 2006: Elsevier Masson. 705.
288. Lawrence, R.C., et al., *Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(5): p. 778-99.
289. Brown, K.L. and R.L. Cruess, *Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review*. J Bone Joint Surg Am, 1982. **64**(2): p. 270-9.
290. Helm, G.A., H. Dayoub, and J.A. Jane, Jr., *Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis*. Neurosurg Focus, 2001. **10**(4): p. E4.
291. Burchardt, H., *Biology of bone transplantation*. Orthop Clin North Am, 1987. **18**(2): p. 187-96.
292. Masquelet, A.C., et al., *[Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]*. Ann Chir Plast Esthet, 2000. **45**(3): p. 346-53.
293. Zarate-Kalpopoulos, B. and A. Reyes-Sanchez, *[Bone grafts in orthopedic surgery]*. Cir Cir, 2006. **74**(3): p. 217-22.
294. Laurencin, C.T., et al., *Tissue engineering: orthopedic applications*. Annu Rev Biomed Eng, 1999. **1**: p. 19-46.
295. Viateau, V., et al., *A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects*. Am J Vet Res, 2004. **65**(12): p. 1653-7.
296. Petite, H., et al., *Tissue-engineered bone regeneration*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 959-63.
297. Viateau, V., et al., *Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep*. J Orthop Res, 2007. **25**(6): p. 741-9.

298. Winter, M., et al., *Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics*. Biomaterials, 1981. **2**(3): p. 159-60.
299. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
300. Curran, J.M., R. Chen, and J.A. Hunt, *The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate*. Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4783-93.
301. Fellah, B.H., et al., *Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model*. Biomaterials, 2008. **29**(9): p. 1177-88.
302. Le Nihouannen, D., et al., *Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(2): p. 225-35.
303. Bensaid, W., et al., *De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model*. Tissue Eng, 2005. **11**(5-6): p. 814-24.
304. Kon, E., et al., *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(3): p. 328-37.
305. Gouin, F., et al., *[Filling of bone defects using biphasic macroporous calcium phosphate ceramic. Apropos of 23 cases]*. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 1995. **81**(1): p. 59-65.
306. Ransford, A.O., et al., *Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomized study of 341 patients*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(1): p. 13-8.
307. Daculsi, G., et al., *Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics*. Calcif Tissue Int, 1990. **46**(1): p. 20-7.
308. Daculsi, G., et al., *Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization*. J Biomed Mater Res, 1989. **23**(8): p. 883-94.
309. Bruder, S.P., et al., *Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1998. **16**(2): p. 155-62.
310. Kadiyala, S., et al., *Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro*. Cell Transplant, 1997. **6**(2): p. 125-34.
311. Arinze, T.L., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85**-A(10): p. 1927-35.
312. Pelissier, P., et al., *Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes*. Br J Plast Surg, 2002. **55**(7): p. 596-8.
313. Pelissier, P., et al., *Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration*. J Orthop Res, 2004. **22**(1): p. 73-9.
314. Lennon, D.P., et al., *Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1996. **32**(10): p. 602-611.
315. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
316. Osyczka, A.M. and P.S. Leboy, *Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling*. Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3428-37.
317. Maeda, S., et al., *Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells*. EMBO J, 2004. **23**(3): p. 552-63.

318. Aubin, J.E., *Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation*. J Cell Biochem, 1999. **72**(3): p. 396-410.
319. Purpura, K.A., J.E. Aubin, and P.W. Zandstra, *Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent*. Stem Cells, 2004. **22**(1): p. 39-50.
320. Smith, E., et al., *Glucocorticoids inhibit developmental stage-specific osteoblast cell cycle. Dissociation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 from E2F4-p130 complexes*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19992-20001.
321. Weinstein, R.S., *Glucocorticoid-induced osteoporosis*. Rev Endocr Metab Disord, 2001. **2**(1): p. 65-73.
322. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
323. Kim, H.J., et al., *Glucocorticoids and the osteoclast*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1116**: p. 335-9.
324. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
325. Stein, G.S. and J.B. Lian, *Regulation of cell cycle and growth control*. Bioelectromagnetics, 1992. **Suppl 1**: p. 247-65.
326. Stein, G.S., J.B. Lian, and T.A. Owen, *Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation*. FASEB J, 1990. **4**(13): p. 3111-23.
327. Canalis, E., et al., *Signals that determine the fate of osteoblastic cells*. J Endocrinol Invest, 2005. **28**(8 Suppl): p. 3-7.
328. Chau, J.F., W.F. Leong, and B. Li, *Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function*. Histol Histopathol, 2009. **24**(12): p. 1593-606.
329. Nemoto, E., et al., *Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation*. Bone, 2009. **44**(5): p. 805-12.
330. Owen, T.A., et al., *Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*. J Cell Physiol, 1990. **143**(3): p. 420-30.
331. Raucci, A., et al., *Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways*. J Cell Physiol, 2008. **215**(2): p. 442-51.
332. van Es, J.H., et al., *Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 959-63.
333. Katagiri, T., et al., *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1755-66.
334. Drissi, H., et al., *The cell cycle regulator p27kip1 contributes to growth and differentiation of osteoblasts*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3705-11.
335. Nishimori, S., et al., *Smad-mediated transcription is required for transforming growth factor-beta 1-induced p57(Kip2) proteolysis in osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10700-5.
336. Urano, T., et al., *p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12197-200.
337. Oshima, H., et al., *Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells*. Bone, 2007. **41**(4): p. 575-83.

338. Ito, Y., et al., *Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic hybridized with cultured marrow stromal stem cells derived from Green rat*. J Biomed Mater Res A, 2004. **69**(3): p. 454-61.
339. Nair, M.B., et al., *A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application*. Acta Biomater, 2008. **4**(1): p. 173-81.
340. Okamoto, M., et al., *Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(4): p. 327-36.
341. Zhang, R. and P.X. Ma, *Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(2): p. 430-8.
342. Chapman, M.W., R. Bucholz, and C. Cornell, *Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial*. J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(4): p. 495-502.
343. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 947-55.
344. Cooper, L.F., et al., *Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis*. J Dent Res, 2001. **80**(1): p. 314-20.
345. Dennis, J.E., et al., *Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression*. Cell Transplant, 1992. **1**(1): p. 23-32.
346. Phinney, D.G., et al., *Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells*. J Cell Biochem, 1999. **75**(3): p. 424-36.
347. Bruder, S.P., et al., *Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S247-56.
348. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
349. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.
350. Haynesworth, S.E., et al., *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**(1): p. 81-8.
351. Kuznetsov, S.A., et al., *Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(9): p. 1335-47.
352. de Bruijn, J.D., et al., *Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells*. Adv Dent Res, 1999. **13**: p. 74-81.
353. Maegawa, N., et al., *Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2)*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 306-13.
354. Maniatopoulos, C., J. Sodek, and A.H. Melcher, *Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats*. Cell Tissue Res, 1988. **254**(2): p. 317-30.
355. Borden, M., et al., *Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair*. Biomaterials, 2003. **24**(4): p. 597-609.
356. Shirakawa, K., et al., *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates osteoblast differentiation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(16): p. 6105-16.

357. Li, Z., et al., *Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells*. Bone, 1999. **25**(6): p. 661-6.
358. Schiller, P.C., et al., *Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture*. Bone, 2001. **28**(4): p. 362-9.
359. Liu, G., et al., *Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Chin J Traumatol, 2004. **7**(6): p. 358-62.
360. Valarmathi, M.T., et al., *A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(4): p. 491-504.
361. Cool, S.M. and V. Nurcombe, *Substrate induction of osteogenesis from marrow-derived mesenchymal precursors*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(6): p. 632-42.
362. Petersen, O.W., et al., *Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9064-8.
363. Tanaka, H., et al., *Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone*. J Cell Biochem, 2004. **93**(3): p. 454-62.
364. Weber, L.M., K.N. Hayda, and K.S. Anseth, *Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(12): p. 1959-68.
365. Howe, A.K. and R.L. Juliano, *Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27268-74.
366. Chen, X.D., et al., *Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(12): p. 1943-56.
367. Buxton, P.G., et al., *Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition*. Bone, 2008. **43**(2): p. 377-85.
368. Bitar, M., et al., *Effect of cell density on osteoblastic differentiation and matrix degradation of biomimetic dense collagen scaffolds*. Biomacromolecules, 2008. **9**(1): p. 129-35.
369. Malard, O., et al., *Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study*. Bone, 2005. **36**(2): p. 323-30.
370. Mendes, S.C., et al., *A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach*. J Mater Sci Mater Med, 2002. **13**(6): p. 575-81.
371. Yuan, H., et al., *A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats*. J Mater Sci Mater Med, 2002. **13**(12): p. 1271-5.
372. de Groot, K., *Bioceramics consisting of calcium phosphate salts*. Biomaterials, 1980. **1**(1): p. 47-50.
373. Hollinger, J.O. and G.C. Battistone, *Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics*. Clin Orthop Relat Res, 1986(207): p. 290-305.
374. Klein, C.P., et al., *Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue*. J Biomed Mater Res, 1983. **17**(5): p. 769-84.
375. Shimazaki, K. and V. Mooney, *Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute*. J Orthop Res, 1985. **3**(3): p. 301-10.
376. Heughebaert, M., et al., *Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites*. J Biomed Mater Res, 1988. **22**(3 Suppl): p. 257-68.

377. Jung, G.Y., Y.J. Park, and J.S. Han, *Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation*. J Mater Sci Mater Med. **21**(5): p. 1649-54.
378. Liu, Y., et al., *Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy*. J Biomed Mater Res, 2001. **57**(3): p. 327-35.
379. Liu, Y., et al., *Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity*. Tissue Eng, 2004. **10**(1-2): p. 101-8.
380. Kesselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. Garcia, *Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding*. Biomaterials, 2004. **25**(28): p. 5947-54.
381. Kesselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. Garcia, *Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 5953-7.
382. Yuan, H., et al., *Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis*. J Mater Sci Mater Med, 1998. **9**(12): p. 717-21.
383. Rohanizadeh, R., et al., *Apatite precipitation after incubation of biphasic calcium-phosphate ceramic in various solutions: influence of seed species and proteins*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(4): p. 530-9.
384. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.

Remerciements personnels

Et oui les remerciements... les quelques pages qui résument à mon avis les choses parmi les plus importantes de la vie d'un thésard : les amis, les rencontres et tous ces moments forts que l'on ne peut résumer en si peu de lignes. Mais comme je sais que ce sont ces quelques pages qui seront lues par le plus grand nombre je vais essayer de retranscrire au mieux ce que chacun à pu être pour moi durant ces années (même si c'est réducteur).

Malheureusement, le temps est passé trop vite parmi vous, alors pour paraphraser un grand homme (qui en fait été petit car Hobbit) :

Aujourd'hui c'est le jour de la fin de ma thèse. J'ai passé parmi vous 1, 2 voir même 5 ans !! Hélas ces quelques années ce fut un temps trop court à passer en si bonne compagnie... Je ne connais pas la moitié d'entre vous autant que je le voudrais. Et j'aime moins la moitié d'entre vous à moitié moins que vous ne le méritez.

Kiki, un grand merci à toi qui a été mon premier encadrant vendéen de stage nantais. Tu as su te montrer patient et me donner grâce à tes connaissances solides et riches un bon bagage de départ. Et je sais que ce n'est pas toujours facile pour toi qui aime que l'on comprenne vite et que l'autonomie ne tarde pas trop à faire son apparition. Cependant, tes connaissances et ton aide ne se sont pas purement bornées à la biologie, et pour ça aussi je te remercie. Merci pour ces excursions sud-Loire et ces voyages culinaires (où la bonne bière et le bon vin étaient un élément non négligeable). Merci d'avoir été, tout au long de ces années, mon copilote de sorties jusqu'au bout de la nuit et pour l'entraînement intensif au wild & crazy cricket cut throat (jeu auquel malgré quelques victoires je resterai toujours derrière le maître). Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite te je sais qu'on gardera le contact encore longtemps.

Solmaz, merci beaucoup pour les bons délires que nous avons vécus, les bonne parties de rigolades et les petites bagarres comme nous savons si bien les faire (à la ville, à la mer, à la montagne...) que ce soit à deux, à plusieurs, avec des meubles ou autres. Merci pour ces manips que l'on a pu faire en duo que ce soit les tiennes ou les miennes et qui resteront à jamais inconnu du grand public :p Merci aussi pour ta mauvaise foi et ton entêtement (surement encore des inventions perses ;)) qui ont permis ces légendaires prises de becs mais aussi ces fous rires, tous ces bons souvenirs que l'on va garder ! Enfin merci à tes non moins légendaires cul sec qui resteront dans les annales des soirées nantaises mais surtout dans nos têtes (et parfois sur ma chemise).

Milou, merci à ma petite alsacienne préférée. Au départ un peu difficile à apprivoiser (farouche la bête, sans doute du à notre côté câlin que tu avais du mal à intégrer). Mais, anyway, ton côté réservé a été rapidement supplanté par ton caractère pour très vite t'imposer comme quelqu'un d'incontournable en soirée et en vacances de ski (et vivement les prochaines). Merci d'avoir supporté mes blagues, mes jeux de mots, mes vannes sur le « village » strasbourgeois, mes appels à pas d'heures et tout ce que j'ai pu te faire subir. Merci de m'avoir fait redécouvrir le Picon et pour toutes ces soirées « surprenantes », notamment au Cookoo durant lesquels on aimait rencontrer de nouvelles têtes. Merci pour tous ces moments Ronchonchon vécus ensemble dans les moments plus difficiles. Mais.... « T'as pas perdu ta bonne humeur meur meur meur meur » et ça « c'est bon pour le moral, c'est bon pour le moral, c'est BON BON !! ».

Bien entendu **Jérôme**, le GRAND CHEF, qui a bien voulu de moi pendant ces 3 années alors qu'il me connaissait déjà un peu avant de signer pour ça. Un énorme MERCI !! Merci à toi d'avoir intercéde auprès de personnes pour que je puisse faire cette thèse et pour m'avoir défendu quand il le fallait. Tu as été présent tout le temps, même de loin quand j'étais à Tours, par téléphone et fichier word en correction live interposée via internet. Toi aussi par tes connaissances nombreuses et sûres tu as pu me guider, me faire avancer et me fournir de bonnes bases pour la suite. Et même si parfois j'avais peur d'être en réunion avec toi avec ta façon de te reculer sur ta chaise, de croiser tes mains derrière ta tête, de souffler un grand coup et de dire « Bon...Thomas... » indiquant le passage aux choses qui fâchent, ces réunions m'ont toujours servies, recadrées et permis d'avancer (bah oui le boulot c'est le boulot). Je pense que tu es le « Gold standard » des chefs qui a su me faire comprendre quand il fallait bosser, tu as été sérieux, présent, attentif jusqu'à la fin tout en me laissant ma liberté d'action et d'expression. Tu as su me mettre à l'aise et cela a permis entre nous une franche communication sans tabou. Bien sur hors boulot tu pouvais te transformer en ce jeune adolescent avec qui nous pouvions délivrer. Pour ça aussi, je te remercie, merci d'être un jeune chien fou dynamique heureux de vivre (et bon vivant) qui malgré tout représente le grand gourou, le sage, le grand sachem de notre communauté nantaise que tout le monde écoute avec passion (même, et surtout pour ma part, quand tu descendais un peu en dessous de la ceinture). Alors encore une fois merci pour tout et bonne route à toi...

Sam, merci à ma super collègue !! On se sera suivi partout dans toutes ces aventures. Merci d'avoir été ma maman au labo, qui m'apportait à manger, qui me rappelait de prendre rendez-vous chez le coiffeur ou d'aller aux toilettes quand j'oubliais que j'en avais envie ;) Bravo à toi pour qui ça n'a pas tous les jours était facile. Et pour ça merci d'avoir eu autant de soucis et d'avoir fait en sorte que les miens à côté c'était rien ;) je te félicite pour ta volonté et ta détermination, bravo !! Mille bravos pour nous avoir supportés si longtemps (sans trop craquer) Jérôme et moi dans le même bureau avec notre humour nos chansons et tout ce qui va avec. Merci pour le côté logistique des soirées et du « Qui conduit ce soir ?? ». Enfin merci de nous avoir ouvert les portes de ton appart' mêmes si les lattes de ton lit s'en souviennent !

Chacha, merci à toi pour les journées plage, les soirées durant lesquels on a longuement discuté. Merci pour les petites pauses de la journée, même si on n'en a pas prises souvent (on a trop travaillé durant tout ce temps). On a pu longuement parler de nos soucis tous les deux (mais pas que ça heureusement) et les transformer en choses fuites qu'on jette par-dessus nos épaules. Merci de m'avoir écouté et d'avoir été une amie présente. Juste un regret, on n'a pas fait assez de sorties ensemble. Mais les quelques mois nantais restant on va en profiter !!

Popie, merci à toi qui est arrivé plus tard mais avec qui j'ai très vite sympathisé. Toi qui m'a fait découvrir le Canotier, alors que j'habitais en face, mais surtout tu m'as fait découvrir pleins de gens super sympa, Vinc', Bobo, Vaness, Wiwi ! On aura bien rigolé toutes ces soirées et toutes ces journées basées sur le thème de la tranquilitude... Bonne bouffe, détente... hum mumh Humm ;) Tu es une vraie amie que je vais garder précieusement (pas que pour moi j'en laisse aux autres) et passes nous voir en vacances ;). Merci beaucoup pour toutes ces soirées finies tôt le matin pour pouvoir attaquer une bonne journée de travail. Je suis halluciné ^^ Merci de ne pas te prendre la tête, reste comme tu es (de la tête au pieds en passant par ...rrhooo ;)) et à bientôt à Houat ou au canotier c'est plus près !

Chamapoulpe, ma petite chamapoupinette !! La chasse au silure va se terminer mais j'espère bien continuer à la pratiquer quant on aura l'occasion de se revoir ;) Merci à toi pour les phrases qui sortent trop vite des chamaneuronnes et qui se transforment en franches rigolades. Merci pour ta bonne humeur et ton rire ;) Merci pour les soirées chez toi... tisanes (bières ??

nooon pas nous). Le même regret que pour Chacha, on a pu eu le temps de faire plus de sortis ensemble. Ce n'est que partie remise. Longue vie au jus de fraise !!

Mémé, aaah ma petite Mémé (ou Mél pour les gens moins intimes ;)). Ton petit sourire me manque quand je passais devant le bureau pour aller maniper. Nos petits délires avec les rouleaux de scotch (chuuut...), nos prises de becs parce qu'on est tout les deux des béliers, le canard fantôme végétal désarticulé... J'espère que d'ici à ce que tu lises ce mot j'aurai eu l'occasion de voir cette magnifique ville qu'est Abbaretz ou Barré ou Jenesaikwa (si ça s'écrit comme ça). En tout cas j'aurai bien apprécié ta présence qui a mis un peu de folie dans ce labo (pas au départ car tu n'osais pas montrer ta vraie nature, petite dévergondée). Mais ta jeunesse, ta patate et ta bonne humeur ont apporté que des bonnes choses. En tout cas on se reféra de vraies parties de cartes, jusqu'au bout ;) C'est chanmé, et j'oserai même un « ça envoie du keusté ! ».

Samia, merci pour les parties de fléchettes endiablées, mais beaucoup moins que les parties de trivial poursuite wii. Bon courage à toi pour ta nouvelle vie dans l'est de la « France ». Merci également à **Elise** qui va revenir quand on s'en va mais avec qui on a bien profité avant son départ. Merci pour ton côté pharma qu'on aimé bien titiller et on attend toujours la crêmaillère ;)

Merci à **Marion**, merci de m'avoir initié au western blot, merci pour tes conseils scientifiques mais aussi humains. Et après en avoir longtemps parlé avec toi autour de Fischer côté plage, je l'aurais finalement faite cette thèse !! Bonne continuation au Canada.

Les filles d'histo (U791), merci à vous trois pour avoir su m'apporter votre aide technique et vos conseils. Merci d'avoir pris du temps pour me former à l'histo. Merci Framboise pour nos moments passés à l'analyse d'image, Sophie pour les moments de coupes de folie et Julie chez qui je ne serais jamais allé (vilaine grippe A). Merci à vous trois pour les bons moments de bureau et les autres et gardez votre bonne humeur.

Paulo, merci au grand sachem de la microscopie. Merci pour tes précieux conseils scientifiques et pour tes goûts musicaux. Merci d'aimer ce que tu fais et d'être pointu dans ton domaine. Merci également pour tes formations éclairées où il fallait tout assimiler très vite (ctrl+F, ctrl+Alt Gr+#+F1+STOP+RETOUR+¤+T'es perdu c'est bon ?+on continue). Mais bon, tu étais là en cas de besoin donc merci pour ça.

Merci **JMB** (anonymat oblige), merci pour les sorties préfaillennes, pour ton gout des bonnes et belles choses, pour mes deux allergies aux crabes, pour les huîtres, le blanc et les blagounettes...

Merci à toutes ces autres personnes présentes, parties, revenues, arrivées, en transition etc. on aura bien sympathisé et ce fut très agréable. Merci à **Sergio** (qui pense comme nous ;)), **Marco** (la star des jeux de mots), **Verena** (ich muss pinkeln), **Amhed** (frangin), **Claire**, **Jérôme** (encadrant de boulot et de ski), **Nicolas** (slip sur la tête), **Nicolas bis** (vive la GFP), **Zahi**, **Julien**, **Anne**, **Fan**, **Véro**, **Cyril**, **Clémence**, **Damien** et j'en oublie et je m'en excuse.

Merci à mes petits tourangeaux, **Alain**, fournisseur officiel de CSM et de bonne humeur, jamais de prise de tête, toujours dispo, toujours efficace. Bonne route à toi, Nathalie et Awen, où que vous alliez. **Julien**, merci pour ton aide lors des manips, merci pour les délires passés et pour la douceur du napalm. Bonne route à vous, Christelle et toi. Merci également à vous tous pour les BBQ. Merci à notre grecque national, **Harris** Pontiglouglou ;o), merci pour les premiers jours à Tours durant lesquels on a pu parler longuement de la société et des gens en

général, que de phylo-psychologisme. Bonne continuation à toi. **Emilie**, ma petite marthopédiste, merci à toi pour tout, la piscine, les soirées, l'aide et le « dépannage » quand j'en avais besoin. Merci pour ton humour, pour la déco de mon bureau et pour avoir partagé mes délires de dessins animés !! Vives les barbapapas, et bonne continuation à Clocheville !! **Aurélie**, merci à toi aussi pour la déco de mon bureau, pour ta bonne humeur et pour avoir pu jouer avec ton furet ;) Bonne route à toi. **Marie** pas très longtemps au labo mais on a passé de bonne soirées, attention au champagne (que du bon) et bonne thèse parisienne. Merci à **Christine** (et le labo jusqu'à plus de minuit), **Tatiana, Marie-Christine, Angélique, Elfi, Amina, Guillaume, Louis-Romé** et pardon aux personnes que j'oublie.

Merci à l'équipe U957 avec qui ont a rapidement sympathisé...

Tout d'abord merci à mes coloc' de bureau. **Valérie, Séverine, Céline et Yannick**. Bravo de m'avoir supporté mais ça n'a pas été trop dur car vous êtes des crèmes les filles ;) Yannick aussi sans être une fille, bonne retraite à toi. Bon courage à vous et je vous souhaite de prochains colocataires, peut être moins foufou ;) Enfin surtout merci et bravo à **Bébé** pour avoir du subir mes chansons et ma folie jusque tard le soir (oui parce que de bon matin c'était moins facile). Merci à toi pour la musique du soir et ta bonne humeur... Bon courage pour ta thèse commençante, moi je quitte le navire. Tintindin din din din dindin diiiiiinnn PPOOUUETTT !!

Merci à **Julie (T.)** pour avoir supporté mes blagues, ma main sur ta tête et la bise... le matin ET le soir. Je ne sais pas si j'aurai réussi à instaurer le bonjour/aurevoir au labo mais j'aurai essayé ;) Merci pour les soirées « voisins », pour ta bonne humeur et ton rire ;) Bon courage pour la fin de ta thèse et essaie de ne pas trop embêter Franck (surtout que vous êtes presque voisin vous aussi).

Merci à **tonton Regio**, qui a pu tout de suite m'orienter et me guider dans le labo avec tes petites vannes sympatooches que je n'hésitais pas à te rendre (et oui, gros relou 2010 c'est moi, mais je passe le flambeau... à toi de bosser pour le reprendre). Par contre dommage que ton anniversaire ne soit qu'une fois par an...

Merci à la team REBORN, **Jérôme, Audrey et Annie**, vous m'aurez bien aidé sur la fin avec vos pitites mains. Dommage que vous ne soyez pas arrivé plus tôt car le démarrage n'a pas été facile pour vous dans le stress et la pression des fins de thèses. Menez bien le projet et bon courage à vous 3.

Merci à tous les autres pour leur sympathie et leur humour, **Gatien** (bonjour à ma cousine quand tu la verras), **Julie (R.)** la super skieuse en folie, **Julie (C.)** et les petites pauses, **Laura** (chercheuse de clefs), **Marco, Carmen, Pierre, Steven, Manue, Jimmy, Soizic, Aurélie, Marion, Romain, Gaëlle, Etienne, Ludo, Stéphane, Franck** (Vive les poron), **Dominique** (Leader one), **Fred, Marc, Françoise** (Mice Leader), **Martine** (Primer Master), **Anne** (bonne retraite) et j'en oublie et encore une fois je m'en excuse...

Enfin, toutes ces personnes qui comptent pour moi, qui n'ont pas forcément participé directement à la réalisation de cette thèse mais qui lors de soirées, de weekends, de vacances ont permis de se changer les idées pour revenir au labeur de façon plus efficace et de finalement réussir à passer toutes ces années avec le sourire.

Merci aux rennais, merci **Caro** pour ces années de bons moments, **Mimi, Bubu les Choupis, Titi, Wawawww**, merci à vous tous pour ces excellents délires et souvenirs et pour les prochains.

Merci aux autres rennais, **Ben, Victor, Laure, Erwan, Ronan, Pierre, Julien, Elise, Elodie, Marianne, Claire, Fabinou**... même si on ne se voit plus assez souvent on passe à chaque fois de bons moments.

Je tiens à remercier le groupe Teissowski pour tous nos délires de jeunesse mais aussi pour leur participation à cette thèse (surtout en termes de graphisme). **Roro** (The brain, Bibiphoque) & **Carotte, Coco** (Psykokwak) & **Charlène, Sylvain** (Skylv, Cityhunter) & **Stéph, Dr. Nico** (Prince Eristoff), **Alexis** (Siberian Special Forces, Venon le symbiote) & **Adèle**. Merci à vous et à Freddie Mercury (n'en déplaise aux filles) pour tous ces moments excellents qu'on a passé et qui vont continuer. J'ai hâte que l'on défi à nouveau « les gars » lors de joyeux Paladins !! Attention les ptits zaliens, voici le pilote d'hélico et Kaparaaa ;) Non toi t'es thon du taureau !!

Merci également aux amis que j'ai pu rencontrer grâce à Julie : **Nono, Marcu, MA & Thomas, Cécile & Benji, Nabou & Marama, Marlène & Mao, Aurél' & Stéph, Marion, Elo, Marie & Ludo, Lucie & PE** merci de m'avoir « adopté » et j'espère qu'on arrivera à se retrouver tous ensemble malgré la distance...

Les souris nude... merci de votre contribution et votre dévouement. Merci aux bistrots nantais, la plage, le Tiki, le Vestiaire, le Canotier, le Buck...moments de détente, de retrouvailles et de décompression.

Bien entendu je remercie toute **ma famille** (une bien belle famille que j'adore) et plus particulièrement **ma mère, mon père et mon frère** (ce grand fou de Nusty Ben) qui ont toujours été là pour les bons et les mauvais moments. Merci de m'avoir soutenu du début à la fin de cette thèse, pour vos conseils et je sais que vous me soutiendrais encore pour les prochaines étapes qui nous attendent.

Et enfin (last but not least), **Julie** (beaucoup de Julie remerciées dans ce manuscrit mais voici bien la plus importante). Merci à toi qui a contribué directement et indirectement à la réalisation de cette thèse. Merci à toi pour le bonheur que tu m'apportes, la motivation que tu m'as procurée durant ces années et merci de m'avoir supporté dans mes moments de fatigues (ronchonchon) et d'avoir supporté mes horaires impossibles. Merci aussi d'accepter ma folie quotidienne avec autant de patience. Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre. Mais merci d'être à ton tour un peu folle parfois. Pas besoin d'en faire long car tu sais ce que tu représentes pour moi. Qui sait où nous serons dans quelques mois, dans quel pays et dans quelle situation professionnelle mais tu sais bien que..... l'important c'est d'être ensemble !!!! ;)

Thomas CORDONNIER

Associations Cellules Souches Mésenchymateuses et Céramiques pour l'Ingénierie Tissulaire Osseuse

Résumé

Les affections ostéo-articulaires concernent des millions de personnes. L'ingénierie tissulaire osseuse, associant cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) et matériaux synthétiques, pourrait répondre aux besoins cliniques. Pour cela, les différentes composantes de cette approche et leur association doivent être mieux étudiées pour la rendre utile cliniquement. Durant cette thèse, une première étude animale proche du cas clinique nous a permis de définir les points à améliorer pour le traitement des pertes osseuses. Nous avons ainsi pu développer un milieu spécifique induisant une différenciation rapide et terminale des CSM en ostéoblastes. Par la suite, l'utilisation de particules de céramiques comme support cellulaire nous a permis d'obtenir des hybrides riches en matrice extracellulaire. Cet environnement 3D biomimétique permet l'engagement spontané des CSM vers un phénotype ostéoblastique et l'obtention d'une quantité osseuse importante *in vivo*. L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance de l'environnement et du stade de différenciation cellulaire pour la formation osseuse par ingénierie tissulaire osseuse.

Mots clefs : cellules souches mésenchymateuses humaines, céramiques phosphocalciques, différenciation ostéoblastique, environnement tridimensionnel, biomimétisme, régénération osseuse, ingénierie tissulaire osseuse.

Abstract

Osteo-articular disorders affect millions of people over the world. Bone tissue engineering, an approach combining human mesenchymal stem cells (MSC) and synthetic materials, could potentially fulfill clinical needs. However, the different components of this approach and their association should be investigated further to make it clinically useful. In this thesis, an initial animal study close to clinical situation allowed us to identify areas that need improvement for regenerating bone defect. We were then able to develop a specific medium which induces a rapid and terminal osteoblastic differentiation of MSC. Subsequently, the use of ceramic particles as cell support has allowed us to obtain hybrid mainly composed of extracellular matrix. This biomimetic 3D environment allows spontaneous osteoblastic commitment of MSC and induces a large bone quantity *in vivo*. Overall, these results highlight the importance of the environment and the cell differentiation state for bone formation using bone tissue engineering.

Keywords: mesenchymal stem cells, phosphocalcic ceramics, osteoblastic differentiation, three-dimensional environment, biomimetism, bone regeneration, bone tissue environment.