

Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n°=1853

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX II

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2011 par

Charlotte LALANDE

Née le 07/05/1986 à Sarlat la Canéda

**DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU PRODUIT D'INGENIERIE
TISSULAIRE OSSEUSE A BASE DE POLYMERES ET DE CELLULES
SOUCHES DU TISSU ADIPEUX**

Membres du jury

Dr. Didier LETOURNEUR, Paris, **Examineur**

Dr. Arnaud SCHERBERICH, Bâle, **Examineur**

Pr. Michel DROUET, Grenoble, **Examineur**

Dr. Jérôme GUICHEUX, Nantes, **Rapporteur**

Pr. Pierre HARDOUIN, Boulogne-sur-Mer, **Rapporteur**

Dr. Joëlle AMEDEE, Bordeaux, **Directeur de Thèse**

RESUME

L'ingénierie du tissu osseux vise à concevoir un substitut tissulaire associant des cellules ostéoprogénitrices à une matrice tridimensionnelle capable de promouvoir la reconstruction osseuse, ouvrant la voie au développement de thérapeutiques substitutives à la pratique de la greffe dont les limitations sont bien connues.

Le but de ce travail a été de développer un nouveau produit d'ingénierie tissulaire (PIT) destiné à la régénération osseuse constitué i) d'une matrice tridimensionnelle poreuse constituée de polysaccharides naturels biodégradables, ii) de cellules souches adultes issues du tissu adipeux humain (ADSCs) et d'identifier les conditions de culture optimales permettant le développement d'un produit fonctionnel pour une utilisation clinique.

Nos résultats montrent que l'architecture et la composition de la matrice macroporeuse polysaccharidique permet de guider la différenciation ostéoblastique des ADSCs, en l'absence de facteurs ostéogéniques, et notamment en conditions de culture dynamique, grâce à l'organisation cellulaire en agrégats promouvant les interactions cellulaires.

Les ADSCs peuvent être marquées à l'aide de nanoparticules superparamagnétiques et suivies *in vivo* de façon non invasive par imagerie par résonance magnétique (IRM) au sein des matrices après leur implantation en site sous-cutané chez la souris. Les images IRM montrent que le matériau permet de délivrer une partie des cellules au niveau du site d'implantation participant probablement à un processus de réparation tissulaire.

Enfin, en vue d'applications cliniques, un milieu de culture sans sérum répondant aux conditions GMP (Good Manufacturing Practices) pour la différenciation ostéoblastique a été développé par un industriel et validé au cours de ce travail de thèse.

En conclusion de ces travaux, l'association d'une matrice macroporeuse composée de polysaccharides avec des ADSCs dans des conditions de culture spécifiques, en conditions dynamiques, semble pertinente et prometteuse pour des applications cliniques en ingénierie du tissu osseux.

Mots-clefs: ingénierie tissulaire osseuse, cellules souches mésenchymateuses adultes issues du tissu adipeux humain, culture tridimensionnelle, matrice poreuse de polysaccharides, contraintes mécaniques, différenciation ostéoblastique, imagerie par résonance magnétique, nanoparticules superparamagnétiques, milieu de culture défini.

ABSTRACT

Bone tissue engineering may associate osteoprogenitor cells to a tridimensional scaffold that can promote tissue reconstruction in order to replace bone grafting strategies whose limitations are well known.

This study aims to develop a new tissue-engineered construct for bone regeneration constituted by i) a tridimensional polysaccharide-based scaffold, ii) adult stem cells extracted from human adipose tissue and identify the best culture conditions needed to develop a functional construct for clinical use.

Our results show that this macroporous scaffold offers, without any osteoinductive factors, a suitable architecture and composition for driving osteoblastic differentiation of ADSCs especially when placing the tissue-engineered construct in dynamic conditions, thanks to cell aggregate conformation promoting cell-to-cell interactions.

Thanks to ADSCs labeling, the tissue-engineered construct can be tracked *in vivo* in a non invasive way by magnetic resonance imaging (MRI), after their subcutaneous implantation. Results evidenced that this scaffold behaves as a cell carrier for of holding in its own cell fraction and delivering another fraction to the site of implantation for inducing a better tissue regeneration process.

Finally, a serum free medium meeting standards GMPs (Good Manufacturing Practices) has been developed for inducing ADSCs osteoblastic differentiation as a first step towards clinical application.

In conclusion, this polysaccharide-based scaffold associated with ADSCs, cultured under low fluid flow in a new bioreactor device, could be a relevant and promising tissue engineered construct for bone tissue engineering applications.

Keywords: bone tissue engineering, adult stem cells extracted from human adipose tissue, tridimensional culture, polysaccharide-based porous matrix, mechanical stress, osteoblastic differentiation, magnetic resonance imaging, superparamagnetic nanoparticles, chemically defined medium.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	6
INTRODUCTION	8
I. Le tissu osseux et sa physiologie	9
A. Les fonctions du tissu osseux	9
B. Les structures osseuses	10
1. L'os fibreux ou tissé	11
2. L'os lamellaire	11
3. L'os cortical ou os compact	11
4. L'os trabéculaire ou os spongieux	11
C. Les éléments cellulaires dans le tissu osseux	12
1. Les ostéoblastes	13
2. Les cellules bordantes	13
3. Les ostéocytes	14
4. Les ostéoclastes	14
D. La matrice extracellulaire	16
1. La matrice minérale	16
2. La matrice organique	16
a) Les protéines collagéniques	16
b) Les protéines non collagéniques	17
E. Le remodelage osseux	21
F. La vascularisation dans le tissu osseux	22
II. La physiologie de la réparation osseuse	24
A. Ontogenèse et réparation osseuse	24
B. Les différents types de réparation osseuse	25
1. Réparation osseuse indirecte ou endochondrale	25
2. Réparation osseuse directe ou intramembranaire	26
C. Les phases de la réparation osseuse	26
1. Phase inflammatoire	27
2. Vascularisation	28
3. Formation du cal	28
4. Minéralisation du cal	28
5. Remodelage	28
D. Les acteurs de la réparation du tissu osseux	29
1. Les acteurs cellulaires	29
a) Les ostéoprogéniteurs issus du périoste	29
b) Les cellules bordantes	29
c) Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse	29
d) Les cellules des tissus mous et des tissus conjonctifs environnants	30
2. Le micro-environnement biochimique	30
a) Les facteurs solubles	30
b) Les protéines matricielles du tissu osseux	37
3. Les forces mécaniques et leur rôle dans le processus de réparation osseuse	38
III. Les stratégies de réparation du tissu osseux	40
A. Problématique clinique	40
B. Les greffes osseuses	40
1. Les différents types de greffons	41
a) Les greffons spongieux	41
b) Les greffons corticaux	41
2. Les différents types de greffes	41
a) L'autogreffe	41
b) Les alternatives à l'autogreffe	42
c) Les greffes vascularisées	42
C. Du biomatériau de comblement osseux à l'ingénierie tissulaire osseuse	43
IV. L'ingénierie tissulaire osseuse et ses acteurs	44
A. Les biomatériaux	45
1. Le cahier des charges des matériaux de substitution osseuse	45
2. Les différents biomatériaux de substitution osseuse actuels	47

B.	La composante cellulaire des produits d'ingénierie tissulaire osseuse	50
1.	Le choix du type cellulaire pour des applications en ingénierie tissulaire	51
a)	Les cellules souches embryonnaires	51
b)	Les cellules souches adultes	52
2.	Les facteurs d'induction de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses	56
a)	Les milieux d'expansion	56
b)	Les milieux de différenciation	57
C.	Les facteurs bioactifs en ingénierie du tissu osseux	61
D.	Les contraintes mécaniques	62
V.	Les stratégies de vascularisation des implants osseux	63
A.	La pré-vascularisation <i>in vivo</i> de matrices 3D	64
B.	Fonctionnalisation de matériaux par des facteurs angiogéniques	65
C.	Pré-vascularisation <i>in vitro</i>	66
VI.	Validation préclinique des biomatériaux et des produits d'ingénierie tissulaire : études expérimentales du petit au gros animal	67
A.	Les modèles animaux et les lésions osseuses	68
B.	Les sites d'implantation et leur fonction	68
C.	Les méthodes d'investigation du tissu néoformé	70
OBJECTIFS		76
RESULTATS		80
I.	Etude de la différenciation ostéoblastique des ADSCs associées à une matrice tridimensionnelle, à base de polymères naturels et soumises à des contraintes mécaniques	82
A.	Introduction	82
B.	Article 1: Stimulation de la différenciation ostéoblastique des cellules souches issues du tissu adipeux humain associées à une matrice macroporeuse de polysaccharides et cultivées en conditions dynamiques	83
C.	Conclusion	106
II.	Etude du suivi longitudinal des ADSCs au sein de la matrice tridimensionnelle de polymères, par imagerie par résonance magnétique	109
A.	Introduction	109
B.	Article 2: Suivi par IRM des ADSCs associées à une matrice polysaccharidique pour l'ingénierie tissulaire osseuse	111
C.	Conclusion	131
III.	Développement d'un milieu défini pour la différenciation ostéoblastique des ADSCs	133
A.	Introduction	133
B.	Article 3: Développement d'un milieu défini pour la différenciation ostéoblastique des ADSCs	135
C.	Conclusion	150
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		151
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES		157
BIBLIOGRAPHIE		158

LISTE DES ABREVIATIONS

βGP: β-glycérophosphate	Micro-CT: micro-Computed Tomography
3D: 3 dimensions	MION: Monocristalline Iron Oxyde Nanoparticles
ADSCs: Adipose-derived Stem Cells	MMP: MétalloProtéinases Matricielles
Afssaps: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé	NO: Oxyde Nitrique
ALK: Activin receptor-Like Kinase	NTP: Nucléotides Tri-Phosphate
ALP: ALkaline Phosphatase	OC: Ostéocalcine
BMP: Bone Morphogenetic Protein	OMS: Organisation Mondiale pour la Santé
BPF: Bonnes Pratiques de Fabrication	ON: Ostéonectine
BRU: Bone Remodeling Unit	OPG: Ostéoprotégérine
BSP: Bone SialoProteine	OPN: Ostéopontine
Cbfa/runx2: Core-Binding Factor A1/Runt-related transcription Factor-2	PAL: Phosphatase ALcaline
Cfu-f: Colony forming unit-fibroblast	PDGF: Platelet Derived Growth Factor
Col1a1: collagène de type 1 alpha-1	PEG: PolyEthylèneGlycol
Co-Smad: Common mediator-Smad)	PF-4: Platelet Factor-4
CSM: Cellule Souche Mésoenchymateuse	PG: ProtéoGlycanes
CSH: Cellules Souche Hématopoïétique	PGA: Poly (Glycolic Acid)
Cx43: Connexine 43	PGE2: Prostaglandine de type 2
DAPI: 4', 6'-diamidino-2-phenylindole	Pi: Phosphate inorganique
ERK: Extracellular Regulated Kinase	PIT: Produit d'Ingénierie Tissulaire
ET-1: Endothéline de type 1	PLA: Poly (Lactic Acid)
FGF: Fibroblastic Growth Factor	PIGF: Placenta Growth Factor
GAG: GlycosAminoGlycanes	PTA: Produits Thérapeutiques Annexes
GFP: Green Fluorescent Protein	PTFE: PolyTétraFluoroEthylène
GMP: Good Manufacturing Products	PTH: Hormone ParaThyroïdienne
GVHD: Graft Versus Host Disease	RANKL: Receptor Activating NF-κB Ligand
HA: Hydroxyapatite	RGD: Arginine-Glycine-Acide Aspartique
HGF: Hepatocyte Growth Factor	RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
HIF: Hypoxia Inducible Factor	SDF-1: Stromal Derived Factor-1
HMPC: HydroxyPropylMéthylCellulose	SLRP: Small Leucin-Rich Proteoglycan
HUCBS: Human Umbilical Cord Blood Serum	SPIONS: SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticle
HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells	SVF: Stromal Vascular Fraction
IGF: Insulin Growth Factor	TCP: Phosphate TriCalcique
iPS cells: induced Pluripotent Stem cells	TEMP: Tomographie par Emission MonoPhotonique
IRM: Imagerie par Résonnance Magnétique	TGF: Transforming Growth Factor
LIF: Leukemia Inhibitory Factor	TNF: Tumor Necrosis Factor
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor	TRAP: Phosphatase Acide Tartrate Résistante
MEC: Matrice ExtraCellulaire	USPIO: Ultrasmall SuperParamagnetic Iron oxide
MGP: Matrix Gla Protein	VEGF: Vascular endothelial Growth Factor
	vwf: Facteur de Von Willebrand

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1. Structure des os longs	10
Figure 2. Exemple d'os fibreux et lamellaire dans un processus de réparation d'une lésion de l'os cortical chez la souris	10
Figure 3. Les types d'os et leur organisation.....	11
Figure 4. La différenciation des cellules souches de la moelle osseuse	12
Figure 5. Expression des marqueurs ostéoblastiques au cours de leur différenciation	13
Figure 6. Culture d'ostéocytes murins issus d'os longs.....	14
Figure 7. Différenciation des cellules ostéoclastiques	15
Figure 8. La résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes	15
Figure 9. Ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire	16
Figure 10. Schéma représentatif de l'assemblage du collagène de type I.....	17
Figure 11. Structure primaire et secondaire de l'ostéopontine.....	18
Figure 12. Structure secondaire de la BSP	19
Figure 13. Rôle de la phosphatase alcaline (PAL) dans la minéralisation	20
Figure 14. Cycle du remodelage osseux.....	21
Figure 15. La vascularisation osseuse	23
Figure 16. Les modes de communication entre les cellules	23
Figure 17. Les différents types de réparation osseuse	25
Figure 18. Modifications de la composition de la MEC au cours de la réparation endochondrale	26
Figure 19. Voie de signalisation induite par les BMPs	33
Figure 20. Régulation de l'expression de facteurs ostéoblastiques par la voie de signalisation FGF/FGFR lors de l'ostéogenèse.....	34
Figure 21. Principe de l'inhibition de l'activité des métalloprotéases matricielles par les TIMPs	36
Figure 22. Mécanismes d'activation des MMPs conduisant à la protéolyse de la MEC.....	37
Figure 23. Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire	38
Figure 24. Les mécanorécepteurs des ostéoblastes	39
Figure 25. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire	44
Figure 26. Les étapes de l'ingénierie tissulaire	44
Figure 27. Les propriétés du biomatériau face aux considérations biologiques du tissu osseux	45
Figure 28. Les céramiques phosphocalciques.....	48
Figure 29. Culture et différenciation ostéogénique des cellules souches embryonnaires.....	51
Figure 30. Caractère multipotent des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse	53
Figure 31. Procédure d'extraction des ADSCs à partir du tissu adipeux.....	54
Figure 32. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 et gènes activés transcriptionnellement par HIF-1	60
Figure 33. Les différents types de bioréacteurs.....	63
Figure 34. Stratégies de pré-vascularisation de l'implant osseux.....	64
Figure 35. Implantation sous-cutanée chez le rat d'un bloc d'hydroxyapatite avec insertion de l'artère et de la veine épigastrique inférieure dans le tunnel du biomatériau afin d'assurer sa vascularisation <i>in vivo</i>	64
Figure 36. Microtomographies aux rayons X	65
Figure 37. Coculture en contact direct de cellules endothéliales et ostéoblastiques	67
Figure 38. Lésion osseuse de taille critique au niveau de la calvaria.....	69
Figure 39. Modèle de lésion fémorale segmentaire stabilisée chez le rat	69
Figure 40. Lésion osseuse mandibulaire chez le chien.....	70
Figure 41. Colorations de coupes histologiques au trichrome de Masson et au Von Kossa	71
Figure 42. Visualisation des cellules implantées.....	71
Figure 43. Immunomarquage sur des coupes histologiques après implantation d'un PIT.....	72

Figure 44. Détection de la luminescence produite par différentes densités d'ADSCs ou de BMSCs ...	72
Figure 45. Suivi longitudinal sur 90 jours de la luminescence produite par des BMSCs.....	73
Figure 46. Analyse de la reconstruction osseuse au sein de lésions crâniennes chez la souris par microtomographie aux rayons	73
Figure 47. IRM du condyle fémoral de souris 21 jours après induction de la lésion osseuse corticale	74
Figure 48. Visualisation par IRM d'un oedème de la dure mère au niveau de sites irradiés	74
Figure 49. Observations microscopiques de cellules ADSCs au sein de la matrice polysaccharidique en présence de milieu défini	150
Figure 50. Observation microscopique de la distribution des HBMSCs en monoculture et en coculture avec des progéniteurs endothéliaux issus du sang de cordon humain au sein de la matrice 24h après l'ensemencement	154
Figure 51. Observation au microscope confocal de l'immunomarquage de la Cx43 sur une cryocoupe de matériau	154
Figure 52. Immunomarquage du CD31 de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux après 10 jours de culture 2D	155
Tableau 1. Cinétique des événements cellulaires et expression des molécules de signalisation durant la réparation osseuse chez la souris.....	27

INTRODUCTION

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer un produit d'ingénierie tissulaire (PIT) constitué d'une matrice poreuse de polymères, associée à des cellules souches mésenchymateuses, susceptibles de régénérer un tissu osseux fonctionnel dans des lésions osseuses de grand volume.

Le développement de telles stratégies s'appuient sur les connaissances de la physiologie du tissu osseux et des acteurs qui contrôlent sa fonction. Le premier chapitre aura pour mission d'identifier les différents acteurs cellulaires, moléculaires, organiques et non organiques sollicités lors du développement osseux ou lors de sa réparation.

Dans cette revue bibliographique, nous décrivons la fonction et la structure du tissu osseux, en détaillant plus particulièrement les éléments cellulaires qui le composent, les mécanismes de son remodelage et sa vascularisation.

La physiologie de la réparation osseuse fera l'objet de la seconde partie de cette revue bibliographique. Les différentes étapes de la réparation seront décrites ainsi que l'implication des acteurs cellulaires et du micro-environnement biochimique.

La troisième partie présentera les différentes stratégies de réparation du tissu osseux, incluant les greffes osseuses et l'utilisation des biomatériaux de comblement osseux.

Dans une quatrième partie, nous nous attacherons à présenter les techniques d'ingénierie tissulaire et ses principaux acteurs.

La cinquième partie permettra d'aborder les différentes stratégies de vascularisation associées au développement d'un produit d'ingénierie tissulaire.

Enfin, la dernière partie sera consacrée aux études expérimentales, du petit au gros animal, et aux méthodes d'investigation du tissu néoformé.

I. Le tissu osseux et sa physiologie

A. Les fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme, tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. Il est le support mécanique essentiel du squelette, permet la locomotion. Il assure la protection des organes internes: le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres, tandis que le cœur et les poumons le sont grâce à la cage thoracique. Le tissu osseux joue également un rôle extrêmement important dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. En effet, notre squelette renferme environ 99 % du calcium et 90 % du phosphate de l'organisme. Enfin, le tissu osseux assure une fonction hématopoïétique grâce à la présence de la moelle osseuse qui contient en particulier les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines et immunitaires.

Ce tissu conjonctif, hautement spécialisé, est un tissu minéralisé, ce qui lui confère une certaine dureté et rigidité, bien qu'il ne soit pas pour autant « figé ». En effet, il s'agit d'une structure dynamique en perpétuel remaniement, capable de s'autoréparer, d'adapter sa densité, son contenu minéral, sa forme et ses propriétés intrinsèques, à des modifications d'ordre biomécanique et biochimique et de supporter une activité physique.

B. Les structures osseuses

Nous distinguons dans le squelette des vertébrés, les os longs (Figure 1A) (fémur, tibia, ulna ou cubitus, fibula ou péroné), les os courts (Figure 1B) (vertèbres, carpes, tarses) et les os dits plats (Figure 1C) (os du crâne et de la face, le sternum, la scapula ou omoplate).

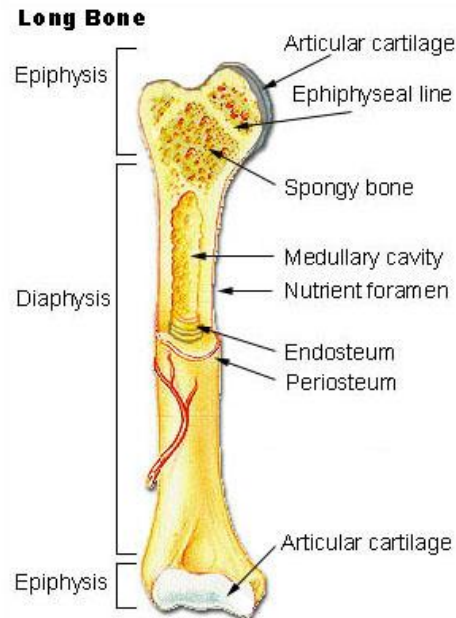


Figure 1. Structure des os longs.

Les os longs sont constitués de plusieurs parties (Figure 1A). Les deux extrémités sont appelées épiphyses, la partie centrale est nommée la diaphyse et la jonction entre ces deux parties est la métaphyse. La diaphyse se compose d'une cavité centrale occupée par la moelle osseuse et est tapissée d'une membrane appelée l'endoste. La diaphyse joue un rôle fondamental dans l'accroissement de l'os en épaisseur. Au niveau des métaphyses, se trouve la plaque de croissance, responsable de la croissance de l'os en longueur.

Du point de vue structural, l'organisation des fibres de collagène de la matrice extracellulaire et du minéral osseux déterminent des structures élémentaires: l'os fibreux ou tissé et l'os lamellaire (Figure 2).

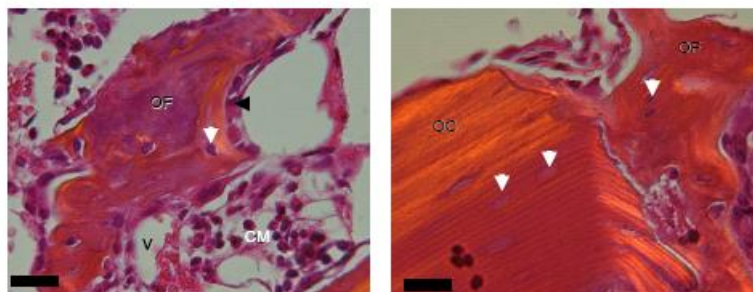


Figure 2. Exemple d'os fibreux et lamellaire dans un processus de réparation d'une lésion de l'os cortical chez la souris. Coloration Hémalum-Eosine-Safran et observation en lumière polarisée. Os cortical lamellaire (OC), os fibreux (OF), vaisseau sanguin (V), cellules mésenchymateuses (CM). Les flèches blanches représentent les ostéocytes, les flèches noires représentent les ostéoblastes. La barre représente 10 µm [Monfoulet, 2009]

1. L'os fibreux ou tissé

Il est caractéristique de l'os embryonnaire et des étapes précoces de la réparation osseuse. C'est un os composé d'une matrice extracellulaire rapidement déposée, constituée d'épaisses fibres de collagène entrecroisées, sans organisation spécifique et renferme quelques ostéocytes. Ce type d'os est rapidement remplacé par de l'os lamellaire.

2. L'os lamellaire

Il présente une organisation régulière constituée de fibres de collagène organisées de façon parallèle, lui conférant des propriétés mécaniques supérieures à celles de l'os fibreux.

Chez l'adulte, quel que soit le type d'os, long, court ou plat, deux structures de base sont observées dans l'architecture du tissu : **l'os cortical ou compact** et **l'os trabéculaire ou spongieux** (Figure 3).

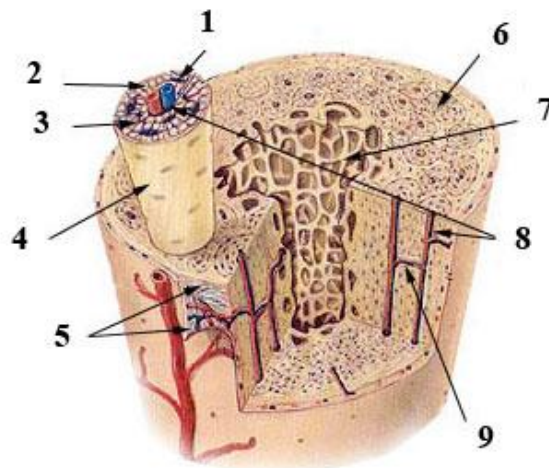


Figure 3. Les types d'os et leur organisation. 1: ostéoplastes contenant les ostéocytes ; 2: lamelle ; 3: Canalicule ; 4: Ostéon ; 5: périoste ; 6: Os compact ; 7: Os trabéculaire ; 8: Canaux de Havers ; 9: Canaux de Volkmann [Rouwkema, 2007]

3. L'os cortical ou os compact

C'est un os dense, poreux et constitué d'une matrice minéralisée de type lamellaire. Il est organisé en structures cylindriques appelés ostéons (Figure 3) [4] constitués de collagène. Les ostéons sont organisés autour des canaux de Havers (Figure 3) [8], eux-mêmes reliés entre eux par les canaux de Volkmann (Figure 3) [9], où cheminent les vaisseaux nourriciers de l'os. C'est un tissu riche en ostéocytes répartis de façon régulière. Cette partie de l'os est responsable en particulier de la réception des stimuli mécaniques et de la transmission de ces informations vers l'os trabéculaire par des signaux principalement de nature biochimique. L'os cortical est recouvert par le périoste (Figure 3) [5], la paroi la plus externe de l'os.

4. L'os trabéculaire ou os spongieux

Il est formé d'un réseau tridimensionnel de travées osseuses reliées entre elles, et dont l'orientation est générée par les forces mécaniques qui s'exercent sur l'os. La géométrie et la distribution des travées confèrent à l'os trabéculaire résistance et flexibilité. L'os trabéculaire représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels, présentant un renouvellement plus rapide que

celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique. L'os trabéculaire est également le lieu principal de l'activité métabolique du tissu osseux où réside l'activité des cellules osseuses, ostéoblastiques et ostéoclastiques. Ce type d'os est présent principalement au niveau des épiphyses des os longs, des os courts et dans les vertèbres (Figure 3) [7].

C. Les éléments cellulaires dans le tissu osseux

La moelle osseuse est le siège de production de deux grands groupes de cellules progénitrices :

- **les cellules souches hématopoïétiques** qui vont donner naissance aux cellules sanguines et immunitaires (érythrocytes, lymphocytes, granulocytes, macrophages, monocytes, mégacaryocytes) ainsi que les cellules du lignage ostéoclastique (Figure 4).
- **les cellules souches mésenchymateuses ou stromales** qui sont à l'origine de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondrocytes) et d'autres lignées progénitrices (fibroblastes, myoblastes, adipocytes, cellules endothéliales...), selon les stimuli biochimiques et/ou mécaniques auxquels elles seront soumises (Figure 4).

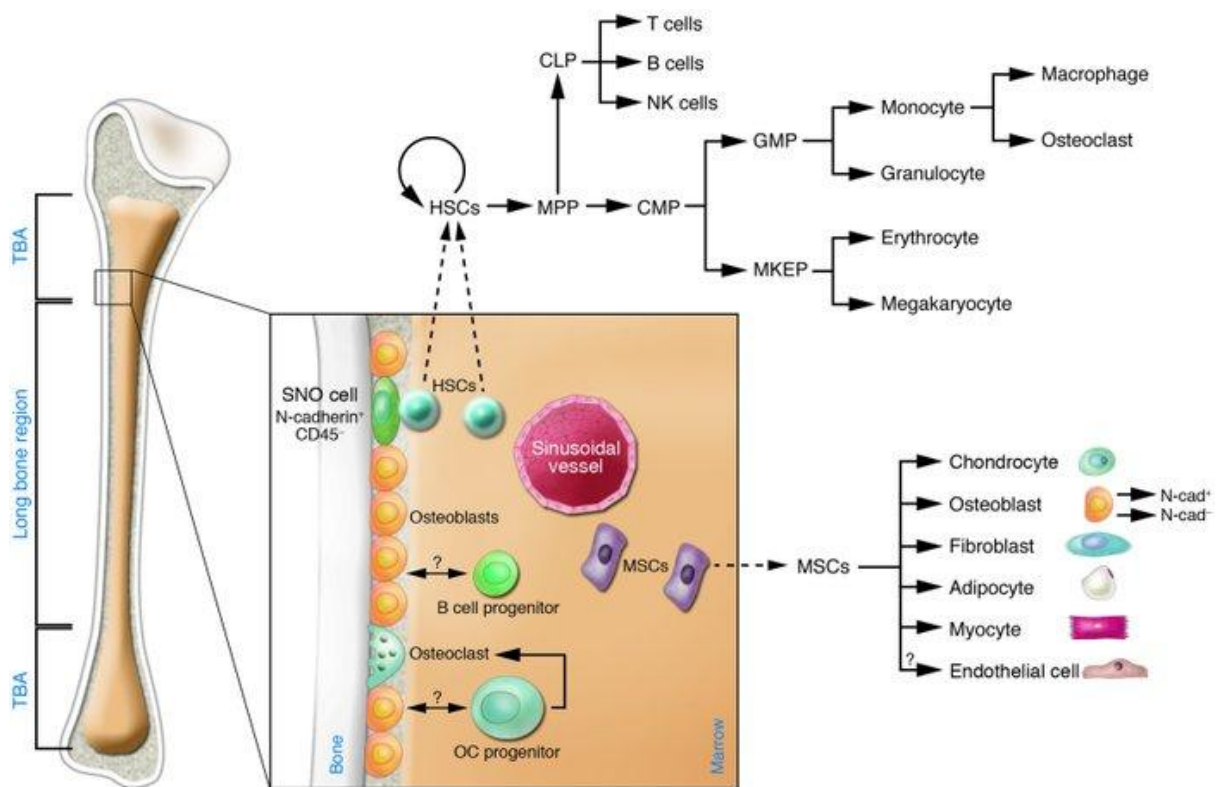


Figure 4. La différenciation des cellules souches de la moelle osseuse. HSCs : Hematopoietic Stem Cells (Cellules Souches Hématopoïétiques) ; MSCs : Mesenchymal Stem Cells (Cellules Souches Mésenchymateuses) [Yin and Li, 2006]

1. Les ostéoblastes

Ils dérivent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Figure 4). Cbfa/runx2, constitue le gène maître de la différenciation ostéoblastique. Il induit l'engagement des cellules mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique par l'activation des promoteurs des gènes spécifiques du tissu osseux, tels que: le collagène de type 1 alpha-1 (Col1a1), l'ostéocalcine (OC) la bone sialoprotéine (BSP) (Figure 5).

Cbfa/runx2, ALP, Col1a1, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1), ostéonectine (ON) et BMP-2 sont des marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique tandis que l'ostéocalcine (OC) et l'ostéopontine (OPN) sont exprimées plus tardivement. De façon plus précise, l'étape de minéralisation se traduit par la synthèse d'ostéocalcine associée à d'autres protéines matricielles comme l'ostéopontine ou encore l'ostéonectine.

L'absence totale d'expression de cbfa/runx2 conduit à une inhibition d'ossification [Yamaoka et al., 2006] à une maturation chondrocytaire altérée [Enomoto et al., 2000], et à une prolifération adipocytaire [Kobayashi et al., 2000].

Ostérix est un autre facteur de transcription indispensable à la différenciation ostéoblastique et au développement osseux [Nakashima et al., 2002]. Ostérix agirait en aval de cbfa1/runx2, principalement sur la différenciation terminale des ostéoblastes.

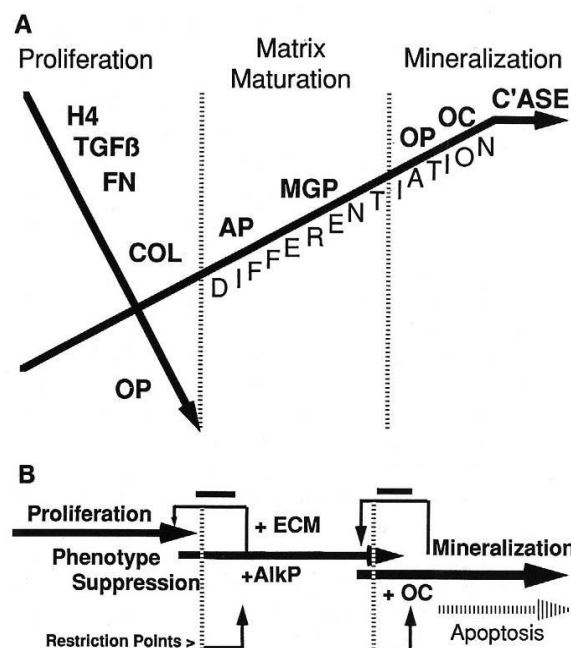


Figure 5. Expression des marqueurs ostéoblastiques au cours de leur différenciation. H4: Histone H4 ; TGF- β : Transforming Growth Factor β ; FN: Fibronectine; COL: Collagène; OP: Ostéopontine, AP (et AlkP): phosphatase alcaline; MGP: protéine Gla-matricielle ; OC: Ostéocalcine ; C'ASE: collagénase ; ECM: matrice extracellulaire [Bilezikian, 1996]

2. Les cellules bordantes

Les ostéoblastes peuvent s'allonger et former une couche cellulaire alignée le long des surfaces osseuses inactives, ces cellules sont appelées cellules bordantes. Elles émettent des prolongements cytoplasmiques qui établissent des contacts avec les ostéocytes superficiels. Elles sont couplées entre elles et aux ostéocytes par des systèmes jonctionnels de type « gap ».

Les cellules bordantes se comportent comme une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Elles jouent un rôle déterminant dans le remodelage osseux car elles libèrent des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs ostéoclastiques. La résorption de l'os, assurée par les ostéoclastes, serait en partie facilitée par les rétractations cytoplasmiques de ces cellules bordantes et par la sécrétion de collagénases, sous l'action de certaines hormones, comme la vitamine D (principalement son métabolite actif, le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou encore la PTH (Hormone ParaThyroïdienne).

Les cellules bordantes constituent également une source de cellules ostéoblastiques de réserve. Sous l'action de différents stimuli, comme la PTH, elles sont capables de se différencier en ostéoblastes actifs.

3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes matures, dérivant d'une différenciation terminale des ostéoblastes, emmurés dans la matrice minéralisée au sein de logettes appelées « ostéoplastes ».

De fins prolongements cellulaires (Figure 6) permettent aux ostéocytes d'être reliés entre eux et aux cellules de la surface de la travée osseuse par le biais de jonctions communicantes [Civitelli, 2008]. Ce réseau leur permet de transmettre les variations des stimulations mécaniques et biochimiques qui influencent le métabolisme osseux. Les contraintes mécaniques sont transmises de la partie corticale vers la partie trabéculaire de l'os où résident les activités métaboliques. Les ostéocytes ont une activité métabolique très faible, ils sont néanmoins capables de synthétiser du collagène de type I qui sera minéralisé secondairement.

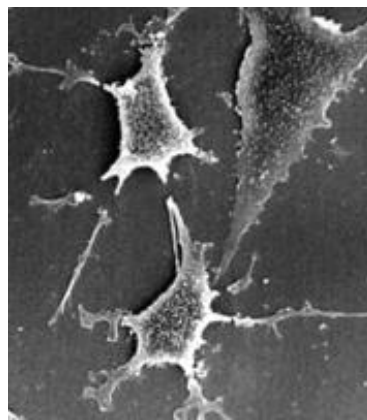


Figure 6. Culture d'ostéocytes murins issus d'os longs émettant des prolongements cytoplasmiques [Sorkin et al., 2004]

4. Les ostéoclastes

Ils dérivent de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocyttaire (Figure 7). Les pré-ostéoclastes fusionnent pour former des ostéoclastes matures multinucléés. La différenciation des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de différents facteurs de transcription (c-fos, NF- κ B) et de facteurs de croissance. Le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF) qui se lie à son récepteur (c-fms) agit précocement dans la différenciation et entraîne l'engagement des cellules dans la lignée ostéoclastique. Le « receptor activating NF- κ B Ligand » (RANKL), porté par la membrane des ostéoblastes ou des cellules stromales, se lie à son récepteur RANK et stimule la différenciation des pré-ostéoclastes en activant leur fusion et leur activation (Figure 7).

L'ostéoprotégérine (OPG), synthétisée par les ostéoblastes, est un récepteur soluble qui a la capacité de prévenir la différenciation et la maturation des ostéoclastes en se fixant au RANKL, inhibant ainsi la reconnaissance RANK-RANKL [Troen, 2003] (Figure 7).

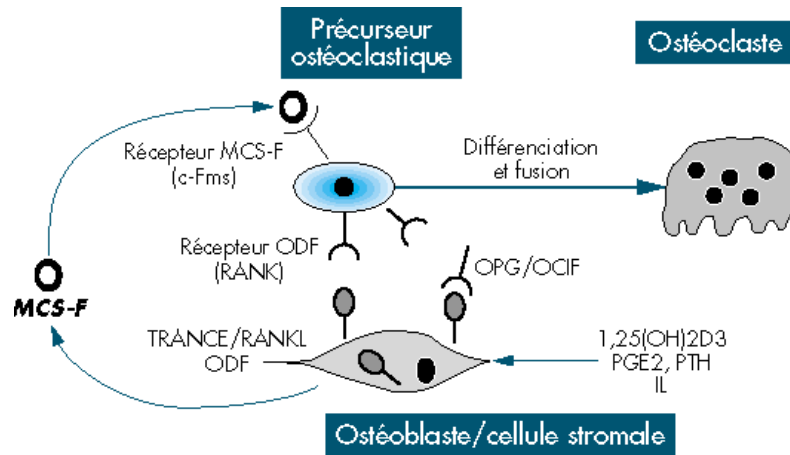


Figure 7. Différenciation des cellules ostéoclastiques [Marie, 1999]

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes d'environ 100 μm de diamètre et multinucléées. L'ostéoclaste libère de nombreuses enzymes lysosomiales par exocytose entre la surface osseuse et la membrane « plissée » ostéoclastique (Figure 8). Le pH acide (environ pH 4) dû à la sécrétion d'acides organiques, tels que des citrates et des lactates par l'ostéoclaste, favorise l'activité des enzymes hydrolases lysosomiales, comme la Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRAP), la cathepsine K et l'activité des métalloprotéases matricielles qui vont pouvoir dégrader la matrice collagénique. L'os résorbé laisse alors peu à peu la place à une lacune de résorption appelée « lacune de Howship ».

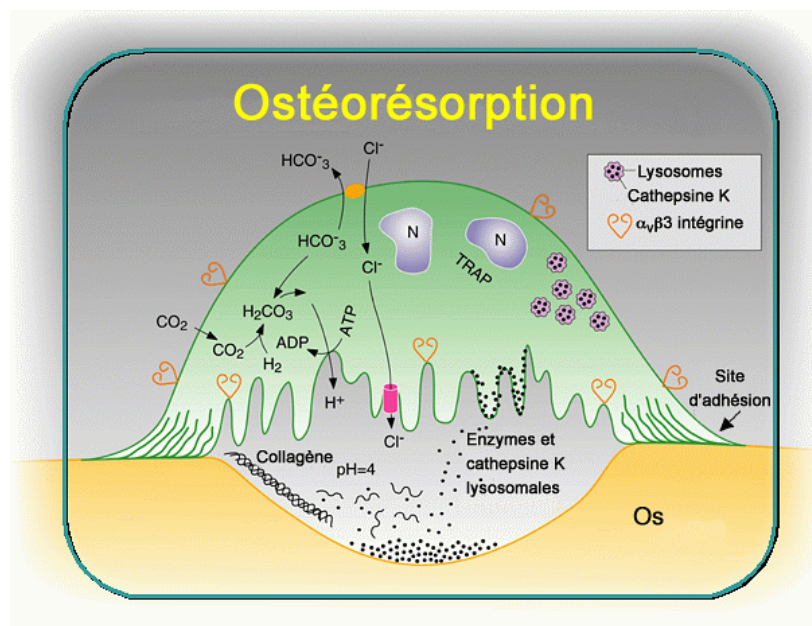


Figure 8. La résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes (www.merck.fr)

D. La matrice extracellulaire

L'os est un tissu conjonctif dont les éléments cellulaires sont inclus dans une matrice extracellulaire (MEC) occupant environ 90% du volume tissulaire. Elle est composée de deux fractions : une phase minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite, liée à une phase organique constituée principalement de collagène de type I (Figure 9).

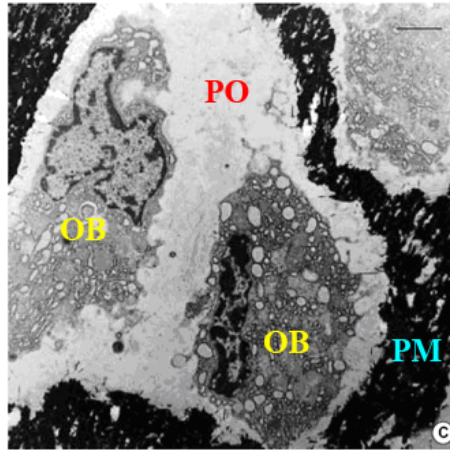


Figure 9. Ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire composée des deux phases : organique (PO) et minérale (PM). La barre d'échelle représente 2 μ m [Choi et al., 2002]

1. La matrice minérale

La phase minérale représente 50 à 70 % de la matrice osseuse. La phase minérale est constituée d'un cristal de phosphate de calcium complexe qui se dépose à l'intérieur des fibres de collagène de façon ordonnée. Le principal constituant de la substance minérale des tissus calcifiés est l'hydroxyapatite (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ associée à du carbonate de calcium. Le dépôt de la phase minérale des tissus calcifiés dans l'os est un phénomène dirigé par les cellules osseuses et par les interactions entre la phase minérale et la phase organique de la MEC. La matrice agit ainsi comme un agent de nucléation du cristal et comme un support servant à l'organisation de ces dépôts minéraux.

2. La matrice organique

Elle se compose principalement de protéines collagéniques et de protéines non collagéniques :

a) Les protéines collagéniques

La molécule de collagène de type I dit fibrillaire, est prépondérante dans la MEC osseuse. Elle est constituée d'une triple hélice correspondant à un enchevêtrement de deux chaînes identiques $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ (Figure 10). Les molécules s'alignent ensuite dans la matrice extracellulaire pour constituer les fibres de collagène (Figure 10) créant des « vides », servant de sites de nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite.

Les fibres de collagène sont stabilisées par des pontages mis en place entre deux ou trois chaînes, au sein même des molécules mais aussi entre deux molécules. Ces pontages contribuent aux propriétés mécaniques de la trame matricielle.

Les collagènes de type III, V et X sont également présents dans le tissu osseux à l'état de trace et plus particulièrement lors de certaines étapes de la formation osseuse. Le collagène de type V

constituerait avec le type I des fibres hétérotypiques, dont il pourrait réguler l'assemblage et la croissance [Birk, 2001].

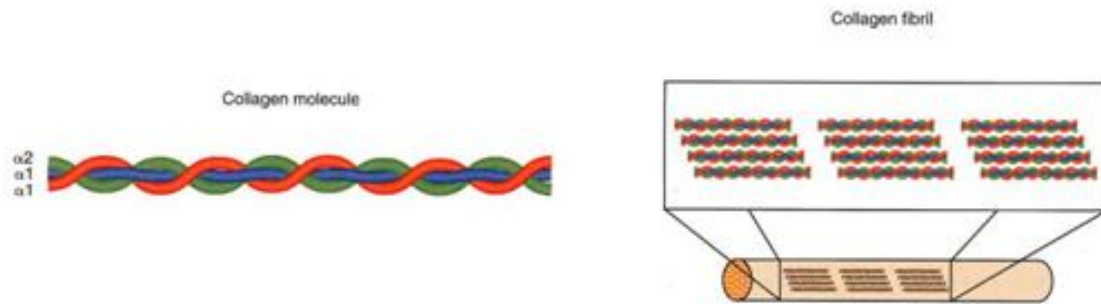


Figure 10. Schéma représentatif de l'assemblage du collagène de type I [Rouwkema, 2007]

b) Les protéines non collagéniques

Elles représentent 10 à 15% du contenu protéique total du tissu osseux. Ces protéines participent à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux et peuvent intervenir dans de nombreux aspects de la physiologie osseuse comme les mécanismes de minéralisation, la migration cellulaire (par chimiotactisme) ou encore lors de la régulation du couplage formation/résorption de la matrice osseuse.

L'ostéocalcine est la protéine non collagénique la plus abondante dans le tissu osseux. Elle fait partie de la famille des Gla protéines. Ce sont des protéines contenant des résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (Gla), résultant d'une modification post-traductionnelle des résidus glutamate. Elles jouent un rôle important dans la minéralisation, due à la haute affinité du résidu « Gla » pour le calcium. Elle est fortement exprimée par les ostéoblastes en différenciation terminale dont elle constitue le marqueur phénotypique le plus spécifique. Une fois sécrétée par l'ostéoblaste, l'ostéocalcine est incorporée dans la matrice osseuse. Il a été montré que des souris dont le gène codant pour l'ostéocalcine a été invalidé, présentent une augmentation progressive de la masse osseuse, et un contenu minéral osseux plus élevé que les animaux sauvages [Boskey et al., 1998] [Luo et al., 1997] [Ducy et al., 1996]. L'ostéocalcine agirait sur la formation osseuse en contrôlant l'activité des ostéoblastes et comme inhibiteur de la minéralisation [Hunter et al., 1996].

L'ostéopontine fait partie de la famille des SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*). Ces protéines ne sont pas spécifiques du tissu osseux mais elles contrôlent l'activité des cellules ostéogéniques. Dans l'os, les données de la littérature suggèrent des fonctions situées à l'interface entre les cellules et le minéral [Malaval and De Vernejoul, 2009].

La structure secondaire de l'OPN met en évidence la présence de domaines spécifiques de clivage et de liaison aux intégrines, au calcium, à l'hydroxyapatite (Figure 11). Grâce à son domaine RGD, l'OPN joue un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire.

L'OPN est également connue pour son rôle inhibiteur sur la nucléation et sur la croissance des cristaux de phosphates de calcium ou d'hydroxyapatite [Pampena et al., 2004] [Hunter et al., 1996]

[Boskey, 1996] [Hunter and Goldberg, 1994], ainsi que sur la minéralisation de la matrice extracellulaire produite dans les cultures cellulaires *in vitro* [Speer et al., 2005]. Des modifications post-traductionnelles de la protéine vont modifier son rôle sur la minéralisation. Ainsi la déphosphorylation de l'OPN induit la perte de son effet inhibiteur [Giachelli et al., 2005] [Qin et al., 2004] [Jono et al., 2000].

L'invalidation du gène OPN chez la souris montre qu'il n'y a pas d'altération du taux de formation osseuse chez les souris OPN^{-/-} comparé aux animaux OPN^{+/+} [Ishijima et al., 2006] [Kitahara et al., 2003]. *In vitro*, l'étude de la surexpression de l'OPN dans des cultures primaires d'ostéoblastes issus de moelle osseuse de rat montre que l'OPN est un activateur de la différenciation ostéoblastique et de la formation de nodules minéralisés [Kojima et al., 2004]. De façon contradictoire, Huang et coll. démontre par invalidation de la protéine dans des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 que l'OPN est un inhibiteur de la différenciation [Huang et al., 2004].

L'OPN joue également un rôle dans le contrôle de l'activité ostéoclastique. Ainsi, elle intervient dans l'ostéoclastogénèse [Aitken et al., 2004] [Yamate et al., 1997], dans le recrutement et la migration des ostéoclastes [Chellaiah et al., 2003] ainsi que dans le contrôle de leurs activités [Contractor et al., 2005]. *In vivo*, la déficience en OPN chez la souris n'altère pas la résorption osseuse en conditions physiologiques, en revanche, elle protège de la perte de masse osseuse induite par l'ovariectomie, le traitement à la PTH ou lors de fortes concentrations en phosphate ainsi que lors des expériences de suspension de l'animal par la queue [Ishijima et al., 2006] [Koyama et al., 2006] [Ihara et al., 2001] [Yoshitake et al., 1999]. Ces données suggèrent un rôle majeur de l'OPN sur l'activité de l'ostéoclaste et par conséquent dans la résorption osseuse lors de situations pathologiques [Monfoulet et al., 2010].

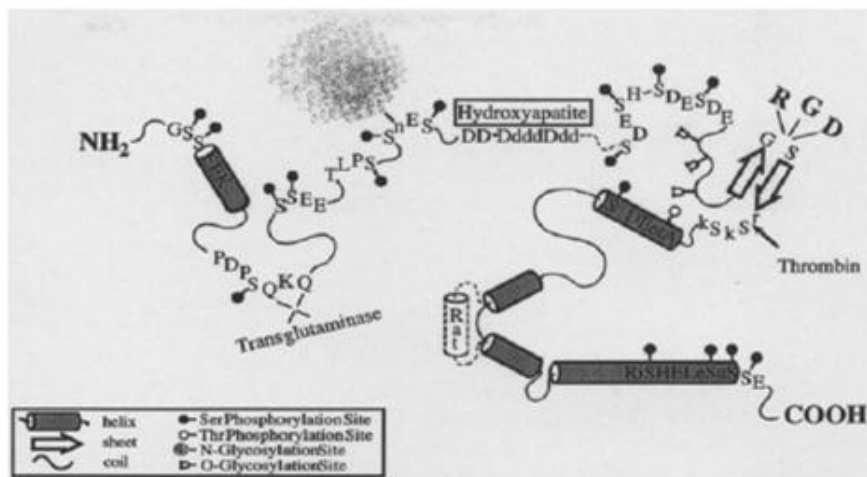


Figure 11. Structure secondaire de l'ostéopontine [Sodek et al., 2000]

La sialoprotéine osseuse (BSP) est une autre protéine faisant partie également de la famille des SIBLINGs. La structure de la BSP est relativement similaire à celle de l'OPN, elle possède des domaines riches en acide aspartique permettant la liaison à l'hydroxyapatite et un peptide RGD assurant l'adhérence cellulaire, dépendant des intégrines (Figure 12).

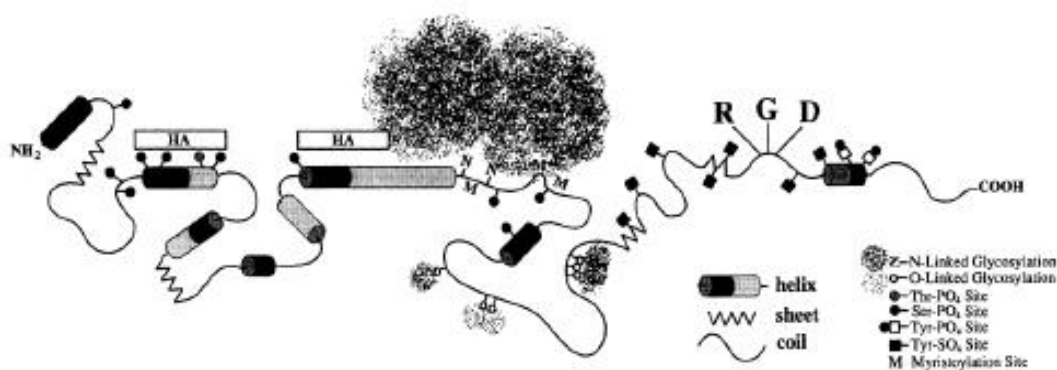


Figure 12. Structure secondaire de la BSP [Ganss et al., 1999]

Outre son effet sur la minéralisation du tissu osseux, la BSP participe à la régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques. Par leur liaison aux intégrines, les BSP peuvent réguler la migration des cellules pré-ostéoblastiques [Karadag and Fisher, 2006]. Grâce à la présence du peptide RGD dans sa séquence, la BSP intervient dans l'adhérence et la migration des cellules endothéliales humaines *in vitro*, favorisant l'angiogenèse [Bellahcene et al., 2000]. Par ailleurs, les travaux de surexpression de la BSP, par utilisation d'un vecteur adénoviral ou par supplémentation en BSP recombinante, conduisent à une expression augmentée dans les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 de marqueurs spécifiques, tels que la phosphatase alcaline ou encore l'ostéocalcine. A l'inverse, l'extinction de l'expression de la BSP à l'aide de shRNA provoque la diminution de l'expression de ces mêmes marqueurs, ainsi que de l'incorporation de calcéine et de la formation des nodules minéralisés, suggérant que la BSP agirait comme un activateur de la différenciation ostéoblastique [Gordon et al., 2007] et un rôle majeur dans la minéralisation.

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus lors de la différenciation de cultures primaires de cellules stromales de moelle osseuse de souris déficientes en BSP vers le lignage ostéoblastique pour lesquelles une altération de la formation des nodules minéralisés a été décrite [Malaval et al., 2008]. Le phénotype osseux des souris BSP^{-/-} suggère que les deux lignages, ostéoblastiques et ostéoclastiques, sont affectés par la délétion, entraînant un renouvellement osseux plus lent. La déficience en BSP engendre un retard de réparation intramembranaire d'un défaut osseux [Malaval et al., 2009b] [Malaval et al., 2009a]. La BSP au contraire de l'ostéopontine va jouer un rôle positif dans la formation osseuse au cours de la réparation [Monfoulet et al., 2010]. A l'inverse, les souris surexprimant la BSP présentent une diminution du volume osseux trabéculaire associée à une augmentation du nombre d'ostéoclastes, alors qu'il n'y a pas d'altération du nombre d'ostéoblastes, démontrant ainsi que la surexpression de la BSP entraîne le découplage des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques [Valverde et al., 2008].

La phosphatase alcaline, enzyme synthétisée en grande quantité par les ostéoblastes, est une glycoprotéine initialement attachée à la membrane par un pont phosphoinositol, qui peut être clivée et se retrouver dans la matrice minéralisée, lieu probable de son action. Il semble que son rôle soit prépondérant dans le processus de minéralisation. En effet, elle permet de concentrer les ions phosphates inorganiques (Pi) par hydrolyse de substrats organiques phosphorylés (nucléotides

triphosphates NTP, β -glycérophosphate) dont les pyrophosphates (PPi) qui agissent comme des inhibiteurs de la minéralisation (Figure 13) [Balcerzak et al., 2003].

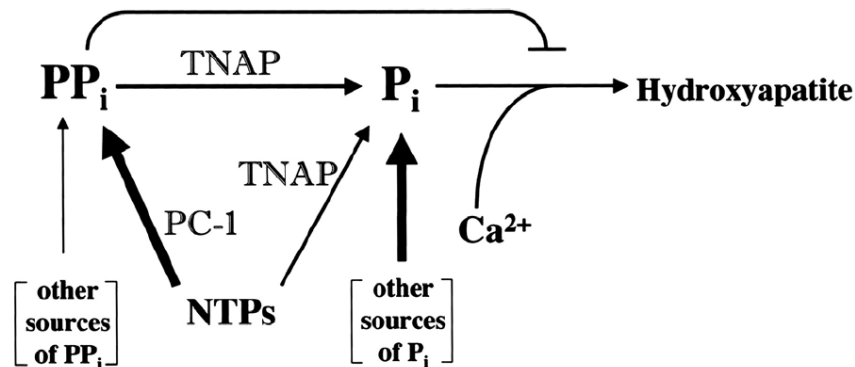


Figure 13. Rôle de la phosphatase alcaline (PAL) dans la minéralisation [Balcerzak et al., 2003]

L'ostéonectine représente environ 2% des protéines osseuses. C'est une glycoprotéine phosphorylée fortement exprimée par les ostéoblastes différenciés. Elle présente une affinité élevée pour le collagène de type I, le calcium et l'hydroxyapatite. Bien que non spécifique du tissu osseux, elle semble jouer un rôle important dans la prolifération ostéoblastique, ainsi que dans la minéralisation de la MEC, elle est un puissant inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite.

Les protéoglycanes (PG) sont des glycoprotéines auxquelles sont attachées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont des polymères d'unités disaccharidiques qui s'associent à une grande variété de protéines, matricielles ou membranaires, dont plusieurs récepteurs de facteurs de croissance et cytokines. La décorine et le biglycane, appartiennent à la famille des protéoglycanes riches en leucine (SLRP : small Leucin-Rich Proteoglycan) sont majoritaires dans l'os. La décorine est impliquée dans la fibrillogénèse du collagène. La délétion du gène du biglycane chez la souris conduit à une diminution significative de l'os trabéculaire, indiquant son rôle positif dans la formation osseuse [Fleischmajer et al., 1987]. Les PG sont associés aux fibres de collagène de type I, ils sont des régulateurs de la mise en place et de la stabilité de la trame collagénique et pourraient être impliqués dans le processus de minéralisation de la matrice osseuse. Ils jouent également un très grand rôle dans le stockage matriciel et la présentation aux cellules de facteurs de croissance, notamment le TGF- β et de cytokines (IL-1, IL-6) influençant la prolifération et la différenciation cellulaire.

En ce qui concerne, les autres facteurs protéiques non collagéniques, les **protéines plasmatiques** et différents **facteurs de croissance** peuvent être séquestrés dans la matrice osseuse. Ils ne représentent que 2 à 4% des protéines totales de la matrice. Parmi les facteurs de croissance, les BMPs, le PDGF, le TGF- β , les IGF I et II et le bFGF ainsi que le VEGF ou encore le bFGF jouent un rôle majeur sur l'activité des cellules osseuses et de leurs progéniteurs et ont la capacité de réguler le remodelage osseux et la réparation tissulaire lorsqu'ils sont libérés de la matrice osseuse [Solheim, 1998].

E. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique, il est sans cesse remanié par un mécanisme associant étroitement les phénomènes de résorption et de formation. Ce remaniement intervient tout au long de la vie au cours de l'ostéogenèse. Ce remaniement permet en particulier au tissu osseux de s'adapter et de modifier sa structure en fonction des contraintes mécaniques et/ou biochimiques environnantes. Les cellules impliquées dans le remodelage osseux et présentes au niveau des surfaces osseuses résorbées sont en contact étroit avec les cellules de la cavité médullaire, qui produisent de nombreuses cytokines et facteurs de croissance au potentiel ostéotrope. Bien que la structure et la fonction de l'os cortical diffèrent de celles de l'os spongieux, le remodelage obéit aux mêmes principes biologiques.

Lors de la résorption osseuse, les cellules souches ostéoclastiques sont recrutées et se différencient en ostéoclastes matures. La sécrétion d'enzymes comme la TRAP permet une dégradation osseuse efficace en résorbant le calcium de la matrice extracellulaire. Puis, les ostéoclastes reçoivent un signal inhibiteur, leurs prolongements dendritiques se rétractent et l'étape de réversion débute. Les cellules pré-ostéoblastiques sont alors mobilisées et se différencient en ostéoblastes matures qui assurent la formation de l'os en déposant une matrice minéralisée.

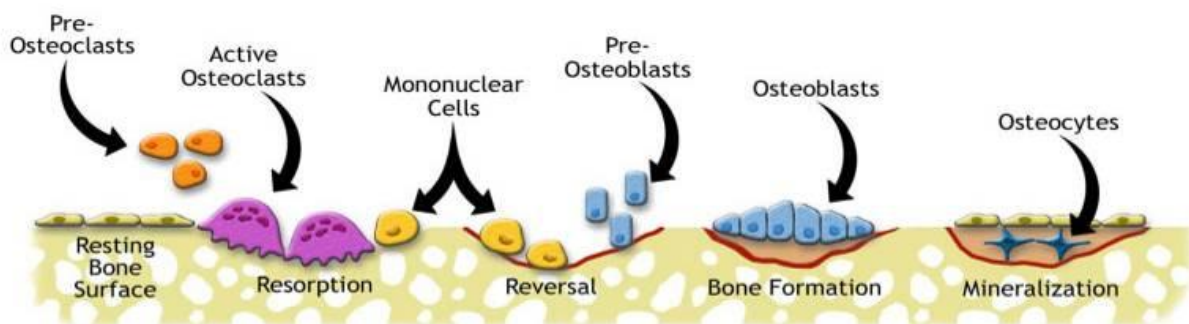


Figure 14. Cycle du remodelage osseux (Université de Michigan, <http://www.umich.edu/>)

Le remodelage des structures corticales se fait par des unités de remodelage osseux (BRU). Au sein de ces unités, résorption, transition, formation osseuse et minéralisation se succèdent, conduisant au remodelage de la MEC. Ce remodelage s'accompagne du remaniement des structures vasculaires présentes dans le canal haversien (Figure 14) [Parfitt, 2000]. Le remodelage osseux est ainsi un processus complexe faisant intervenir de nombreuses fonctions cellulaires orientées vers la coordination de la résorption et de la néoformation osseuse. Ces fonctions cellulaires et leur coordination sont elles-mêmes sous la dépendance de facteurs systémiques (PTH, calcitonine, glucocorticoïdes, hormones sexuelles), locaux et de facteurs mécaniques. De multiples facteurs séquestrés dans la MEC, peuvent également stimuler la formation osseuse. C'est le cas des facteurs de croissance de la superfamille du TGF- β , les BMPs, le VEGF, le bFGF ou encore l'IGF1 et IGFII. Ces facteurs, liés à la matrice, peuvent être libérés lors de la résorption de la matrice sous l'action des métalloprotéinases matricielles (MMPs).

F. La vascularisation dans le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu vascularisé contrairement aux autres tissus conjonctifs comme le cartilage. D'un point de vue physiologique, la vascularisation joue un rôle essentiel lors des mécanismes de réparation, de développement et de remodelage du tissu osseux.

Il a été montré qu'une vascularisation absente ou défectueuse aboutit à un développement anormal du tissu osseux, à une réparation incomplète [Glowacki, 1998] et peut engendrer des pathologies osseuses. Les travaux de Hunter et coll. ont démontré la synergie évolutive entre ostéogenèse et angiogenèse dans le cas du rachitisme : l'absence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'accompagne non seulement d'une diminution de l'ossification endochondrale avec une prolifération anarchique du cartilage qui demeure avascularisé, mais également d'une atteinte vasculaire tant morphologique, histologique, que fonctionnelle, en périphérie du cartilage. Ces phénomènes sont parfaitement réversibles, avec un retour à la normale, coordonnés dans le temps, dès l'adjonction de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [Hunter et al., 1991]. Dans le cas de la maladie de Paget, le couplage résorption/reconstruction osseuse est anarchique, et cette pathologie s'accompagne d'un développement local anormalement élevé et non structuré de la vascularisation artério-veineuse à l'origine de graves perturbations hémodynamiques [Tarquini et al., 1998].

Dès 1953, avec les travaux de Trueta et Harrison [Trueta and Harrison, 1953], la vascularisation osseuse a pu être mise en évidence dans la tête fémorale grâce à la technique de microangiographie au sulfate de baryum. Un peu plus tard, Fisher et coll. [Fischer, 1977] ont repris cette technique et leurs travaux ont permis la visualisation des vaisseaux sanguins dans l'humérus (Figure 15A).

Le système vasculaire de l'os se décompose en trois parties : le système artériel, capillaire et veineux. La vascularisation des os longs est assurée par des artères richement anastomosées qui se ramifient en artérioles puis en capillaires transcorticales (Figure 15B). Les artères diaphysaires nourricières sont responsables de l'irrigation de la région médullaire ainsi qu'une partie des épiphyses. Ces artères se ramifient et donnent naissance au réseau endostéal mais rejoignent aussi les capillaires épiphysaires et métaphysaires. Les artères situées au niveau des épiphyses et métaphyses forment un réseau anastomotique dans l'ensemble de l'os trabéculaire. Les artères sont aussi présentes au niveau du périoste à la surface de la diaphyse.

La microcirculation de l'os est assurée par les nombreux capillaires et sinusoides présents au niveau médullaire, cortical et périosté. Les vaisseaux du système cortical circulent dans les canaux de Havers, au centre de l'ostéon mais aussi par les canaux de Volkman servant de passerelle entre les différentes cellules du micro-environnement osseux.

Enfin, les veines du système vasculaire osseux sont très nombreuses puisqu'elles doublent, voire plus, le système artériel (Figure 15C). Le retour veineux médullaire se fait grâce à un volumineux sinus veineux central, parallèle aux artères nourricières. Les veines nourricières et perforantes assurent le drainage sanguin des régions épiphysaires et métaphysaires vers l'extérieur de l'os.

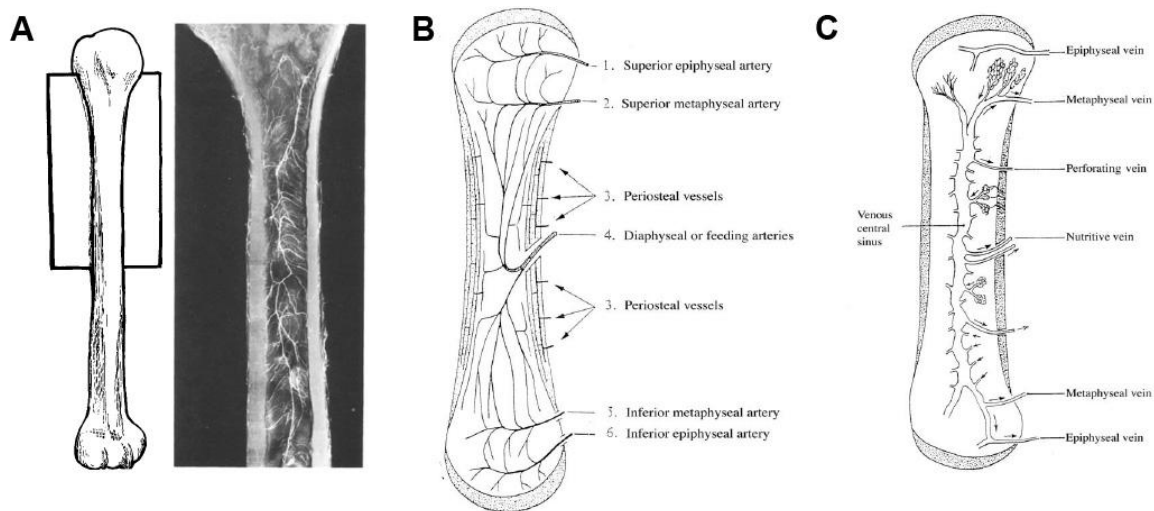


Figure 15. La vascularisation osseuse. A : Visualisation de la vascularisation d'un os long grâce à la technique de microangiographie au sulfate de baryum. Coupe frontale de la moitié supérieure de l'humérus chez un adulte. Le système nourricier centro-médullaire et les vaisseaux périostés sont bien visibles. B et C : Schéma des systèmes artériel et veineux d'un os long, respectivement [Laroche, 2002]

Les liens étroits entre le remodelage osseux et la vascularisation ont été mis en évidence par la présence de capillaires artériels dans les lacunes de résorption et l'existence de sinus veineux associés à la néoformation osseuse [Laroche, 2002] [Choi et al., 2002]. Ainsi, la vascularisation intra-osseuse peut et doit s'adapter au remodelage osseux par production de néovaisseaux, grâce à l'angiogenèse et/ou par augmentation du débit sanguin par vasodilatation. De manière générale, toute circonstance qui provoque une augmentation du remodelage osseux s'accompagne d'une augmentation du nombre de vaisseaux et du débit sanguin.

L'importance de la néovascularisation lors du remodelage du tissu osseux, ou de l'ostéogenèse est liée au dialogue intercellulaire entre les cellules responsables de la vascularisation et les cellules osseuses. Les cellules endothéliales et les cellules ostéoblastiques peuvent communiquer *via* la production de facteurs angiogènes tels que le VEGF₁₆₅ qui reste l'élément clé de ce couplage cellulaire mais aussi par d'autres facteurs ostéogènes comme les BMPs (BMP2, BMP4, BMP7) qui peuvent agir de façon autocrine et/ou paracrine. Outre les facteurs sécrétés, d'autres modes de communication peuvent exister en sollicitant en particulier des jonctions cellulaires. Les cellules peuvent créer des jonctions intercellulaires (Figure 16) qui peuvent être communicantes *via* la fonction des connexines [Civitelli, 2008] [Villars et al., 2002], adhérentes *via* l'activité des cadhérines [Mbalaviele et al., 2006] [Wallez et al., 2006] ou en créant des interactions avec la matrice extracellulaire, *via* l'activité des intégrines [Siebers et al., 2005] [Marie, 2002].

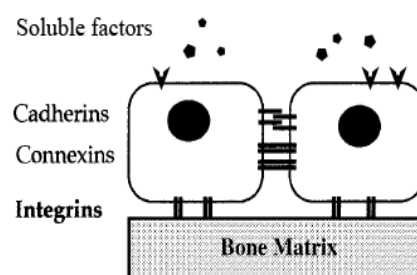


Figure 16. Les modes de communication entre les cellules [Marie, 2002]

Ce dialogue intercellulaire a des conséquences sur l'activité et la fonction des deux types cellulaires. Il a été montré que la survie des cellules endothéliales était prolongée en présence de cellules ostéoblastiques [Unger et al., 2007] ou de cellules mésenchymateuses indifférenciées. Des études rapportent que le VEGF₁₆₅ [Kaigler et al., 2005] [Bouletreau et al., 2002] [Deckers et al., 2002] sécrété par les ostéoprogéniteurs est capable de stimuler l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales [Athanasopoulos et al., 2007].

Réciproquement, les cellules endothéliales peuvent agir sur le remodelage osseux soit en agissant sur la fonction ostéoblastique ou de façon moins connue sur la fonction ostéoclastique. La présence de cellules endothéliales accélère l'expression du phénotype ostéoblastique par les cellules ostéoprogénitrices [Rouwkema et al., 2006] [Kaigler et al., 2005] [Villars et al., 2002] *via* la sécrétion de BMP-2 ou encore par contact direct et l'établissement de jonctions intercellulaires.

D'autres travaux pourraient démontrer un effet inverse selon les types cellulaires utilisés dans des modèles de coculture directe ou indirecte de ces deux types cellulaires (voir paragraphe IVB1b). En particulier, certains travaux montrent que les cellules endothéliales pourraient inhiber la différenciation des MSCs en ostéoblastes matures [Meury et al., 2006] et maintenir ainsi les cellules à un état d'ostéoprogéniteurs. La variabilité de ces résultats semble due aux différentes conditions expérimentales de coculture : culture statique, culture dynamique, culture en hypoxie (voir paragraphe IVB2b). En effet, des conditions hypoxiques permettent de favoriser l'angiogenèse *in vitro* [Phillips et al., 1995] mais d'autre part peuvent ralentir la différenciation ostéogénique des MSCs [Xu et al., 2007] [Grayson et al., 2007] [Martin-Rendon et al., 2007] [Fehrer et al., 2007].

II. La physiologie de la réparation osseuse

Le tissu osseux a la capacité de se régénérer spontanément, de restaurer les propriétés géométriques, physiques et fonctionnelles de la zone traumatisée, mais seulement dans le cas de faibles pertes de substance osseuse.

A. Ontogenèse et réparation osseuse

Quel que soit le type de lésions osseuses, les mécanismes mis en place pour restaurer l'architecture et la fonction de l'os, récapitulent les événements cellulaires et moléculaires de la formation embryonnaire osseuse et du remodelage [Shapiro, 2008] [Gerstenfeld et al., 2003b] [Cullinane et al., 2002] [Ferguson et al., 1999]. Pour certains auteurs, les mécanismes mis en jeu au cours de la réparation dépendent des mêmes voies impliquées au cours du développement [Vortkamp et al., 1998] [Iwasaki et al., 1997] [Sandberg et al., 1993]. Cependant, deux points majeurs distinguent ces deux mécanismes. Tout d'abord, au sein du bourgeon embryonnaire, les mécanismes d'ontogenèse sont guidés par des gradients de morphogènes tels que les BMPs, le TGF- β , la voie Wnt [Gerstenfeld et al., 2003b]. Dans un environnement fracturaire, l'initiation de l'ossification fait suite à une phase hémostatique et inflammatoire. L'inflammation et l'hémostase libèrent des facteurs de croissance, de nombreuses cytokines et chimiokines tels que l'IL-1, l'IL-6, des prostaglandines (PGE₂), du TNF α . L'ensemble de ces facteurs constituerait un environnement biochimique différent de celui présent dans le bourgeon osseux embryonnaire [Bruder et al., 1994] [Bolander, 1992]. De plus, l'ostéogenèse embryonnaire se déroule dans un tissu mou, non minéralisé et relativement peu soumis aux contraintes mécaniques. Au contraire, les mécanismes de réparation osseuse se déroulent, par

définition au sein d'une lésion d'un tissu osseux adulte. Ce tissu adulte peut être soumis à différentes forces mécaniques, forces de compression, de cisaillement, ou encore d'étirement, qui auront une forte influence sur le processus de réparation [Henderson and Carter, 2002].

B. Les différents types de réparation osseuse

De façon générale, les lésions osseuses peuvent être classées en plusieurs catégories. Les fractures, formées spontanément suite à une chute par exemple, dans un environnement non stabilisé où les forces mécaniques peuvent être élevées, feront appel à une réparation endochondrale avec mise en place d'un premier tissu cartilagineux. Pour les fractures stabilisées ainsi que pour les défauts formés lors de chirurgie (exérèse de tumeur, remplacement de ligaments, prélèvement de greffon en vue d'une greffe osseuse autologue,...) la réparation osseuse directe, sans phase cartilagineuse, sera favorisée.

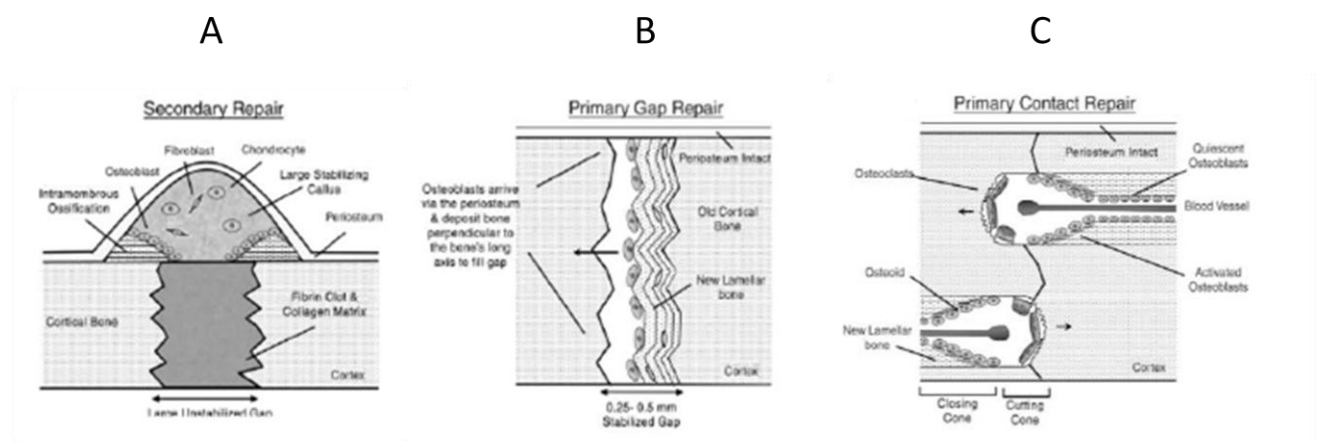


Figure 17. Les différents types de réparation osseuse. (A) Réparation osseuse indirecte ou endochondrale (B, C) Réparation osseuse directe ou intramembranaire [Stronck et Reichert, 2008]

1. Réparation osseuse indirecte ou endochondrale

La réparation endochondrale est observée uniquement pour les os longs dans un espace interfragmentaire, large et mobile et met en jeu des phases de prolifération cellulaire, de différenciation, de migration et de remodelage de la MEC (Figure 17A).

Les cellules mésenchymateuses sont recrutées à partir du périoste et de la moelle osseuse et synthétisent alors une MEC composée principalement de collagène de type I et de hyaluronane (Figure 18). Ces cellules vont proliférer et synthétiser une matrice de collagène de type I, III et de fibronectine. Elles vont se différencier en chondrocytes entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour et vont synthétiser une matrice cartilagineuse avasculaire constituée de collagène de type II, IX et XI, d'agréganes [Mackie et al., 2008] et de protéoglycanes (Figure 18). Cette matrice va constituer un cal mou qui va dans un premier temps stabiliser la fracture. Puis, la maquette cartilagineuse s'amplifie, conduisant à l'hypertrophie des chondrocytes inclus au centre de l'ébauche, et à une calcification de la matrice cartilagineuse environnante. Ce processus de calcification s'accompagne de l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques et enclenche le processus de dégradation de la matrice par les chondroclastes. Les vaisseaux sanguins envahissent la région cartilagineuse calcifiée, forment des capillaires et établissent un environnement favorable à la différenciation des cellules

mésenchymateuses en ostéoblastes. Ceux-ci vont déposer le tissu ostéoïde le long des travées cartilagineuses calcifiées, et un second cycle remplacera cet ostéoïde par de l'os lamellaire.

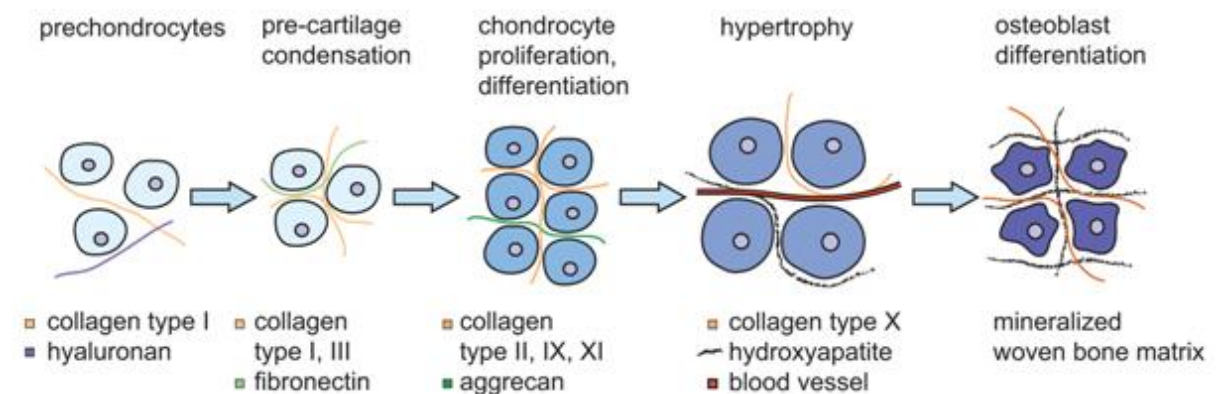


Figure 18. Modifications de la composition de la MEC au cours de la réparation endochondrale [Sundelacruz and Kaplan, 2009]

2. Réparation osseuse directe ou intramembranaire

La réparation des os plats se fait selon ce mode de réparation (Figure 17B). Elle est observée dans un environnement stable d'un point de vue mécanique, pour des tailles de lésions comprises entre 0.25 et 0.5 mm [Stronck and Reichert, 2008]. Ce mode de réparation ne passe pas par une étape intermédiaire de type cartilagineuse. Les cellules ostéoprogénitrices provenant de la moelle osseuse et du périoste se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes dans une zone hypervascularisée dans les 24 heures suivant la fracture. Au bout du troisième jour, ces cellules synthétisent une matrice dont les fibres collagéniques n'ont pas d'orientation spécifique et dont la minéralisation n'est pas ordonnée, ce tissu est appelé « cal dur » ou « cal osseux ». Le taux de prolifération des cellules recrutées sur le site de lésion est maximal entre le jour 7 et jour 10 et diminue à partir du quatorzième jour [Tsididis et al., 2007]. La minéralisation se fait par zones disséminées de façon aléatoire, du centre vers la périphérie de la lésion. Ce type d'os est appelé « os tissé », il sera remplacé par de l'os lamellaire mature après remodelage [Dimitriou et al., 2005] [Einhorn, 1998].

Un autre type de réparation primaire (Figure 17C) fait intervenir principalement les ostéoblastes et les ostéoclastes du système Haversien. Les ostéoclastes au sein d'unités de remodelage vont résorber les zones osseuses nécrotiques de chaque côté de la lésion. Les ostéoblastes du système haversien produiront directement à la suite un os lamellaire parallèle à l'axe de l'os. Ce mode de réparation se caractérise par l'absence d'une phase cartilagineuse et de remodelage osseux. Il se réalise dans un environnement sans espace inter-fragmentaire et stable [Shapiro, 2008].

C. Les phases de la réparation osseuse

De façon générale, quel que soit le type de lésion, le processus de réparation tissulaire est orchestré selon une cascade d'événements à laquelle correspondent des activités cellulaires et une production de facteurs de croissance ou de cytokines très spécifiques de chacune des étapes (Tableau 1).

Day 1	Haematoma formation, inflammation Recruitment of mesenchymal cells Osteogenic differentiation of MSCs from bone marrow	Cytokines: IL-1, IL-6, TNF- α released by inflammatory cells PDGF, TGF- β released from degranulating platelets BMP-2 expression and restricted to day 1 expression of GDF-8
Day 3	MSCs proliferation begins Proliferation and differentiation of preosteoblasts and osteoblasts in regions of intramembranous ossification Angiogenesis begins	Decline of cytokines levels Expression of TGF- β 2, - β 3, GDF-10, BMP-5, -6 Angiopoietin-1 is induced
Day 7	Peak of cell proliferation in intramembranous ossification between days 7 and 10 Chondrogenesis and endochondral ossification begins (days 9–14 maturation of chondrocytes)	Peak of TGF- β 2 and - β 3 expression Expression of GDF-5 and probably GDF-1
Day 14	Cessation of cell proliferation in intramembranous ossification, but osteoblastic activity continues Mineralization of the soft callus, cartilage resorption, and woven bone formation Neo-angiogenesis which infiltrates along new mesenchymal cells Phase of most active osteogenesis until day 21	Decreased levels of expression for TGF- β 2, GDF-5, and probably GDF-1 Expression of BMP-3, -4, -7, and -8 VEGFs expression
Day 21	Woven bone remodelled and subsequently replaced by lamellar bone	Second increase of IL-1 and TNF- α which continues during bone remodelling Decreased expression of TGF- β 1 and TGF- β 3, GDF-10, and BMPs (2–8)

Tableau 1. Cinétique des événements cellulaires et expression des molécules de signalisation durant la réparation osseuse chez la souris [Dimitriou et al., 2005]

1. Phase inflammatoire

La réparation naturelle d'un tissu est toujours précédée d'une succession de mécanismes qui incluent une réaction inflammatoire avec une sécrétion de cytokines inflammatoires qui jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes de néovascularisation du tissu lésé et dans le recrutement des différents types cellulaires sollicités dans la reconstruction du tissu. Lors d'une lésion tissulaire, d'une fracture d'un traumatisme chirurgical, de l'évolution d'un foyer septique il y a effractions vasculaires qui entraînent l'irruption de sang en dehors des vaisseaux (hémorragie). Après l'agrégation et la dégranulation plaquettaires (libération de cytokines et de facteurs de croissance PDGF, TGF- β), la coagulation conduit en quelques minutes à la formation d'un caillot ou hématome qui servira de support à la formation du cal. Il crée une matrice extracellulaire provisoire permettant grâce à des signaux chimiotactiques la migration des différents types cellulaires dont les cellules inflammatoires. Des cellules phagocytaires comme les macrophages ou les granulocytes sont ainsi recrutées et permettent l'étape de déterction puis la synthèse de collagène par des fibroblastes donnant naissance à un tissu de granulation ou tissu fibreux. Mais ce tissu n'est pas permanent, il sera dégradé par des MMPs et remodelé par les cellules ostéogéniques pour laisser la place au tissu néoformé. Cette phase inflammatoire, associée à un mécanisme de réparation naturelle, peut également intervenir suite à l'implantation d'un biomatériau. Dans ce dernier cas, cette étape inflammatoire et le degré d'inflammation seront étroitement liés à la nature de la matrice implantée. Dans tous les cas, cette étape reste indispensable à tout phénomène de réparation tissulaire et peut faciliter en outre l'intégration de biomatériaux dans le tissu hôte.

2. Vascularisation

Lors de la réparation naturelle, la formation de vaisseaux doit être coordonnée au processus de réparation car elle permet l'acheminement de facteurs de croissance, de cytokines et des différents types cellulaires au niveau du foyer fracturaire, des facteurs de croissance et des cytokines. Un déficit vasculaire peut être à l'origine d'un retard, voire une absence de cicatrisation.

La formation des vaisseaux permet la mise en place du cal osseux en participant à l'acheminement de progéniteurs ostéoblastiques. Par ailleurs la communication entre les cellules endothéliales et les ostéoblastes reste importante pour la régulation de la différenciation des cellules mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique et la formation osseuse [Grellier, 2008] [Ferguson et al., 1999] [Vu et al., 1998].

La teneur en oxygène au sein du foyer de fracture joue également un rôle majeur dans la cicatrisation puisqu'elle influe directement sur la différenciation des cellules progénitrices. Les cellules souches se différencient vers le lignage chondroblastique si la teneur en oxygène est basse et en ostéoblastes si la teneur est élevée [Gerber and Ferrara, 2000]. Parmi les autres facteurs essentiels à la néoangiogenèse et dont certains sont sensibles à l'hypoxie, nous citerons le rôle du VEGF₁₆₅ [Street et al., 2002] et de l'angiopoïétine [Hankenson et al., 2011] [Pacicca et al., 2003].

3. Formation du cal

Le tissu de granulation ainsi formé est sans tenue mécanique et remplace rapidement l'hématome. Sous l'action de différents facteurs de croissance (TGF- β , BMP, FGF, PDGF) présents dans le tissu de granulation, les cellules mésenchymateuses prolifèrent au sein de ce tissu qui devient un « cal mou ». Si le tissu de granulation est appauvri en oxygène, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondroblastes et permettent la mise en place d'un cal fibro-cartilagineux qui sera remodelé en « cal dur » ou cal osseux. En présence d'un taux élevé en oxygène, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes qui vont alors constituer directement le cal « osseux ».

4. Minéralisation du cal

La minéralisation résulte du dépôt d'une substance minérale au sein de la matrice organique extracellulaire. Cette matrice agit comme un agent de nucléation du cristal et comme support servant à l'organisation de ces dépôts minéraux. La phase minérale est constituée d'un cristal de phosphate de calcium complexe, qui se dépose sur l'intérieur des fibrilles de collagène de façon ordonnée. De façon plus précise, la phase d'ostéogenèse s'initie par des dépôts de matrice extracellulaire contenant du collagène I, III, V et XI au sein du cal. La précipitation et la croissance des cristaux de phosphate de calcium se poursuivent au sein de la matrice par d'autres protéines non collagéniques, telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, synthétisées par les cellules constituant le cal. La synthèse de ces protéines dépend des facteurs de croissance (TGF- β , IGF1 et IGF2) et des conditions mécaniques locales, présents dans l'hématome fracturaire [Linkhart et al., 1996].

5. Remodelage

La dernière phase de la réparation est le remodelage de l'os primaire en un os cortical ou trabéculaire lamellaire. Cette phase est aussi appelée formation osseuse secondaire. Ce processus de remodelage est conduit par une résorption osseuse, accomplie par les ostéoclastes, suivie d'une formation osseuse par les ostéoblastes. Cette réorganisation peut s'étendre de 2 à 12 mois. Le tissu

cicatriciel retrouve alors ses propriétés mécaniques [Claes and Heigele, 1999] grâce à la réorganisation structurale de sa trame collagénique.

D. Les acteurs de la réparation du tissu osseux

Au cours de la réparation osseuse, trois grandes catégories d'acteurs agissent de manière coordonnée, afin de favoriser la régénération du tissu osseux. Ces acteurs sont les cellules de différentes origines, en particulier les cellules ostéogéniques, le micro-environnement biochimique au travers des facteurs de croissance libérés localement et enfin le micro-environnement mécanique.

1. Les acteurs cellulaires

La néoformation osseuse fait intervenir de nombreux types cellulaires dont les acteurs principaux sont les cellules ostéogéniques pouvant être issues de différentes origines [Shapiro, 2008]:

- Les cellules du périoste,
- Les cellules bordantes de l'endoste,
- Les cellules mésenchymateuses non différenciées de la moelle osseuse,
- Les cellules des tissus mous et des tissus conjonctifs environnants.

a) Les ostéoprogéniteurs issus du périoste

Le périoste est un tissu conjonctif ancré à l'os par les fibres de Sharpey. Il se compose d'une couche fibreuse externe contenant des fibroblastes et les fibres de Sharpey et d'une couche interne (dite couche cambiale) regroupant des nerfs, des capillaires, des ostéoblastes et des cellules souches mésenchymateuses. Le périoste est un tissu ostéogénique richement vascularisé dont les capillaires et artérioles sont directement en contact avec le système vasculaire osseux [Schindeler et al., 2009] [Zhang et al., 2008] [Allen et al., 2004].

Le périoste est une source potentielle de cellules ostéoprogénitrices pour la réparation osseuse. Son ablation conduit à une altération des processus de réparation [Ozaki et al., 2000]. De plus, les travaux de Colnot et coll. tendent à montrer qu'au cours de la réparation d'une fracture par ossification endochondrale, les ostéo-chondroprogéniteurs ne sont pas issus de la moelle osseuse, suggérant une origine périostée [Colnot, 2009] [Colnot et al., 2006].

b) Les cellules bordantes

Elles se comportent comme une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié, elles tapissent la cavité des canaux haversiens. Les canaux haversiens sont isolés de la moelle, du périoste et de l'endoste. Par conséquent, ils contiennent leurs propres progéniteurs ostéoblastiques, qui seront recrutés lors du remodelage de l'os cortical. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes qui interviendraient dans le processus de réparation tissulaire lors de la conversion du cal « mou » en cal « dur » [Colnot, 2009].

c) Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse

La moelle osseuse contient des cellules mésenchymateuses capables de se différencier en plusieurs types cellulaires (chondrocytes, ostéoblastes) [Augello and De Bari, 2010]. Des nombreuses études prouvent l'implication de cette niche cellulaire dans la réparation tissulaire [Rustad et al., 2011] [Di Maggio et al., 2011].

Les travaux de Colnot et coll. démontrent que les cellules ostéoblastiques participent à l'ossification intramembranaire, survenant lors de la réparation d'une lésion osseuse stabilisée, et sont en partie d'origine médullaire [Colnot, 2009] [Colnot et al., 2006] [Colnot et al., 2005].

Pendant le processus de cicatrisation, ces cellules sont sensibles à différents facteurs de croissance, libérés au cours du processus de cicatrisation (voir paragraphe IID2) et sous l'action de contraintes mécaniques (voir paragraphe IID3). Stimulées, ces cellules peuvent être recrutées et acheminées par le réseau vasculaire afin de proliférer et de se différencier au sein du foyer fracturaire [Shirley et al., 2005].

d) Les cellules des tissus mous et des tissus conjonctifs environnants

L'os est entouré de tissus mous. Le tibia, par exemple, est recouvert sur sa face antérieure majoritairement par du tissu cutané et sur sa face postérieure par du tissu musculaire. Harry et coll. ont montré que la séparation des tissus mous de l'os fracturé, grâce à un film de PTFE (PolyTétraFluoroEthylène), entraîne une altération de la réparation suggérant un rôle du tissu musculaire et cutané dans le processus de réparation osseuse [Harry et al., 2008]. *In vitro*, le potentiel ostéogénique des cellules du tissu musculaire a été démontré par leur réponse aux BMPs [Schindeler et al., 2009] [Musgrave et al., 2002] [Musgrave et al., 2001]. Le tissu musculaire contiendrait en particulier des cellules stromales capables de se différencier en ostéoblastes sous l'action du $TNF\alpha$ *in vitro* [Glass et al., 2011].

2. Le micro-environnement biochimique

a) Les facteurs solubles

De nombreux facteurs solubles sont impliqués dans le mécanisme de réparation tissulaire. Il s'agit de cytokines inflammatoires ou de facteurs de croissance ayant un profil d'expression temporelle d'expression bien précis durant le processus de réparation.

Les **cytokines proinflammatoires** (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) sont connues pour jouer un rôle dans l'initiation de la cascade de réparation tissulaire. Les cytokines régulent la formation osseuse endochondrale et le remodelage. Elles sont sécrétées par les macrophages et les cellules de l'immunité mais aussi par les cellules mésenchymateuses issues du périoste. Elles possèdent un effet chimiotactique sur d'autres cellules inflammatoires, stimulent l'angiogenèse et la synthèse de matrice extracellulaire. Parmi elles, Le $TNF\alpha$ induit le recrutement des MSCs, l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques pendant l'ossification endochondrale et stimule la fonction ostéoclastique [Tsiridis et al., 2007] [Dimitriou et al., 2005]. L'absence de $TNF\alpha$ inhibe la résorption du cartilage altérant donc la formation osseuse [Gerstenfeld et al., 2003a]. Les cytokines proinflammatoires présentent un pic d'expression dans les premières 24 heures suivant la fracture qui diminue pendant la période de formation du cartilage puis augmentent à nouveau lors de la phase de remodelage.

Les facteurs de croissance vont également jouer un rôle important dans l'initiation du processus de réparation. Parmi eux nous citerons :

Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) est synthétisé par les plaquettes, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les ostéoblastes dans les phases précoces de réparation.

C'est un dimère codé par deux gènes différents, le PDGF-A et le PDGF-B. Le polypeptide peut exister sous la forme d'un homodimère PDGF-AA ou PDGF-BB, ou sous la forme d'un hétérodimère: PDGF-AB. Les ostéoblastes peuvent synthétiser tous les isoformes de PDGF puisqu'ils expriment les deux gènes. Il exerce son effet *via* un récepteur à activité tyrosine kinase, et sa fixation peut être modulée par certaines cytokines inflammatoires dont l'IL1 et le TNF α . C'est un puissant mitogène pour les cellules mésenchymateuses. Il intervient dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires et dans le recrutement et la prolifération des cellules mésenchymateuses. De nombreux auteurs ont montré une augmentation de la densité du volume du cal formé suite à une ostéotomie chez les lapins traités au PDGF [Fiedler et al., 2002] [Nash et al., 1994] [Bolander, 1992].

L'EGF (Epithelial Growth Factor) peut induire la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques mais inhibe la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes matures [Thomas, 2008]. Il peut aussi stimuler la synthèse de prostaglandines, dont la prostaglandine E2 (PGE2), principale prostaglandine synthétisée par les ostéoblastes. Administrées par voie locale, les prostaglandines augmentent la formation périostée et la vascularisation. Comme les prostaglandines, les leucotriènes sont associés à la résorption osseuse ostéoclastique. Ces dérivés de l'acide arachidonique, sous l'action de la 5-lipoxygénase, activent les ostéoclastes *in vitro*.

Le TGF- β , dont le poids moléculaire est de 25 kDa, existe sous trois isoformes : TGF- β 1, TGF- β 2, et TGF- β 3. C'est un polypeptide multifonctionnel produit par de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires mais aussi par les cellules du système ostéo-articulaire (ostéoblastes et chondrocytes) et les cellules endothéliales. Après sa sécrétion, il peut agir directement *via* ses récepteurs de type I et II (TGF- β RI et TGF- β RII) ou être stocké dans la matrice extracellulaire osseuse jusqu'à sa libération lors du processus de résorption. Il exerce ses effets *via* ses récepteurs type I et type II, des récepteurs sérine/thréonine kinase qui vont activer la voie des Smads (Smad 2 et 3). Les TGF- β sont libérés tout au long du processus de réparation mais cette cytokine peut avoir des fonctions opposées selon le type cellulaire et son stade de différenciation. Des souris déficientes en TGF- β 1, TGF- β 2, ou encore en TGF- β RI ou RII meurent *in utero* du fait d'une vascularisation anormale [Lebrin et al., 2005]. Le TGF- β peut agir sur l'angiogenèse mais peut induire deux effets différents suivant la voie de signalisation activée. Dans les cellules endothéliales, le récepteur de type I (TGF- β RI) existe principalement sous deux formes : ALK 1 et ALK 5 (activin receptor-like kinase 1 et 5). L'activation de ALK 1 induit la phosphorylation de Smad 1/5 qui stimule la synthèse de Id-1 qui va alors activer la prolifération et la migration des cellules endothéliales. A l'opposé, l'activation de ALK 5 entraîne la phosphorylation de Smad 2/3 et la synthèse de fibronectine et de PAI-1 qui vont inhiber les processus d'angiogenèse [Goumans et al., 2003]. Un modèle de coculture entre des cellules mésenchymateuses et des cellules endothéliales stimule l'activation de TGF- β 1 et active la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes et cellules musculaires lisses, acteurs de la formation de vaisseaux sanguins [Lebrin et al., 2005]. Le TGF- β 1 entraîne également la libération de VEGF par des ostéoblastes qui peut alors activer les cellules endothéliales et l'angiogenèse nécessaire à la réparation osseuse [Saadeh et al., 1999].

Le TGF- β est également un élément central du processus de remodelage osseux. Il stimule les cellules de la lignée ostéoblastique en inhibant l'apoptose des ostéoblastes et en induisant leur différenciation en ostéocytes [Dufour et al., 2008] [Chua et al., 2002].

Le TGF- β exerce aussi plusieurs rôles sur la fonction des ostéoclastes. Quinn et coll. ont montré que le TGF- β pourrait stimuler la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Néanmoins, en présence d'ostéoblastes, le TGF- β est capable d'inhiber la production de RANKL par les ostéoblastes et inhiberait l'activation des ostéoclastes matures par ce facteur [Quinn et al., 2001]. Ishida et coll. ont quant à eux, mis en évidence que le TGF- β 1 stimule la sécrétion de RANKL par les cellules endothéliales et non par les ostéoblastes [Ishida et al., 2002]. Il initie la synthèse des BMPs par les cellules ostéoprogénitrices et inhibe l'activation ostéoclastique en stimulant l'apoptose ostéoclastique.

Les protéines morphogéniques BMPs, appartenant à la superfamille des TGF- β , sont sécrétées par les cellules mésenchymateuses, les ostéoprogéniteurs, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales, séquestrées dans la MEC liées à l'héparine et sont à l'origine d'une stimulation de formation osseuse dès leur libération [Grunert et al., 2007] [Ryoo et al., 2006]. Une fois clivées par les MMPs, les BMPs sont sous forme soluble et peuvent alors interagir avec leur récepteur et activer les voies de signalisation qui leur sont spécifiques.

Les BMPs se lient à deux types de récepteurs le BMP-RI et BMP-RII, l'activation des deux récepteurs étant nécessaire pour la transduction du signal. Les récepteurs aux BMPs sont des protéines kinases qui se dimérisent lors de la liaison avec leur ligand (Figure 19). Le récepteur BMP-RII va ensuite phosphoryler les protéines Smad-R (mothers against decapentaplegic homolog – receptor regulated) qui peuvent être Smad1, 5 ou 8. Puis, Smad4 qui est une Co-Smad (common mediator-Smad) va permettre la translocation au noyau du complexe. La transcription des gènes codant pour des protéines ostéoblastiques telles que la PAL, le collagène de type I ou l'ostéocalcine peuvent être alors activées [Ryoo et al., 2006].

Les BMPs sont présentes tout au long du processus de réparation. Les BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 et BMP9 sont les principaux agents capables d'induire la différenciation des cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique. Les BMPs auraient plusieurs rôles dans ce processus de régénération tissulaire : chimiotaxie par des gradients de concentration [Phillips, 2005], prolifération et différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses, angiogenèse et synthèse de la matrice extracellulaire, différents selon le stade de la réparation auquel ils interviennent, le type cellulaire ciblé et de l'interaction avec d'autres facteurs.

De façon plus précise, lors de la réparation de type endochondrale, la BMP6 serait impliquée dans l'hypertrophie chondrocytaire, et la BMP2 sécrétée précocement pendant la phase de recrutement des MSCs, agirait jusqu'à la formation de l'os primaire. Cette dernière semblerait être impliquée dans la régulation de l'expression des autres morphogènes [Cho et al., 2002]. La BMP4 quant à elle est principalement présente pendant la phase active d'ostéogenèse [Cho et al., 2002] [Sakou, 1998] [Nakase et al., 1994]. La BMP7 ainsi que l'hétérodimère BMP-2/-4 sont surexprimés pendant les phases précoces de la réparation osseuse mais leur expression diminue pendant les phases plus tardives, correspondant à des cellules présentant des stades de différenciation plus avancés [Sakou, 1998].

Enfin, les BMPs stimulent la formation osseuse en favorisant également l'angiogenèse [Cheng et al., 2003] [Valdimarsdottir et al., 2002] [Fiedler et al., 2002] [Deckers et al., 2002] [Marie, 2000] [Hughes et al., 1995], en particulier en stimulant l'expression d'autres facteurs de croissance et angiogéniques comme l'IGF1 et le VEGF.

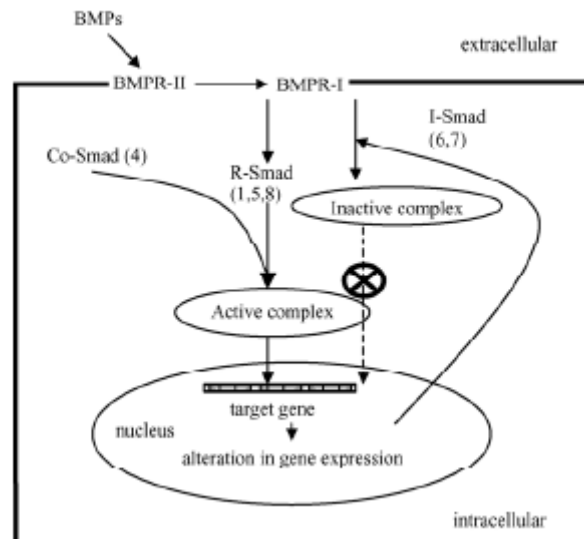


Figure 19. Voie de signalisation induite par les BMPs lors de la stimulation de la différenciation ostéoblastique [Dimitriou et al., 2005]

Le VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, est un promoteur majeur de la formation de nouveaux vaisseaux, tant physiologique que pathologique. Il appartient à une famille de protéines constituée de 6 membres: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et Placenta Growth Factor (PlGF) [Cross et al., 2003] [Ferrara et al., 2003]. Le VEGF₁₆₅ est la forme la plus abondante et peut être à la fois soluble et liée à la matrice [Neufeld et al., 1999].

Les récepteurs au VEGF, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et VEGFR-3, sont des récepteurs à tyrosine kinase et se dimérisent après activation [Cross et al., 2003]. Chacun des récepteurs a une fonction propre.

Flt-1 peut être activé par le VEGF-A, le VEGF-B ou le PlGF et est impliqué dans le développement des CSHs (Cellules Souches Hématopoïétiques) ainsi que la migration des macrophages, monocytes. Il est exprimé par les CSHs, les macrophages et les monocytes mais aussi par les ostéoclastes et les ostéoblastes. Ce récepteur existe également sous forme soluble. En se fixant au VEGF, il limite l'accessibilité de ce facteur aux récepteurs membranaires fonctionnels et peut alors réguler négativement la vasculogenèse.

Le KDR, exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques mais aussi les mégacaryocytes et les CSHs, peut reconnaître le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E. Ce récepteur est considéré comme le médiateur majeur des différents effets physiologiques et pathologiques du VEGF-A. Ainsi, en se fixant au KDR, le VEGF-A active différentes voies de signalisation et régule les mécanismes de l'angiogenèse [Olsson et al., 2006].

Après liaison du VEGF, le récepteur s'homodimérise et subit plusieurs phosphorylations situées sur des tyrosines. Ces phosphorylations entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase ou p42/p44 mitogen-activated protein kinase) qui va stimuler la prolifération des cellules endothéliales.

Le VEGFR-3 est principalement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques et impliqué dans le développement du système lymphatique. Les formes matures du VEGF-C et du VEGF-D peuvent se lier à ce récepteur.

Le VEGF est produit par les ostéoblastes qui vont ainsi réguler le phénotype des cellules voisines [Clarkin et al., 2008] [Mayer et al., 2005] [Mayr-Wohlfart et al., 2002] [Street et al., 2002] [Villars et al., 2000]. Le VEGF joue un rôle majeur dans la réparation osseuse en étant libéré au niveau de l'hématome engendré par une fracture [Street et al., 2002].

Gerber et coll. ont montré que les chondrocytes hypertrophiques synthétisent des taux élevés de VEGF, ce qui aurait pour effet, non seulement de favoriser l'invasion capillaire du cartilage calcifié, mais également de stimuler l'activité chondroclastique et ostéoclastique [Gerber et al., 1999].

L'expression de VEGF peut être induite par de nombreux de facteurs ayant une double fonction, angiogène (bFGF, l'IGF-1) ou ostéogène comme les BMP2, BMP4 et BMP7. Réciproquement, ces facteurs sont également régulés par la présence de VEGF [Carano and Filvaroff, 2003] [Deckers et al., 2002]. L'hypoxie joue également un rôle important dans l'induction de la transcription du gène codant pour le VEGF. En effet, il est connu que l'hypoxie stimule la liaison de la protéine HIF (Hypoxia Inducible Factor) à une séquence spécifique présente sur de nombreux gènes dont le VEGF₁₆₅ [Harris, 2002]. Il a été montré que l'hypoxie stimulait l'expression du VEGF₁₆₅ par des ostéoblastes murins et que les os longs de souris surexprimant le HIF1 α étaient plus denses et plus vascularisés que les souris contrôles [Wang et al., 2007b].

Plusieurs types de **FGFs (fibroblast growth factor)** ont été identifiés, mais les mieux caractérisés sont le aFGF (acid FGF ou FGF-1) et le bFGF (basic FGF ou FGF-2) et ont un poids moléculaire d'environ 17 kDa.

Le bFGF, en activant les voies de signalisation impliquant la Protéine Kinase C (PKC) ou les MAPK, stimule l'expression des marqueurs ostéoblastiques tels que le cbfa1/runx2, la PAL, le collagène de type I ou encore l'ostéocalcine (Figure 20). Le bFGF favoriserait également la dégradation de la matrice osseuse en augmentant l'expression des MMPs.

Le bFGF est également un facteur angiogène et favorise la réparation tissulaire en activant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au site de lésion tissulaire [Distler et al., 2003]. Il stimule en particulier la prolifération des cellules endothéliales et d'autres cellules nécessaires à la réparation tissulaire, comme les ostéoblastes pour la réparation du tissu osseux.

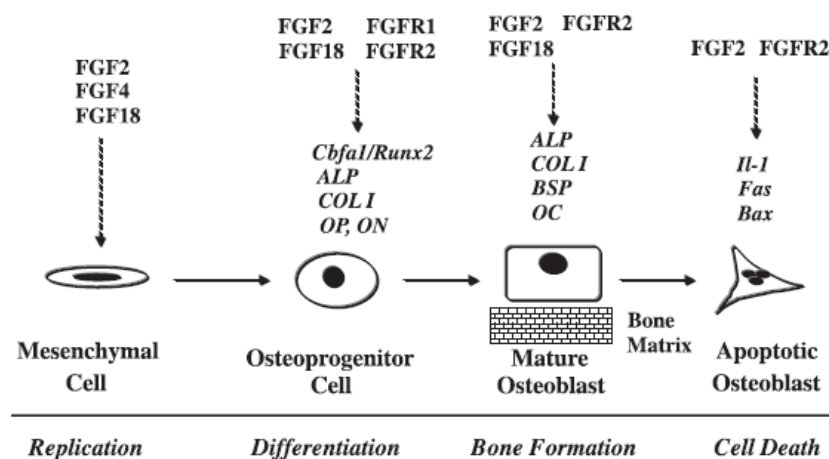


Figure 20. Régulation de l'expression de facteurs ostéoblastiques par la voie de signalisation FGF/FGFR lors de l'ostéogénèse [Marie, 2003]

Les IGFs sont des petits polypeptides de poids moléculaire égal à 7,6 kDa. Deux IGFs ont été caractérisés : l'IGF-1 et l'IGF-2. *In vitro*, les IGFs stimulent la réplication des cellules de la lignée ostéoblastique de manière dépendante de la production de NO [Lagumdzija et al., 2004] et augmentent la synthèse du collagène et d'autres protéines matricielles. Lorsque le gène codant pour le récepteur à l'IGF-1 est déficient, le volume d'os spongieux diminue significativement et le dépôt de minéralisation dans la matrice ostéoïde est limitée [Zhang et al., 2002].

Le lien entre le VEGF₁₆₅ et l'IGF a été établi dès 1997 par les travaux de Wang et coll. [Wang et al., 1997]. Cette étude a montré qu'en présence de cellules endothéliales, les ostéoblastes libèrent du VEGF₁₆₅ qui va alors activer les récepteurs KDR et Flt-1 des cellules endothéliales. En réponse au VEGF₁₆₅ produit, les cellules endothéliales sécrètent de l'IGF-1 et de l'ET-1 stimulant ainsi la fonction des ostéoblastes et probablement l'augmentation de la PAL et de l'ostéocalcine [Wang et al., 1997].

L'endothéline-1 est un peptide synthétisé par de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses. L'ET-1 peut également agir sur les cellules ostéoblastiques qui expriment le récepteur à l'ET-1 et peut alors avoir une influence sur le métabolisme osseux. En effet, il a été montré que ET-1 peut stimuler la synthèse d'ostéix, facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéoblastique, favorisant ainsi la formation osseuse [Saniger et al., 2006]. Il a aussi été suggéré que ET-1 peut activer l'activité ostéoblastique en bloquant dickkopf homolog 1 (Dkk1), un inhibiteur de la voie Wnt [Clines et al., 2007]. L'ET-1 peut également avoir un effet inhibiteur de la différenciation ostéoblastique en diminuant le taux de connexine 43 et la formation de jonctions communicantes [Niger et al., 2008].

Le SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) est une chimiokine, cytokine à fort pouvoir chimioattractant, dont le récepteur unique est le CXCR4. Le SDF-1 joue un rôle important dans le recrutement des cellules progénitrices qui se différencient et se dirigent vers le site de formation osseuse grâce à la circulation sanguine. Otsuru et coll. ont démontré que les cellules endothéliales présentes sur le site de formation osseuse sont à l'origine de la sécrétion de SDF-1 et du recrutement des progéniteurs ostéoblastiques circulants [Otsuru et al., 2008]. De la même manière, SDF-1 est capable de stimuler le recrutement de progéniteurs de la lignée ostéoclastique et de favoriser les étapes précoces de leur différenciation (la fusion cellulaire et l'activation de la TRAP) [Wright et al., 2005]. SDF-1 est également capable d'induire la différenciation de progéniteurs endothéliaux. En effet, des progéniteurs endothéliaux issus du tissu adipeux mis en coculture avec des cellules endothéliales qui sécrètent du SDF-1, se différencient spontanément en cellules endothéliales matures capables de former des tubes dans une matrice de matrigel [Sengenès et al., 2007].

L' HGF (Hepatocyte Growth Factor), synthétisé dans le micro-environnement osseux, peut jouer plusieurs rôles. Il stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et leur capacité à former des structures tubulaires *in vitro* et *in vivo* [Marui et al., 2005] [Nakagami et al., 2005].

Il peut également agir sur les cellules osseuses car celles-ci possèdent le récepteur à HGF (c-met). Il est en outre sécrété par les ostéoclastes [Grano et al., 1996]. Le HGF stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses et induit leur différenciation en ostéoblastes plus particulièrement lorsqu'il est associé à la forme active de la vitamine D [Schiller et al., 2001]. Associé à de

l'hydroxyapatite, il est capable de stimuler la différenciation ostéoblastique des cellules adhérentes au biomatériau [Hossain et al., 2005].

Les cellules osseuses, tout comme les cellules endothéliales, expriment en particulier la eNOS (endothelial NO Synthase) responsable de la synthèse d'**oxyde nitrique (NO)**. Le NO joue un rôle important dans le remodelage osseux. En effet, une diminution de NO entraîne une résorption osseuse augmentée, due à un recrutement des précurseurs ostéoclastiques plus importante, à une stimulation de leur différenciation puis de leur activité [Collin-Osdoby et al., 2000]. Suite à certains types de contraintes mécaniques, le NO peut aussi être sécrété par les cellules souches mésenchymateuses et inhiberait la production de RANKL. La différenciation ostéoclastique serait alors inhibée et la résorption osseuse diminuée [Robling et al., 2006b]. Après stimulation mécanique, les ostéocytes sont également capables de répondre de la même manière que les cellules endothéliales, et sécrètent du NO [Klein-Nulend et al., 2005]. C'est donc en partie par la voie du NO, sécrété par les deux types cellulaires (endothélial et ostéoblastique), que les contraintes mécaniques réguleraient le remodelage osseux.

Au cours des stades plus tardifs de la réparation, l'invasion du cartilage par des ostéoclastes, des cellules ostéogéniques et les vaisseaux sanguins requiert une dégradation des éléments de la matrice cartilagineuse (collagène de type II et protéoglycanes) [Henle et al., 2005]. Cette dégradation est principalement réalisée par les **MMPs**. L'activité des MMPs est régulée par les TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinases) qui ont une fonction inhibitrice des MMPs (Figure 21).

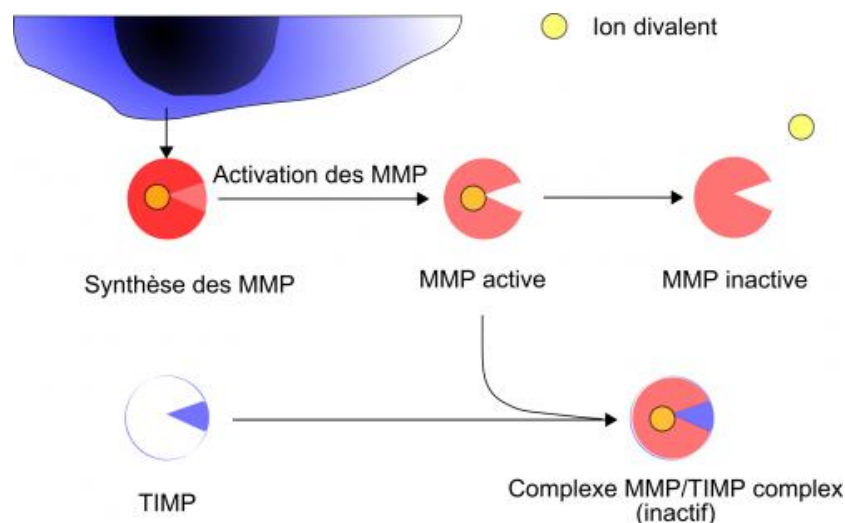


Figure 21. Principe de l'inhibition de l'activité des métalloprotéases matricielles par les TIMPs (<http://www.hydroclean.fr/regulation-des-mmp,10448,fr.html>)

Ces MMPs sont capables de dégrader les composants de la MEC mais aussi des molécules non-matricielle [Kusano et al., 1998]. De ce fait, les MMPs participent à plusieurs fonctions cellulaires (Figure 22): elles dégradent la MEC permettant la migration des cellules et elles modulent l'activité biologique de molécules en les clivant et en les libérant de la MEC.

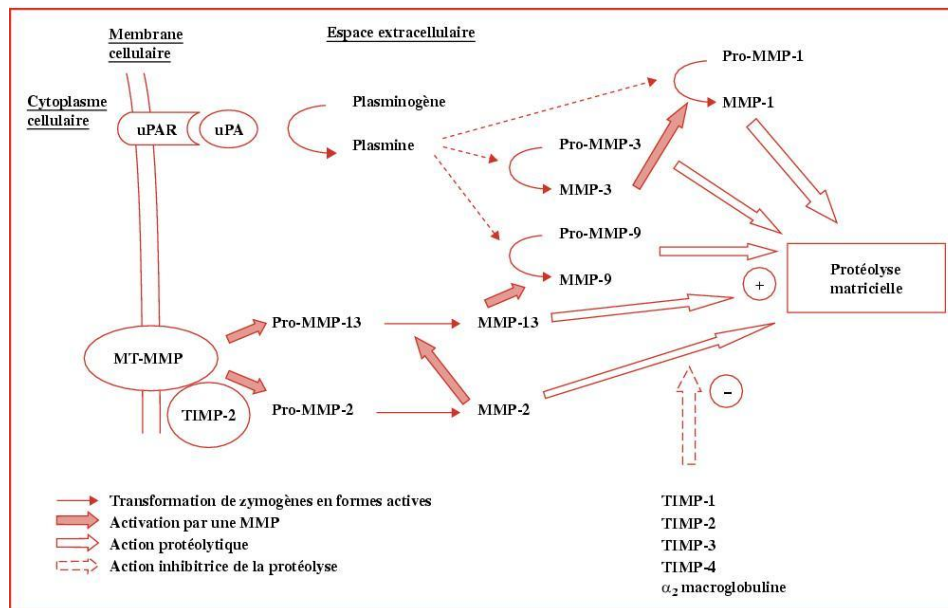


Figure 22. Mécanismes d'activation des MMPs conduisant à la protéolyse de la matrice extracellulaire [Beaudeau et al., 2004]

Dans le tissu osseux, il a été montré que les MMP9 et MMP13 sont les principaux régulateurs clés du remodelage osseux qui coordonnent la dégradation de la MEC mais permettent aussi le recrutement de cellules souches et leur différenciation en cellules ostéogéniques et endothéliales [Ortega et al., 2003].

Cette dégradation matricielle crée un micro-environnement permissif à l'invasion cellulaire et l'infiltration vasculaire. Deux processus sont alors proposés pour réguler l'angiogenèse :

- **Une voie angiopoïétine-dépendante :** l'angiopoïétine 1 et 2 sont des molécules morphogénétiques vasculaires associées à la formation des larges vaisseaux et au développement de branches collatérales à partir de vaisseaux préexistants.
- **Une voie VEGF-dépendante :** le VEGF sera le médiateur de la néoangiogenèse en agissant sur les cellules endothéliales [Li et al., 2011].

b) Les protéines matricielles du tissu osseux

La matrice osseuse, elle-même, de par sa composition protéique notamment, participe à la régulation des processus cellulaires et moléculaires de la réparation osseuse. Les protéines collagéniques jouent un rôle structural et les protéines non collagéniques vont jouer le rôle de modulateurs biologiques [Bornstein and Sage, 2002]. L'expression de ces protéines va être différente dans un modèle de réparation intramembranaire ou endochondrale et va permettre d'orchestrer les événements conduisant au rétablissement d'un os mature [Jingushi et al., 1992]. Ainsi de nombreuses études ont porté sur l'expression, la cartographie et l'effet des protéines matricielles, collagéniques ou non, au cours de la réparation osseuse chez les rongeurs [Sato et al., 1998] [Sandberg et al., 1993] [Hiltunen et al., 1993] [Jingushi et al., 1992].

Ces protéines ont été préalablement décrites dans le paragraphe ID2.

Les collagènes de types II, IX et l'aggrécane sont caractéristiques de la réparation par ossification endochondrale. **Le collagène de type I** s'exprime dès le 5^{ème} jour de réparation, au niveau des centres

d'ossification primaire en bordure des fragments d'une fracture non stabilisée, et au sein des lésions se réparant par ossification intramembranaire. Dans l'ossification endochondrale, mise en place dans les fractures non-stabilisées, la composition du cal cartilagineux joue un rôle dans le contrôle du remodelage du cartilage. Ainsi, l'absence de collagène IX, dans un modèle de réparation chez la souris, induit une persistance du cartilage au niveau du site de fracture et un retard de remodelage en os primaire [Opolka et al., 2007].

La matrice osseuse contient également des protéines non collagéniques synthétisées par les cellules ostéogéniques. Le rôle des protéines matricielles non collagéniques sur la réparation tissulaire a été étudié chez la souris grâce à des modèles de génétique expérimentale [Alford and Hankenson, 2006]. Dans ces modèles, parmi les protéines non collagéniques, **l'ostéonectine** s'exprime précocement au cours de la réparation, elle est détectée par immunohistochimie autour du 4^{ème} jour. C'est une protéine qui se lie au calcium, elle peut modifier la structure de la matrice extracellulaire en agissant sur les protéases extracellulaires et sur le collagène, les peptides issus de cette digestion peuvent aussi avoir un rôle angiogène [Framson and Sage, 2004]. Dans le processus de réparation tissulaire, c'est un modulateur de la prolifération et de la différenciation des cellules mésenchymateuses. **L'ostéopontine** est synthétisée dès le 7^{ème} jour, localisée à l'interface entre le tissu mou et os primaire pendant le processus de transition entre le cal cartilagineux et le cal osseux. Dans tous les cas, l'absence d'ostéopontine diminue la vascularisation et la régression du cal cicatriciel formé lors d'une fracture, ainsi que le remodelage osseux conduisant à un retard de réparation [Duvall et al., 2007]. **L'ostéocalcine** quand à elle s'exprime au-delà du 9^{ème} jour.

3. Les forces mécaniques et leur rôle dans le processus de réparation osseuse

Le tissu osseux est le support mécanique essentiel du squelette, il doit s'adapter continuellement aux forces auxquelles il est soumis. Au sein du tissu osseux les cellules subissent l'action de forces de tension, de compression, d'étirement et des contraintes de cisaillement dues au déplacement des fluides lors de la déformation du tissu (Figure 23) [Rubin et al., 2006].

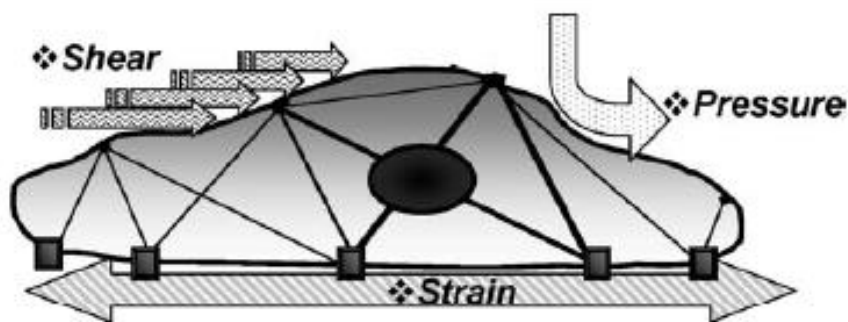


Figure 23. Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire. Le tissu osseux peut être soumis à plusieurs types de stimulation mécanique : des forces de tension (strain), des forces de compression (pressure) ou des forces de cisaillement (shear) [Rubin et al., 2006]

Selon le modèle et le régime utilisé (amplitude, fréquence, durée, continu, intermittent) la réponse cellulaire peut être différente. Parmi les voies de transduction les plus connues, les ostéocytes et les ostéoblastes répondent aux stimuli mécaniques en sécrétant du NO et des prostaglandines [Burger and Klein-Nulend, 1999]. Outre ces cellules déjà différenciées, les cellules stromales de la moelle sont également capables de réguler leur taux de prolifération et leur phénotype en réponse à une stimulation mécanique [Grellier et al., 2009] [Li et al., 2004].

Les cellules ostéoblastiques et les cellules mésenchymateuses sont capables de percevoir ces différents stimuli grâce à la présence de plusieurs mécanorécepteurs présents à leur membrane, comme des canaux ioniques ou encore les intégrines (Figure 24). Ces récepteurs vont transformer le signal mécanique en un signal chimique: c'est le principe de la mécanotransduction [Robling et al., 2006b].

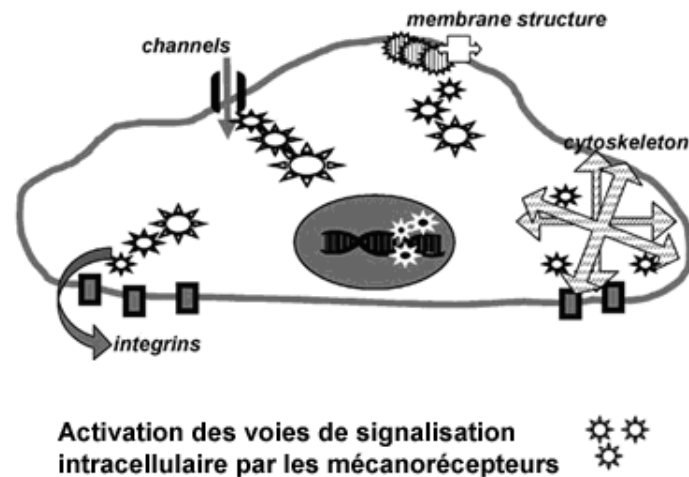


Figure 24. Les mécanorécepteurs des ostéoblastes [Rubin et al., 2006]

Le signal est ensuite transmis aux cellules environnantes :

- Par la production de facteurs solubles agissant de façon autocrine et/ou paracrine,
- Par des jonctions intercellulaires communicantes faisant intervenir des connexines [Rubin et al., 2006] [Robling et al., 2006b], de jonctions adhérentes faisant intervenir des cadhérines ou,
- En créant des interactions avec la matrice extracellulaire, *via* l'activité des intégrines.

Dans le cas d'un processus de réparation tissulaire, les forces mécaniques conditionnent la mise en place de la réparation du tissu osseux, en orientant celle-ci vers un mécanisme d'ossification endochondrale ou membranaire selon la stabilité, la géométrie de la lésion, le type de contraintes existant au niveau des cals fracturaires [Schell et al., 2005]. La combinaison de ces éléments va déterminer le type d'ossification; l'ossification endochondrale est stimulée par les contraintes mécaniques, favorisant la chondrogenèse, et inhibée par l'immobilisation. Inversement la réparation intramembranaire est privilégiée lorsque les segments osseux sont stabilisés [Lacroix and Prendergast, 2002] [Claes and Heigele, 1999].

De façon générale, la néoformation osseuse doit intervenir dans des conditions de stabilité suffisante, sans quoi le seul tissu capable de se former est un fibro-cartilage peu résistant, peu évolutif en termes de spécificité tissulaire, et en pérennisant l'instabilité et l'incompétence mécanique, on s'oriente vers la constitution d'une pseudarthrose. Après une fracture importante, le chirurgien orthopédique peut créer artificiellement cette stabilité par la pose de fixateurs internes ou externes et dans ce cas, contourner la réparation endochondrale en favorisant une réparation directe.

Des contraintes mécaniques modérées peuvent être bénéfiques et être utilisées comme traitement non pharmacologique par les chirurgiens orthopédiques afin de potentialiser la réparation tissulaire

ou prévenir l'ostéoporose [Rubin et al., 2006]. Ceci est appelé « dynamisation ». Ce procédé est largement utilisé lors du processus d'allongement osseux appelé distraction ostéogénique destiné à réparer ou à allonger les os longs [Isaksson et al., 2006].

La charge mécanique appliquée est également importante lors du remodelage osseux, une immobilisation prolongée peut entraîner une activation de la résorption osseuse. A l'opposé, l'exercice physique est susceptible de promouvoir la synthèse osseuse. De façon plus précise, il apparaît d'un point de vue cellulaire que :

- ⇒ La charge mécanique va augmenter la pression hydrostatique dans la moelle osseuse qui aura pour conséquence d'interrompre la différenciation ostéoclastique [Robling et al., 2006a].
- ⇒ La stimulation mécanique va stimuler la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, activer la différenciation des cellules bordantes en ostéoblastes et la minéralisation de la matrice [Chow et al., 1998].

III. Les stratégies de réparation du tissu osseux

A. Problématique clinique

Comme dit précédemment, le tissu osseux est un tissu conjonctif capable de réparer naturellement certaines lésions traumatiques ou non traumatiques de petit volume. Dans le cas de pertes de substance osseuses trop importantes, les chirurgiens doivent avoir recours à d'autres stratégies de reconstruction ou de comblement osseux afin de stimuler la cicatrisation.

Cette problématique clinique est d'autant plus vraie, compte tenu du vieillissement de la population. En effet, la moyenne d'âge de la population mondiale est en constante augmentation et le nombre de fractures augmente lui aussi. A titre d'exemple, le nombre de fractures de hanches pourrait passer de 1,7 millions en 1990 à 6,3 millions dans les années 2050 [Siegbahn et al., 2005]. En outre, les conséquences de ce type de fractures sont extrêmement lourdes: 10 à 20% des patients décèdent, 20 à 60% retrouvent leur niveau initial d'indépendance, 15 à 25% entrent en institution médicalisée et 25 à 35% rejoignent leur domicile mais restent dépendants d'une aide. Le remplacement des pertes de tissu osseux reste donc un enjeu d'actualité et un réel problème de santé publique. Parmi les solutions qui s'offrent au chirurgien, les greffes osseuses constituent une première approche thérapeutique.

B. Les greffes osseuses

La greffe osseuse est définie comme « un procédé consistant à prélever un fragment d'os d'une partie du corps pour réduire une lésion osseuse située dans une autre partie du corps ». Le site osseux lésé qui va être réparé est appelé « site receveur » par opposition au site de prélèvement appelé « site donneur ». Le greffon peut provenir du receveur lui-même, dans ce cas c'est une autogreffe. S'il provient d'un autre individu de la même espèce, il s'agit d'une allogreffe et si c'est une espèce différente il s'agit d'une xélogreffe.

1. Les différents types de greffons

a) Les greffons spongieux

L'os spongieux ou l'os trabéculaire est présent dans les épiphyses et les métaphyses des os longs et l'intérieur des os plats et courts. Il est au centre du remodelage osseux grâce à sa richesse cellulaire. Ce type de greffon présente l'avantage d'être ostéogène, de par sa richesse cellulaire, ostéoconducteur car capable de guider et de supporter la déposition d'un nouveau tissu osseux, et ostéoinducteur, par la présence de facteurs de croissance et de protéines apportés par les greffons induisant la différenciation des cellules souches de l'hôte en ostéoprogéniteurs susceptibles de former un nouveau tissu osseux. Il apporte ainsi la fraction minérale, la fraction protéique et les signaux morphogènes favorisant l'ostéogenèse. L'inconvénient majeur de cette méthode est la morbidité importante au niveau du site de prélèvement, la difficulté du chirurgien à récolter d'importants volumes de tissu spongieux. Cette méthode reste donc adaptée aux lésions de petite taille (pseudarthroses, arthrodèses ou chirurgie de révision de prothèse totale de hanche).

b) Les greffons corticaux

L'os cortical ou os compact constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os courts et plats. Il est constitué d'ostéons cylindriques et de fibres de collagène qui lui octroient une importante résistance mécanique. Cependant, il présente plusieurs inconvénients : il contient peu de cellules et cette méthode nécessite une stabilité assurée par un matériel d'ostéosynthèse. Le greffon idéal serait un greffon cortico-spongieux associant les propriétés mécaniques de l'os cortical et les propriétés ostéoinductrices de l'os spongieux.

2. Les différents types de greffes

a) L'autogreffe

C'est la greffe d'os la plus pratiquée, elle consiste à prélever un fragment osseux sur le sujet lui-même. Dans ce cas, le prélèvement et la pose du greffon sont réalisés lors de la même séance chirurgicale. Le prélèvement est effectué le plus souvent au niveau du tibia ou de la crête iliaque (bord supérieur de l'os du bassin) [Canady et al., 1993]. Les greffes autologues d'os cortical peuvent être réalisées avec le pédicule vasculaire, ce qui permet de disposer d'un greffon osseux vivant, accélérant la consolidation de la greffe [Soucacos et al., 2011]. Les autogreffes sont employées pour combler une perte de substance, pour faciliter la consolidation d'un os fracturé, pour favoriser la bonne évolution d'un cal ou lors d'une arthrodèse (intervention chirurgicale consistant à bloquer définitivement une articulation, par exemple entre deux vertèbres). C'est le greffon idéal car il n'entraîne pas de réaction immunitaire. De plus aucun traitement préalable n'est nécessaire pour préparer le greffon ce qui permet de préserver la cellularité. L'utilisation des autogreffes offre de très bons résultats cliniques, l'incorporation du greffon dans l'os greffé s'effectue dans un délai d'environ 6 semaines. Cependant, les réserves d'os autologues et notamment d'os spongieux sont limitées dans le corps et un risque non négligeable existe au niveau du site donneur (douleur, risque septique, fractures secondaires). Enfin, cette technique n'est pas toujours utilisable chez les sujets âgés, le plus souvent des patients déminéralisés ou ostéoporotiques.

b) Les alternatives à l'autogreffe

L'autogreffe reste la technique de choix mais l'allogreffe est parfois la seule alternative, lorsque la perte de substance est très importante ou encore chez les sujets âgés, compte tenu de la qualité de leur tissu [Aro and Aho, 1993]. Le greffon provient le plus souvent de déchets chirurgicaux (principalement des têtes fémorales) ou à partir de cadavres. Le greffon peut aussi provenir d'une espèce différente (**xénogreffe**). Certaines xénogreffes sont à ce jour commercialisées tels que les produits Surgibone®, Laddec®, Oxbone® qui sont le plus souvent d'origine bovine.

Ces greffons doivent être traités pour prévenir des réactions immunitaires et contaminations virales [Friedlaender and Horowitz, 1992]. La sécurisation bactérienne et virale des greffons est assurée par une sélection stricte des donneurs [Eastlund, 1995], des conditions aseptiques de prélèvement et de conservation, une mise en quarantaine dans des banques de tissus à -80°C [Friedlaender, 1987]. Les différents modes de stérilisation sont : la chaleur, l'irradiation gamma ou encore la stérilisation à l'oxyde d'éthylène. D'autres moyens tels que la délipidation et la déprotéination peuvent être utilisés pour les xénogreffes [Chappard et al., 1993]. Cependant les protocoles de préparation des greffons peuvent affecter leurs propriétés et compromettre les mécanismes d'incorporation de la greffe [Stevenson et al., 1996] [Dziedzic-Goclawska et al., 1991].

c) Les greffes vascularisées

Dans un contexte tumoral, infectieux, traumatique ou dégénératif avasculaire, des techniques de reconstruction par des greffes vascularisées sont mises en place. Ces lambeaux offrent une totale autonomie vasculaire, s'affranchissant en partie du statut des lieux où ils sont insérés et permettent une consolidation solide dans le temps avec de faibles complications infectieuses. Cependant, ils nécessitent des techniques chirurgicales sophistiquées, longues, onéreuses, avec une morbidité élevée [Finkemeier, 2002]. Le greffon vascularisé le plus utilisé est le péroné (ou fibula) transféré avec son pédicule vasculaire et anastomosé au réseau du site receveur au niveau de défauts osseux atteignant les os longs (fémur, tibia) [Beris et al., 2011] [Malizos et al., 2004].

Dans les situations où l'autogreffe est dépassée, la technique de la membrane induite par du ciment, décrite par Alain-Charles Masquelet, prend tout son intérêt. Dans un premier temps, la perte de substance osseuse est comblée par une entretoise composée d'un ciment chirurgical (méthylméthacrylate) et on recouvre l'entretoise par un lambeau musculaire. Cet espaceur génère une membrane pseudo-synoviale riche en facteurs de croissance ostéomodulateurs et pro-angiogéniques (VEGF, TGF- β BMP-2) [Pélissier et al., 2003a]. Dans un second temps, une greffe osseuse spongieuse autologue est insérée à l'endroit du ciment. La membrane induite protégerait l'os greffé de la résorption, améliorerait sa vascularisation, et faciliterait son remodelage et son adaptation aux contraintes mécaniques [Giannoudis et al., 2011] [Viateau and Hannouche, 2010] [Masquelet et al., 2000].

En résumé, l'utilisation des greffes osseuses représente entre 75 et 90% des indications cliniques dans le traitement des pertes osseuses [Stevenson, 1998]. Bien que l'autogreffe demeure la plus utilisée (50% des cas) elle présente des inconvénients liés à son prélèvement (lésions nerveuses, atteintes cosmétiques, hémorragies, risques de fractures secondaires). L'allogreffe reste une bonne alternative mais ne possède pas les mêmes propriétés biologiques notamment en termes d'ostéoinductivité et présente des risques potentiels d'ordre infectieux et immunologiques. Toutes

ces limites liées à l'utilisation des greffes osseuses ont largement contribué à la recherche et au développement de biomatériaux assurant une parfaite biosécurité pour le patient.

C. Du biomatériau de comblement osseux à l'ingénierie tissulaire osseuse

La Société Européenne des Biomateriaux (ESB) a défini, lors de la conférence de Chester (UK) en 1991, puis à l'occasion de celle de Sorento (Italie) en 2005 un **biomatériau** comme un « *matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance ou assistance fonctionnelle.* »

On peut distinguer les biomatériaux prothétiques nécessaires pour remplacer une pièce squelettique (prothèses articulaires, implants dentaires) et les biomatériaux de comblement nécessaires pour combler des lésions osseuses. Parmi ceux-ci, les plus utilisés en cliniques sont des matrices tridimensionnelles à base de phosphates de calcium, de nature chimique proche de la composition minérale de l'os, telles que des matrices à base d'hydroxyapatite et/ou de phosphate tricalcique. Ces derniers seront décrits dans le paragraphe IVA2.

Cependant, ces biomatériaux ont à des degrés divers, des performances insuffisantes dues à une adaptation incomplète aux contraintes de l'environnement des tissus vivants au sein desquels ils seront intégrés et n'offrent pas à eux seuls une parfaite biointégration au niveau du site receveur. Les échecs rencontrés dans le domaine de ces biomatériaux peuvent être liés à leur faible capacité de colonisation tissulaire conduisant à une repousse osseuse incomplète, à leur faible résistance mécanique, à l'absence d'ostéoinductivité, à une dégradation non contrôlée et/ou à un défaut de vascularisation après leur implantation [Moldovan, 2005]. Les techniques **d'ingénierie tissulaire** permettent à ce jour de développer de nouvelles stratégies de médecine régénératrice pour le remplacement d'un organe. Ce champ pluridisciplinaire combine les savoirs et les procédés venant de la physique, la biologie cellulaire, l'ingénierie chimique et les sciences de la matière. Selon ce principe d'ingénierie tissulaire, les biomatériaux seront associés à des composantes cellulaires et/ou biochimiques [Vinatier et al., 2011].

Les principaux acteurs sollicités par ces techniques de reconstruction tissulaire sont présentés dans la Figure 25. Il s'agit :

- d'un **biomatériau, d'une matrice tridimensionnelle,**
- de **cellules présentant une capacité ostéogénique,**
- des **facteurs bioactifs**, comme des facteurs de croissance, capables d'activer la fonction des cellules hébergées dans la matrice, ou d'activer les cellules hôtes,
- des **facteurs mécaniques.**

Le biomatériau aura pour mission de véhiculer les cellules dites « réparatrices » et de leur permettre d'initier un processus de régénération. Ce biomatériau peut être utilisé également comme un système de délivrance de cellules, de facteurs bioactifs afin de stimuler la régénération au niveau du site lésé. Ces deux approches ne sont pas exclusives et peuvent être combinées [Howard et al., 2008]. Ce **produit d'ingénierie tissulaire (PIT)** doit être capable de répondre à des stimulations mécaniques. Dans ce dernier cas, la culture de ces PIT dans des bioréacteurs est susceptible de fournir un environnement dynamique de culture et favoriser un meilleur transfert en oxygène et en nutriments. Les différents acteurs sollicités dans le développement de ces PIT seront détaillés dans le chapitre IV.

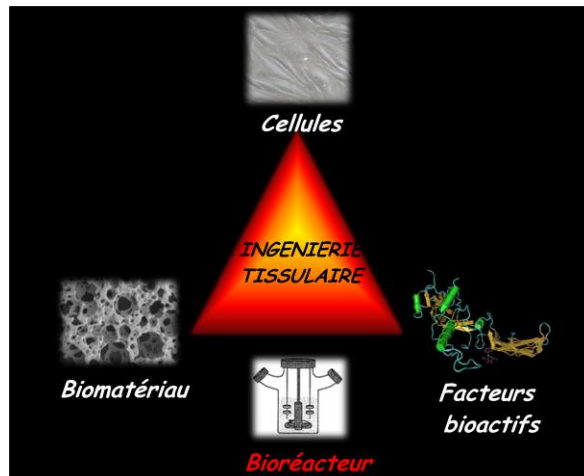


Figure 25. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire.

IV. L'ingénierie tissulaire osseuse et ses acteurs

La Figure 26 résume les principales étapes de l'ingénierie tissulaire « de la boîte de culture jusqu'au lit du patient ». Les cellules peuvent être prélevées chez le patient, multipliées et/ou différenciées en culture *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure peut alors être cultivée sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour stimuler la synthèse d'une matrice extracellulaire par les cellules elles-mêmes. Enfin, ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient.

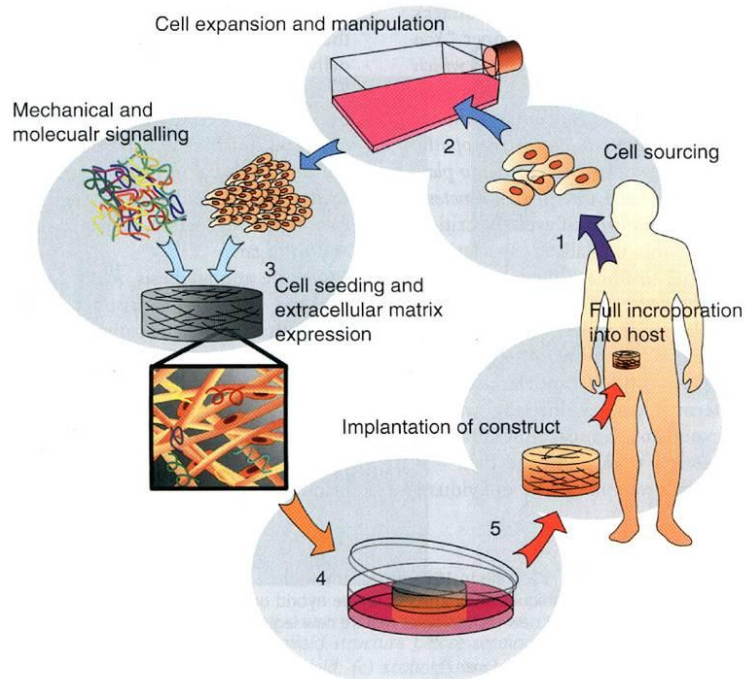


Figure 26. Les étapes de l'ingénierie tissulaire. Les cellules sont prélevées chez le patient, cultivées *in vitro*, associées à une un biomatériau et réimplanté chez le patient [Van Blitterswijk, 2008]

A. Les biomatériaux

Les biomatériaux destinés à la réparation osseuse doivent être capables d'assurer un support structural et mécanique aux cellules « réparatrices » qui vont le coloniser, permettre leur prolifération et la synthèse d'une matrice osseuse minéralisée. Ils doivent répondre à un cahier des charges précis prenant en compte les caractéristiques biologiques du tissu osseux [Sundelacruz and Kaplan, 2009].

1. Le cahier des charges des matériaux de substitution osseuse

Les principaux paramètres en prendre en considération sont présentés dans la Figure 27.

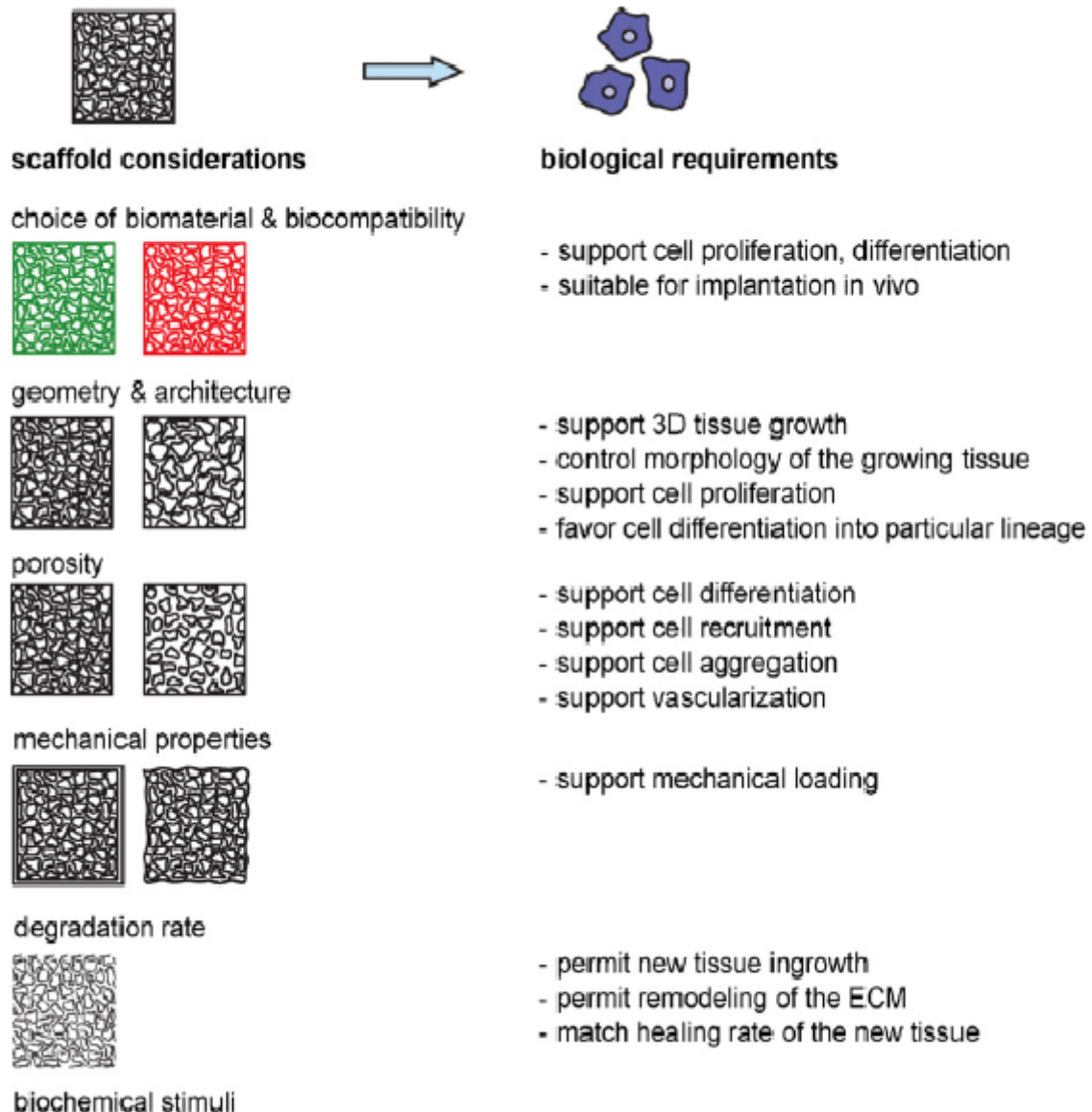


Figure 27. Les propriétés du biomatériau doivent correspondre aux considérations biologiques du tissu osseux [Sundelacruz and Kaplan, 2009]

Un biomatériau doit avant tout être **biocompatible**, c'est-à-dire qu'il ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire importante, ni de toxicité envers les tissus receveurs et les cellules qu'il peut héberger [Tang and Hu, 2005]. Une réelle interface entre le biomatériau et le tissu hôte appelée

bioactivité est clairement requise. Cette propriété permet d'une part, l'établissement de liaisons entre le matériau et le tissu osseux, permettant son **ostéointégration** et d'autre part, la réhabilitation du substitut par les cellules, favorisant la néoformation osseuse. La nature de l'interface biomatériau/hôte va guider le processus d'**ostéoconduction** qui définit la capacité du matériau à permettre l'adhésion, la migration des cellules en son sein, le développement d'un réseau vasculaire et le dépôt de tissu osseux en contact direct avec le matériau sans aucune interposition fibreuse.

L'**ostéoinductivité** quant à elle, est la capacité « active » du biomatériau à recruter des cellules indifférenciées, les orienter vers la voie ostéogénique et induire la formation d'os au sein d'un site non osseux. L'ostéoinductivité peut être induite par des facteurs de croissance de type BMPs, combinés au matériau, ou par la présence de cellules mésenchymateuses ou ostéoprogénitrices lorsqu'elles sont associées à la matrice. Ces propriétés ostéoconductrices peuvent être aussi liées aux propriétés intrinsèques du matériau (macro et microstructure), comme certaines céramiques à base de phosphate de calcium [Habibovic and de Groot, 2007] [Habibovic et al., 2006b].

La **porosité** est définie par le diamètre moyen des pores et le pourcentage de « vide » qu'il représente par rapport au volume total de matériau. La porosité est essentielle à l'activité biologique d'un biomatériau destiné à la régénération osseuse. Cette porosité conditionne *in vitro* la colonisation cellulaire et *in vivo* l'infiltration cellulaire et tissulaire, la vascularisation et les interactions avec le milieu biologique. La **macroporosité** est obtenue grâce à l'ajout d'un agent porogène lors de la synthèse du matériau (billes de naphthalène, NaCl, peroxyde d'hydrogène). La taille des macropores dans le cas des biomatériaux actuellement développés pour la substitution osseuse est le plus souvent comprise entre 100 µm et 600 µm. Des pores de petite taille peuvent favoriser la chondrogenèse suivie de l'ostéogenèse alors que des pores de plus grand diamètre semblent favoriser la formation d'os *via* un processus de réparation intramembranaire [Jin et al., 2000]. En dessous de 100 µm, la repousse osseuse peut être limitée [Karageorgiou and Kaplan, 2005].

Un autre type de porosité, la **microporosité** définit des pores de diamètre compris entre 1µm et 10 µm. Elle permet la diffusion des fluides biologiques et les échanges ioniques.

La **porosité totale** est définie comme la somme de la macroporosité et de la microporosité. *In vitro*, un faible volume poreux peut stimuler la différenciation ostéoblastique due à une diminution des capacités prolifératives des cellules. *In vivo*, un volume poreux élevé permettra une augmentation de l'ostéogenèse liée, en partie, à l'augmentation de la vascularisation [Karageorgiou and Kaplan, 2005].

Un autre paramètre important dans l'élaboration d'un biomatériau est l'**interconnectivité** des pores. Celle-ci permet la communication entre les pores de la surface de la matrice et ceux au centre de celle-ci, la porosité est alors dite « ouverte ». L'interconnectivité va permettre la circulation des fluides biologiques entre les pores, et une colonisation cellulaire optimale [Guarino and Ambrosio, 2010]. Ainsi l'architecture poreuse d'un biomatériau permet d'orienter la spécificité du tissu néoformé (cartilage *versus* os), sa structure (structure trabéculaire ou corticale) et de favoriser un type de réparation (intramembranaire ou endochondrale).

Les propriétés mécaniques des matériaux doivent être adaptées au site d'implantation auxquels ils sont destinés. Les contraintes dynamiques seront par exemple différentes en site d'implantation mandibulaire ou en site fémoral. D'un point de vue chirurgical, dans le cas où la résistance mécanique des matériaux est insuffisante, ils pourront être associés à des systèmes de fixation interne ou externe.

Le matériau doit être **résorbable** afin de permettre son remplacement progressif par le tissu osseux néoformé [Williams, 2008] [Baquey et al., 1991].

La dégradation d'un biomatériau peut être de nature physico-chimique due à l'interaction entre la surface de l'implant et l'environnement biologique, pouvant être la conséquence d'un processus de dissolution ou de précipitation. La dégradation peut également être liée à une activité cellulaire, en effet, les ostéoclastes peuvent, de la même façon qu'ils dégradent le minéral osseux (voir paragraphe IC4), résorber certains types de supports tridimensionnels comme certaines céramiques de phosphate de calcium [Vogel et al., 2004] [Basle et al., 1993].

D'un point de vue pratique, le matériau doit être disponible sous différentes **formes galéniques** (granules, poudre, blocs) qui permettront d'appréhender tous les types de lésions, ou **morphologiques** (coins d'ostéotomie ou inserts de cage vertébrale) usinés sur mesure. Enfin, les biomatériaux **injectables** sont de plus en plus privilégiés pour rendre les interventions chirurgicales les moins invasives possibles et offrir une régénération osseuse quelle que soit la forme de la lésion osseuse [Rederstorff et al., 2011] [Zhou and Xu, 2011] [Park et al., 2011].

Ainsi le développement d'un substitut osseux réunissant ces propriétés, constitue un véritable défi à réaliser. Idéalement, l'implant devra fournir une intégrité structurale aux cellules, leur permettant de synthétiser leur propre matrice, devra se dégrader en même temps que le néo-tissu se forme et assurer à son tour les propriétés mécaniques nécessaires. L'évaluation *in vitro*, et les études précliniques de ces supports tridimensionnels devront permettre de contrôler ces paramètres et préciser les types d'applications d'un tel substitut.

2. Les différents biomatériaux de substitution osseuse actuels

Les principaux biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire sont des céramiques, des polymères ou des matrices composites. Ce sont des matériaux synthétiques ou naturels.

Dans les années 70, les matériaux plus proches de la phase minérale de l'os ont été développés pour le comblement de défauts osseux : les **phosphates de calcium**, matériaux les plus utilisés dans les applications cliniques de comblement [Moore et al., 2001] en alternative à la greffe osseuse.

Les **biocéramiques phosphocalciques** (Figure 28) sont des matériaux synthétiques produits à partir d'un minéral naturel. La mise en forme pour l'utilisation clinique nécessite plusieurs étapes : après calcination à plus de 900°C, la poudre est compactée sous pression puis chauffée de 1100 à 1500°C, c'est le frittage. Il y a alors fusion des constituants, puis agglomération des microcristaux qui se forment au refroidissement et restent soudés. Les interstices entre les cristaux créent la microporosité qui dépend de la pression et de la température. L'addition d'agents porogènes crée une macroporosité suite à un mécanisme de sublimation à haute température. Le procédé de fabrication des céramiques permet de contrôler également la taille et la forme de la pièce, ainsi que

leur granulométrie et leur densité (Figure 28). La famille des biocéramiques phosphocalciques comprend principalement le phosphate tricalcique (TCP), les apatites avec plus particulièrement l'hydroxyapatite (HA).

L'hydroxyapatite est un minéral dont la formule chimique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ce composé, naturellement présent dans le tissu osseux est largement utilisé pour le comblement de pertes osseuses. Néanmoins, l'hydroxyapatite est soumise à une très faible résorption naturelle. Pour améliorer la cinétique de leur dégradation, l'hydroxyapatite est souvent associé à un autre phosphate de calcium, le **phosphate tricalcique**. Le phosphate tricalcique présente deux formes cristallines différentes, la forme α et la forme β . La forme α trop soluble n'est pas adaptée à une cinétique de reconstruction tissulaire. Seule la forme β est utilisée en chirurgie osseuse. Ce matériau est plus soluble et sa biodégradation plus importante *in vivo* par rapport à l'HA [LeGeros, 1993]. Ainsi ces **céramiques biphasiques** allient le potentiel ostéoconducteur de l'HA à la résorbabilité du β TCP. Les propriétés de ce composite et notamment la vitesse de dégradation vont varier en fonction de la proportion respective des deux éléments.



Figure 28. Les céramiques phosphocalciques. Différentes formes peuvent être développées pour correspondre à tous types de lésions osseuses (<http://www.biomatlante.com>)

D'un point de vue de leur biocompatibilité, l'ostéointégration des céramiques phosphocalciques est parfaite, sans interposition de tissu fibreux à l'interface biomatériau / tissu. Certaines des céramiques phosphocalciques, de par leur architecture, leur porosité, présenteraient un potentiel ostéoinducteur en site ectopique [Habibovic et al., 2006a] et seraient capables de régénérer des lésions de taille critique. De façon plus précise, dans un modèle d'implantation de céramiques en site intramusculaire, Yuan et coll. [Yuan et al., 2010] ont démontré que la formation osseuse augmente avec la microporosité. Celle-ci est corrélée à une augmentation des surfaces d'échanges entre les cellules et le milieu biologique et à un processus de dissolution/précipitation de la céramique. Les cristaux en contact avec les fluides biologiques vont se dissoudre et vont interagir avec des ions d'origine biologique pour ensuite précipiter et former des cristaux apatitiques biologiques proches de ceux de l'os favorisant l'absorption de protéines, dont les BMPs, permettant ainsi d'orienter les cellules vers une différenciation ostéoblastique et d'initier un processus de minéralisation [Habibovic et al., 2005].

Des travaux de la littérature démontrent *in vitro* que les phosphates de calcium favorisent l'adhérence cellulaire des ostéoprogéniteurs, leur prolifération et la synthèse d'une matrice minéralisée [Granja et al., 2005]. La macroporosité des céramiques de phosphate de calcium permet

une meilleure colonisation du matériau par les cellules, même si la vascularisation n'est souvent observée qu'à la périphérie de ces implants.

Les particules de β TCP peuvent être associées à un gel d'hydroxypropylméthylcellulose (HMPC) qui sert de vecteur et constitue un **substitut phosphocalcique injectable** qui favorise la régénération osseuse [Daculsi et al., 2010] [Rederstorff et al., 2011]. Cependant, leurs propriétés mécaniques peuvent être insuffisantes selon l'application envisagée.

Le corail est un autre substitut osseux résorbable composé de carbonate de calcium issu de la partie minérale du corail naturel. Sa biocompatibilité et son ostéointégration sont excellentes quel que soit le type de corail [Demers et al., 2002]. Cependant, la présence d'éléments organiques (principalement des résidus de protéines collagéniques et non collagéniques) suscitent d'importantes réactions inflammatoires. En outre, sa dégradation est trop rapide et limite son utilisation.

Il existe d'autres composés bioactifs qui permettent l'apposition de tissu ostéoïde à leur surface, tels que **les bioverres**. Ceux-ci (45S5 Bioglass®) se présentent sous forme de granules et sont utilisés en particulier en orthodontie pour leurs qualités de résorption et de substitution osseuse supérieures aux hydroxyapatites. Les verres bioactifs les plus étudiés et utilisés sont composés principalement d'oxydes de silicium, de sodium, de calcium et de phosphore. Ces matériaux présentent une importante bioactivité due à la capacité du bioverre à former de l'hydroxyapatite carbonatée (HAC) [Gatti et al., 2006]. La bioactivité du bioverre lui confère des propriétés d'ostéoconduction, d'ostéostimulation et de résorption.

Au côté de ces supports, les polymères, d'origine synthétique ou naturelle, offrent des caractéristiques parfaitement adaptées à la régénération osseuse [Liu and Ma, 2004].

Les principaux **polymères synthétiques** sont le poly(lactic acid) PLA et le poly(glycolic acid) PGA. Les principaux **polymères d'origine naturelle**, synthétisés par des organismes vivants, sont des polysaccharides (pullulane, alginate, chitosane) [Venkatesan and Kim, 2010] [Autissier et al., 2007] [Augst et al., 2006] ou encore des protéines (collagène, soie, fibrine) [Cen et al., 2008] [MacIntosh et al., 2008] [Ahmed et al., 2008]. Les polymères sont aisément façonnables de par leur composition et leur structure [Rezwan et al., 2006] [Liu and Ma, 2004]. De manière générale, les polymères sont biocompatibles, ils permettent ainsi aux cellules de proliférer et de se différencier sans engendrer de réactions inflammatoires ou cytotoxiques [Lubiatowski et al., 2006].

Leur caractère biodégradable constitue un atout important en ingénierie tissulaire osseuse [Rezwan et al., 2006] [Lutolf and Hubbell, 2005]. De par leur nature chimique, les polymères peuvent être le support de nombreuses modifications permettant d'adapter et de moduler leurs propriétés [Liu and Ma, 2004]. Les biomatériaux composés de polymères ont la capacité de mimer les propriétés biochimiques et structurelles de la matrice extracellulaire. Ils vont ainsi pouvoir séquestrer les facteurs de croissance, nécessaires à la régulation de l'activité cellulaire. En ingénierie vasculaire, les études menées sur le fucoïdane ont montré sa capacité à retenir le VEGF₁₆₅ et à favoriser la migration des cellules endothéliales et la formation de structures tubulaires [Lake et al., 2006].

Les polymères sont utilisés également comme des systèmes de délivrance de molécules bioactives ou encore comme des matrices permettant le transport de cellules et la néoformation d'un tissu [Lee and Shin, 2007]. De nombreux produits à base de collagène de type I sont commercialisés à ce jour (CollapatII®, Collagraft®, Biostite®) et permettent la colonisation, la prolifération et la

différenciation cellulaire. L'incorporation de PGA aux éponges de collagène permet d'augmenter leur résistance ainsi que le nombre de cellules mésenchymateuses adhérentes dans des modèles *in vitro* [Hosseinkhani et al., 2005] [Hiraoka et al., 2003].

De nombreuses équipes ont également étudié le **chitosane**, utilisé dans des systèmes implantables ou injectables afin de délivrer en particulier des facteurs de croissance [Akman et al., 2010b] [Akman et al., 2010a] ou encore des glucocorticoïdes [Tigli et al., 2009] pour stimuler l'ostéogenèse.

Parmi les autres polymères à base de polysaccharide, l'**alginate**, isolé à partir d'algues comme les *Lessonia flavicans*, *Desmarestia ligulata* ou *Desmarestia distans* [Leal et al., 2008] permet en particulier l'encapsulation de cellules et/ou de molécules dans un hydrogel [Evangelista et al., 2007]. Grellier et coll. en 2009 [Grellier et al., 2009] ont montré que les cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse peuvent former *in vitro* et *in vivo* une matrice extracellulaire minéralisée dans des billes d'alginate.

Le **pullulane** est un autre polysaccharide neutre et non immunogène produit à partir de la fermentation de l'amidon par le champignon *A. pullulans*. Des hydrogels à base de pullulane sont déjà utilisés pour des applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire cardiovasculaire [Autissier et al., 2010] [Autissier et al., 2007] [Thébaud et al., 2007]. Ce type de matrice offre une chimie et une porosité modulable, et d'intéressantes perspectives d'applications pour l'ingénierie tissulaire osseuse [Park, 2011].

Les principales limites de ces matrices à base de polymères sont leur manque de résistance mécanique pour supporter les forces de l'environnement osseux, et pour certains de ces polymères, un manque d'ostéoconductivité.

A ce jour, de nouvelles matrices composites, associant polymères et phosphates de calcium sont développées [Swetha et al., 2010] afin de mimer au plus près la matrice osseuse, mélange de composants organiques et inorganiques. Les éléments à base de phosphate de calcium assurent les propriétés mécaniques et l'ostéoconductivité [Roohani-Esfahani et al., 2010] [Swetha et al., 2010] et la composante polymère, composée de collagène [Wahl and Czernuszka, 2006], de chitosane [Venkatesan and Kim, 2010] [Thein-Han and Misra, 2009] [Wang et al., 2007a], d'alginate [Lee et al., 2011], de PCL [Guarino et al., 2008] ou de PLGA [Lao et al., 2011], améliore la biocompatibilité et la biodégradabilité du biomatériau.

B. La composante cellulaire dans les produits d'ingénierie tissulaire osseuse

La production d'un PIT *in vitro* requiert l'utilisation de cellules dites « réparatrices », capables de produire une matrice extracellulaire spécifique et de régénérer le tissu natif fonctionnel au sein du biomatériau.

Le développement du tissu osseux ainsi que sa réparation sont assurés en partie par des progéniteurs ostéoblastiques en concertation avec les autres cellules du micro-environnement tissulaire. Dans un contexte de régénération du tissu osseux, les cellules souches mésenchymateuses sont connues pour s'orienter vers la voie ostéoblastique sous l'action de différents stimuli biochimiques, cellulaires et ou mécaniques.

Les cellules souches se définissent par leur capacité de différenciation, d'auto-renouvellement, sans signe de sénescence et présentent une plasticité élevée. Toutes ces qualités en font des cellules de

choix pour l'ingénierie tissulaire osseuse [Seong et al., 2010]. Les cellules souches utilisées peuvent être d'origine adulte ou embryonnaire.

1. Le choix du type cellulaire pour des applications en ingénierie tissulaire

a) **Les cellules souches embryonnaires**

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes, elles sont capables de s'orienter vers tous les types cellulaires des trois feuillets membranaires à l'exception des tissus extra embryonnaires comme le placenta et le cordon ombilical. Elles proviennent de la masse interne du blastocyste, composée de 30 à 40 cellules isolées et cultivées sur des revêtements nourriciers spécifiques (Figure 29). Oct4 et nanog sont les deux principaux gènes maitres de la pluripotence, caractérisant les cellules souches embryonnaires. Le facteur LIF (leukemia inhibitory factor) agirait avec la BMP4 présent dans le sérum et induirait l'expression de facteurs de transcription de la famille *id* (inhibiteurs de différenciation) afin de maintenir la pluripotence et l'autorenouvellement de ces cellules [Ying et al., 2003].

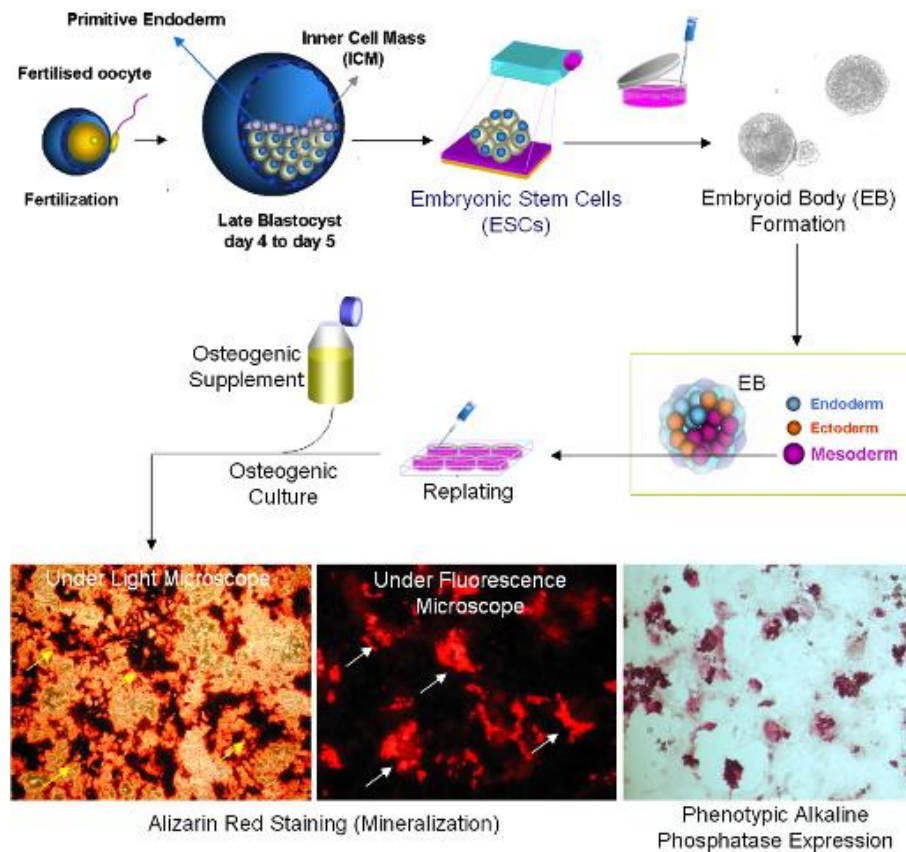


Figure 29. Culture et différenciation ostéogénique des cellules souches embryonnaires [Seong et al., 2010]

Les cellules souches embryonnaires ont montré leur intérêt en ingénierie osseuse [Zur Nieden, 2011]. Les ES murines peuvent être efficacement différenciées en cellules ostéogéniques *in vitro* après stimulation par des facteurs ostéogéniques ajoutés au milieu de culture (Figure 29) [Handsichel et al., 2008]. L'utilisation d'ES murines associées à une matrice de collagène *in vivo* conduit à la formation d'os ectopique chez le rat après une étape de préinduction ostéogénique *in vitro* [Kahle et al., 2010] [Handsichel et al., 2010]. Un résultat similaire a été obtenu avec des cellules embryonnaires d'origine humaine [Tremoleda et al., 2008]. Elles peuvent être associées à un biomatériau composite à base de PLGA et d'HA et transplantées en sous-cutané chez la souris *nude*. Kim et coll. observent alors une formation osseuse significative au bout de 4 semaines d'implantation comparée aux biomatériaux non cellularisés [Kim et al., 2008]. De plus, ces mêmes travaux montrent après analyse par hybridation *in situ*, que ce sont les cellules embryonnaires implantées qui sont à l'origine du tissu osseux néoformé. Une autre étude montre le potentiel régénératif de ces cellules après induction ostéogénique cultivées au sein d'un biomatériau à base de PLGA, importées au niveau d'un site orthotopique chez le lapin [Tian et al., 2008].

Cependant, la qualité du tissu osseux formé en termes d'homogénéité et de stabilité semble être encore insuffisante. Des améliorations devront être apportées au niveau du contrôle de la différenciation ostéogénique [Jukes et al., 2010]. De plus, dans un contexte de thérapie cellulaire, ces cellules souches présentent encore des risques non négligeables d'induction de tumeurs. Enfin, les lois éthiques en France limitent leur utilisation, bien que les données précliniques précédemment citées donnent des résultats très prometteurs [Jukes et al., 2008].

b) Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes ont une capacité à proliférer plus faible que les cellules souches embryonnaires. Elles peuvent être isolées en grande quantité à partir de nombreux tissus adultes et présentent le principal avantage de pouvoir être utilisées dans des conditions autologues. Elles sont utilisées en clinique dans plusieurs applications dont le domaine ostéo-articulaire [Vinatier et al., 2011].

Les cellules souches pluripotentes inducibles (iPS cells)

Elles devraient offrir dans les années à venir un potentiel considérable pour la médecine régénératrice [Okita and Yamanaka, 2011]. D'un point de vue fondamental et historique, dès 1997, Wilmut et coll. [Wilmut et al., 1997] et Tada et coll. [Tada et al., 2001] ont découvert que les cellules somatiques peuvent être reprogrammées et acquérir un état de cellule souche embryonnaire. Takahasi et coll. en 2006 [Takahashi and Yamanaka, 2006] ont proposé que les facteurs de maintenance de l'état « souche » des ES peuvent aussi induire la pluripotence dans les cellules somatiques. Par introduction rétrovirale de quatre facteurs dans des fibroblastes de souris (oct4, sox2, c-myc et klf-4), ces cellules nommées cellules iPS (induced pluripotent stem cells) acquièrent un stade pluripotent. Elles présentent la même morphologie et le même profil de croissance que les ES. Après implantation en site sous-cutané chez la souris immunodéficiente, ces cellules forment des tissus originaires des 3 feuillets embryonnaires. Leur orientation vers le lignage ostéoblastique a été montrée récemment [Li et al., 2010]. Cependant, si cette nouvelle source cellulaire permet de contourner les questions éthiques, permettant de générer des cellules iPS « autologues » à partir des cellules somatiques du patient, de nombreux verrous technologiques doivent être levés pour une utilisation en ingénierie tissulaire. De façon plus précise, l'efficacité de reprogrammation devra être

améliorée, une alternative à l'utilisation de rétrovirus devra être identifiée pour des applications cliniques.

Les cellules souches mésenchymateuses

Elles sont les cellules les plus utilisées en ingénierie tissulaire [Griffin et al., 2011] [Granero-Molto et al., 2008]. Aucune manipulation génétique n'est nécessaire, et ne présentent pas de réels problèmes d'éthique.

Les premières techniques d'ingénierie tissulaire utilisant des cellules mésenchymateuses ont été décrites par De Bruyn en 1955 [De Bruyn and Kabisch, 1955] et montrent que l'implantation ectopique de moelle osseuse entraîne une néoformation osseuse. La moelle osseuse totale contient une population cellulaire hétérogène : elle est composée de cellules souches hématopoïétiques et de cellules souches stromales mésenchymateuses [Friedenstein and Lalykina, 1970] [Becker et al., 1963]. Cette dernière population est connue pour être une source importante d'ostéoprogéniteurs permettant la formation osseuse *in vivo*. Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, contenant les ostéoprogéniteurs, ont été isolées par Friedenstein en 1974 grâce à leur capacité d'adhérence au plastique [Friedenstein et al., 1974a] [Friedenstein et al., 1974b]. Elles sont nommées MSCs. Ce sont des cellules stromales présentant une morphologie fibroblastique qui vont être à l'origine de colonies, chacune dérivant d'une « single colony forming cell » appelées cfu-f (colony forming unit-fibroblast). Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques, tels que STRO-1, CD73, CD90, CD105, et par l'absence de CD34 et de CD45 [Arthur et al., 2009] [Chamberlain et al., 2007] [Gronthos et al., 1994].

Elles présentent une plasticité importante qui leur permet de se différencier en cellules chondrocytaires, ostéoblastiques, adipocytaires, myoblastiques, tendineuses ou neurales [Pittenger et al., 1999] (Figure 30).

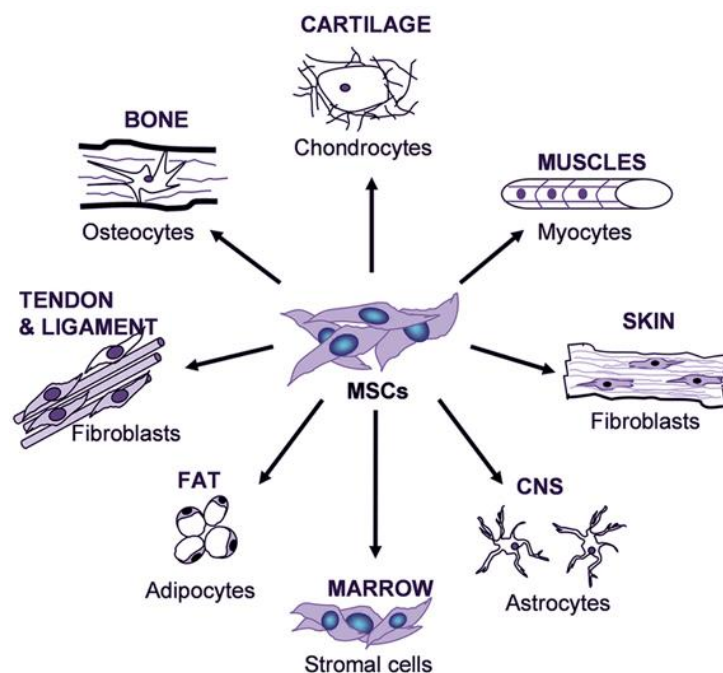


Figure 30. Caractère multipotent des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse [Grassel and Ahmed, 2007]

De part leur potentiel de différenciation ostéoblastique, les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse pourraient constituer une alternative intéressante à l'autogreffe [Shang et al., 2001]. Elles sont à ce jour utilisées dans le traitement d'ostéogénèse imparfaite chez les enfants [Horwitz et al., 1999].

Néanmoins, outre les résultats qui semblent dépendant du donneur, en particulier de son âge, la variabilité des résultats obtenus aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, démontre la nécessité de standardiser les protocoles d'expansion cellulaire et/ou de différenciation cellulaire, afin de pouvoir les utiliser de manière efficace et reproductible en clinique [Chatterjea et al., 2010].

S'agissant des sources de cellules mésenchymateuses, celles issues de la moelle osseuse requièrent un prélèvement assez invasif, le volume est limité et le taux de rendement reste assez faible (0,001% à 0,0001% du nombre total de cellules nucléées [Fraser et al., 2006]

Les autres sources de cellules mésenchymateuses sont le périoste [Ball et al., 2011], le cordon ombilical [Wang et al., 2011b], la synovie [Fan et al., 2009], le muscle squelettique [Jankowski et al., 2002], la pulpe dentaire [Estrela et al., 2011], les péricytes vasculaires [Feng et al., 2010].

Le tissu adipeux est également une source importante de cellules souches mésenchymateuses [Gimble et al.] [Bunnell et al., 2008] [Zuk et al., 2002]. En effet, ce tissu contient des cellules mésenchymateuses possédant les mêmes propriétés que celles issues de la moelle osseuse. Elles sont nommées ADSCs (Adipose-derived Stem Cells). Le tissu adipeux peut être prélevé en grande quantité sous simple anesthésie générale, lors de résections abdominales ou de liposuction, sans considération éthique car le prélèvement est assimilé à un déchet opératoire. Son prélèvement est moins invasif que la ponction de moelle osseuse. De plus, 1 g de tissu donne environ 5×10^3 de cellules mésenchymateuses c'est à dire 500 fois plus que dans la moelle osseuse [Gimble et al.].

En ce qui concerne le mode d'isolement des ADSCs, (Figure 31), après centrifugation, le culot cellulaire est appelé fraction vasculaire stromale (SVF). Cette fraction, très hétérogène contient de nombreux types cellulaires incluant les ADSCs, les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques. Des travaux récents démontrent l'intérêt de la fraction SVF totale, qui présente des qualités ostéogéniques et endothéliales attractives [Scherberich et al., 2007] [Müller et al., 2010] pour l'ingénierie osseuse et vasculaire.

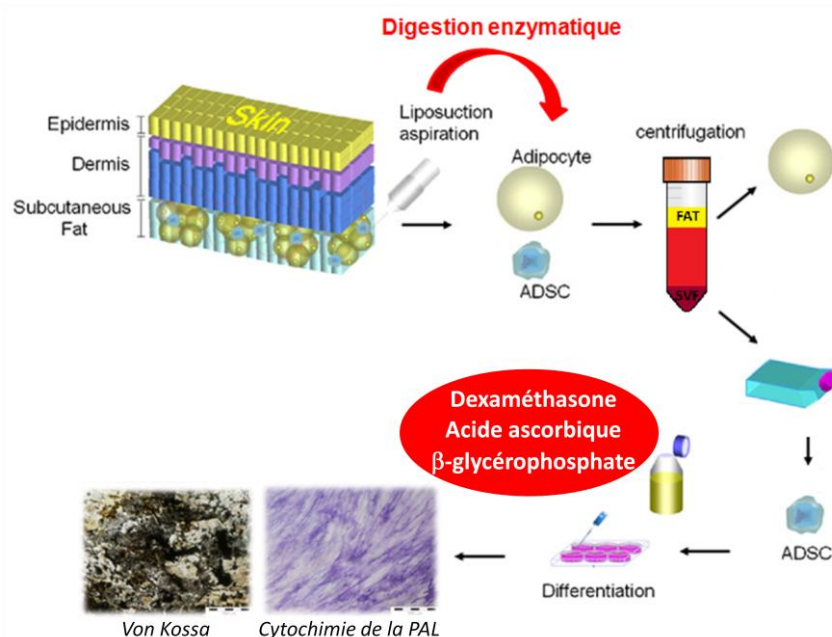


Figure 31. Procédure d'extraction des ADSCs à partir du tissu adipeux. D'après [Seong et al., 2010]

Cette fraction SVF peut être mise en culture et permet d'obtenir des cellules appelées ADSCs sélectionnées par leur capacité d'adhérence au plastique. Ces cellules peuvent alors être orientées vers différents lignages selon les conditions de culture.

La qualité et la quantité d'ADSCs vont être différentes en fonction du tissu à partir duquel elles sont purifiées selon s'il s'agit de tissu adipeux sous-cutané ou viscéral [Prunet-Marcassus et al., 2006]. La localisation précise des ADSCs au sein même du tissu adipeux est encore controversée. Une étude montre qu'elles présenteraient des caractéristiques péricyaires au même titre que les MSCs [Traktuev et al., 2008], résultats infirmés par Maumus et coll. qui ne montre aucune expression de marqueurs péricyaires tels que NG2, CD140b ou l' α -actine [Maumus et al., 2011]. Les ADSCs sont d'origine mésodermale, elles peuvent se différencier préférentiellement en adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes, muscle squelettique [Zuk et al., 2001]. Mais elles sont capables de se différencier également en cellules d'autres lignages non mésodermiques : neuronal [Fujimura et al., 2005], endothélial [Planat-Benard et al., 2004], épithélial [Brzoska et al., 2005], hépatocytaire [Banas et al., 2007], cellules pancréatiques [Timper et al., 2006].

Les ADSCs *in vivo* présentes d'importantes propriétés immunomodulatrices [Puissant et al., 2005], elles sont utilisées pour contrôler la GVHD (Graft Versus Host Disease) [Fang et al., 2007] [Yanez et al., 2006].

La thérapie cellulaire basée sur l'utilisation d'ADSCs autologues a fait ses preuves dans plusieurs applications autres que dans le domaine ostéo-articulaire et notamment dans le traitement des fistules liées à la maladie de Crohn [Garcia-Olmo et al., 2008] [Garcia-Olmo et al., 2005] [Garcia-Olmo et al., 2009a] [Garcia-Olmo et al., 2009b] ou encore pour le traitement des affections cardiovasculaires [Madonna et al., 2009] [Mazo et al., 2008] [Li et al., 2007]. La fraction totale SVF est également employée en clinique, notamment pour des comblements de lésions crâniennes et des reconstructions mammaires. En effet, cette application ne nécessite pas un passage préalable par une culture 2D et fait intervenir une chirurgie avec prélèvement et traitement du tissu puis une réinjection au cours de la même séance.

Le tissu adipeux s'avère être une source tissulaire abondante, riche en cellules mésenchymateuses. Les ADSCs remplissent tous les critères d'une cellule souche « idéale » décrits par Gimble [Gimble et al., 2007] [Gimble, 2003]. Leurs nombreuses qualités en font des cellules de choix pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

Les cellules mésenchymateuses en coculture

Les techniques d'ingénierie du tissu osseux, associant des matrices 3D avec une composante cellulaire évoluent depuis plusieurs années vers des cocultures de cellules mésenchymateuses avec d'autres types cellulaires susceptibles de participer à la formation d'un tissu osseux fonctionnel, à savoir un tissu remodelé et vascularisé.

Plusieurs travaux ont intégré le paramètre de remodelage osseux (voir paragraphe IE) dans leurs constructions 3D, en cocultivant des ostéoblastes et des ostéoclastes matures ou des progéniteurs ostéoclastiques. Les premières études *in vitro* d'un système de coculture en 3D, permettent de mieux comprendre les interactions et le dialogue entre les 2 types cellulaires. Elles montrent que les ostéoclastes stimulent la différenciation ostéoblastique des MSCs avec une diminution de l'expression des marqueurs adipocytaires [Bernhardt et al., 2010] et une augmentation de l'expression de la Bone Sialoprotéine (BSP), marqueur tardif de la différenciation ostéoblastique [Sinclair and Burg, 2011]. Un support tridimensionnel de collagène de type I a été utilisé comme

support à la coculture de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques. Domaschke et coll., en 2006 [Domaschke et al., 2006] montre ainsi que les ostéoclastes sont capables d'envahir et de dégrader cette structure collagénique tandis que les ostéoblastes prolifèrent et synthétisent de la matrice extracellulaire minéralisée.

D'autres modèles de coculture développés en ingénierie du tissu osseux, sont les cocultures de cellules mésenchymateuses avec des cellules du lignage endothélial pour générer *in vitro* et *in vivo* des structures vascularisées. Cette partie sera détaillée dans le chapitre V.

Une autre équipe est allée encore plus loin dans la génération de systèmes hybrides, en développant une stratégie de coculture associant les trois types cellulaires : des cellules endothéliales, des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques [Papadimitropoulos et al., 2011]. Dans cette étude, les cellules endothéliales et ostéoblastiques, sont issues de la fraction vasculaire stromale (SVF) du tissu adipeux, et sont préalablement cultivées au sein d'une céramique poreuse avant d'y ajouter les progéniteurs ostéoclastiques CD14+ issus du sang périphérique. Ils sontensemencés dans un deuxième temps après une première phase de culture de la SVF du tissu adipeux contenant les cellules endothéliales et les ostéoprogéniteurs permettant la formation d'une matrice extracellulaire stimulant leur adhérence, leur différenciation et leur activité ostéoclastogénique. Des facteurs tels que le MCSF (macrophage colony-stimulating factor) et le RANK-ligand peuvent également être ajoutés au milieu de culture permettant de stimuler l'adhérence, la prolifération et la différenciation ostéoclastique des monocytes CD14+ [Papadimitropoulos et al., 2011]. Le mécanisme de résorption est alors observé *in vitro* et semble dépendre du dépôt de matrice extracellulaire par les ostéoblastes. La formation de structures osseuses et vasculaires associée à une activité ostéoclastique *in vivo* après implantation ectopique démontre et valide la fonctionnalité du système hybride.

Des études expérimentales approfondies chez le gros animal, restent encore à mener afin de mettre en évidence un réel bénéfice par rapport à un système « classique » de monoculture sur la néoformation osseuse et sur la réparation.

2. Les facteurs d'induction de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Après isolement des cellules mésenchymateuses, une première étape d'expansion en deux dimensions est parfois nécessaire afin de disposer d'un nombre de cellules suffisant pour stimuler leur différenciation. Ces méthodes d'amplification, selon le milieu et le nombre de passages effectués peuvent diminuer les capacités d'autorenouvellement et de différenciation de ces cellules [Nguyen et al., 2011].

a) Les milieux d'expansion

Ils contiennent de façon générale des facteurs promouvant l'adhérence des cellules sur des supports de cultures tels que la fibronectine ou encore des facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire comme l'IGF-1 et le bFGF. Ce milieu d'expansion doit préserver le phénotype des cellules souches indifférenciées : l'expression des marqueurs de surfaces CD73, CD90, CD105, et absence d'expression de CD34 et de CD45 [Arthur et al., 2009] [Chamberlain et al., 2007] [Gronthos et al., 1994]. Cependant, plusieurs équipes s'affranchissent de cette étape d'expansion et transplantent les cellules immédiatement après leur isolement [Boos et al., 2011] [Rhee et al., 2011] [Kretlow et al., 2010]. Si plusieurs travaux montrent l'utilisation des cellules mésenchymateuses à l'état non

différencié [Parrilla et al., 2011] [Jeon et al., 2008] [Petite et al., 2000], la plupart des études sont réalisées avec des cellules préalablement ostéoinduites.

b) Les milieux de différenciation

Ils contiennent des facteurs de croissance spécifiques du lignage d'intérêt. Dans le cas du lignage ostéogénique, plusieurs facteurs biochimiques sont connus pour orienter les cellules souches mésenchymateuses vers la différenciation ostéoblastique. La méthode classique d'induction de la différenciation ostéoblastique consiste en un milieu de culture contenant une combinaison de dexaméthasone, de β -glycérophosphate et d'acide ascorbique pendant plusieurs semaines.

La dexaméthasone est un glucocorticoïde, identifié comme un élément clé de la différenciation ostéoblastique des MSCs, utilisé à des concentrations bien définies [Herbertson and Aubin, 1995] [Leboy et al., 1991]. Une culture continue des MSCs en présence de dexaméthasone à 10 nM pendant environ 3 semaines permet d'induire la différenciation ostéoblastique [Song et al., 2009b]. La dexaméthasone induit d'une part, la transcription de gènes ostéoblastiques [Beloti and Rosa, 2005] [Yamanouchi et al., 2001] dans des cellules mésenchymateuses *via* sa fixation à un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) situé dans la région promotrice de ces gènes [Ogata et al., 1995]. D'autre part, la dexaméthasone stimule l'expression de la molécule TAZ (β catenine-like) (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) ainsi que de l'intégrine $\alpha 5$ qui favorisent la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses par l'activation du facteur de transcription *cbfa1/runx 2* [Hamidouche et al., 2009] [Hong et al., 2009] [Hamidouche et al., 2008]. Cependant, l'utilisation de glucocorticoïdes à des concentrations supra-physiologiques peut exercer un effet inverse, inhiber la fonction ostéoblastique et la formation osseuse *in vivo* [Jorgensen et al., 2004].

Le β -glycérophosphate (β GP) : l'utilisation de β GP permet la formation d'une matrice extracellulaire minéralisée, car il constitue un substrat de choix pour activer en particulier la phosphatase alcaline (PAL) des cellules mésenchymateuses [Chang et al., 2000] [Chung et al., 1992]. De façon générale, le β GP est utilisé dans le milieu de différenciation ostéogénique des MSCs de 5 à 10 mM [Hildebrandt et al., 2009].

L'acide ascorbique joue également un rôle important dans la synthèse de la matrice extracellulaire et de façon précise sur l'hydroxylation des résidus proline et lysine du collagène, principal composant de la MEC [Takamizawa et al., 2004] [Royce, 2003] [Prockop and Kivirikko, 1995]. Des études montrent que l'addition d'acide ascorbique dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la synthèse matricielle, tandis que l'absence d'acide ascorbique conduit le plus souvent à la réduction de l'expression de la PAL et à l'inhibition de l'accumulation de calcium [Fernandes et al., 2010].

La vitamine D3, hormone calcitrope antimitotique, ou plus précisément son métabolite actif la 1,25 OH₂ D₃, peut également être ajouté au cocktail de facteurs pour stimuler la différenciation ostéoblastique des MSCs [Maehata et al., 2006] [Verlinden et al., 1998] [Wang et al., 1996]. L'utilisation de ce facteur seul ne permet pas la production d'une matrice minéralisée, son utilisation

est souvent associée à la dexaméthasone et à la BMP-2 afin de promouvoir l'expression des marqueurs spécifiques du lignage ostéoblastique.

L'addition de **facteurs de croissance** au milieu de différenciation stimule la différenciation ostéoblastique des MSCs *in vitro*. Parmi eux, le TGF- β 1 influence la prolifération cellulaire et joue un rôle essentiel dans le contrôle de la formation osseuse en régulant la synthèse de protéines matricielles telles que le collagène de type I [Centrella et al., 1987]. Les BMPs dont la BMP2 et BMP7 jouent également un rôle important dans le contrôle de l'ostéogenèse [Hanada et al., 1997] [Knippenberg et al., 2006]. Ces facteurs sont souvent ajoutés dans les milieux de différenciation comme facteurs ostéoinducteurs et jouent un rôle tout aussi important dans la formation osseuse ectopique *in vivo* [Kawai et al., 2006]. Les concentrations utilisées *in vitro* peuvent varier du nM au μ M selon le modèle cellulaire utilisé.

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire et afin de transférer ces technologies à la clinique, il est nécessaire de respecter les **conditions GMP** (Good Manufacturing Products) de développement de ces milieux [Bieback et al., 2008] [Schallmoser et al., 2007]. L'utilisation de **sérum animal** dans les cultures de cellules mésenchymateuses pose de nombreux problèmes. Une grande variabilité entre les différents lots peut être mise en évidence et, de plus, la composition chimique exacte est inconnue. Le sérum animal peut également contenir des immunoglobulines, des facteurs de croissance ou des facteurs de transcription pouvant modifier le comportement cellulaire [Jochems et al., 2002]. Cependant, plusieurs alternatives sont à ce jour développées grâce à l'utilisation de sérum d'origine humaine [Tekkotte et al., 2011] [Bieback et al., 2009] [Kobayashi et al., 2005] [Stute et al., 2004]. Les MSCs cultivées dans ces conditions présentent des caractéristiques similaires à des MSCs cultivées en sérum animal, une morphologie similaire mais un taux de doublement de population inférieur par rapport aux cultures en sérum animal [Shahdadfar et al., 2005]. D'autres études montrent que les cellules adhèrent et prolifèrent plus difficilement en présence de sérum humain et n'atteignent jamais plus de 60% de confluence, suggérant d'un effet inhibiteur de facteurs allogéniques dans le sérum humain, sur la prolifération et la survie cellulaire. La différenciation ostéogénique semble être favorisée dans un milieu de culture supplémenté en sérum humain, soulignant l'intérêt de cette alternative dans un contexte d'ingénierie tissulaire osseuse et d'applications cliniques [Berger et al., 2006]. Enfin, le sérum humain semble garantir une meilleure stabilité génomique dans le temps, paramètre important pour la thérapie cellulaire.

Le sérum issu du sang de cordon humain allogénique (hUCBS) est une source également attractive car il contient une quantité importante de facteurs de croissance et de protéines nécessaires à la prolifération et à la survie des MSCs [Sankaranarayanan et al., 2011] [Song et al., 2009a]. De plus, la culture de MSCs en présence de hUCBS augmente les capacités prolifératives et le potentiel de différenciation ostéogénique [Jung et al., 2009].

Les substituts sériques à base de **dérivés plaquettaires humains autologues** constituent également une bonne alternative au sérum animal [Johansson et al., 2003]. En effet, **les plaquettes** synthétisent et libèrent de nombreux facteurs de croissance tels que le TGF- β , FGF, IGF-1, EGF, VEGF, Platelet Factor-4 (PF-4), des molécules d'attachement (fibronectine, vitronectine) permettant le recrutement des cellules souches au niveau du site lésionnel ainsi que leur différenciation et activant également

l'angiogenèse [Schallmoser et al., 2009]. Les lysats plaquettaires stimulent la survie, l'adhérence, la prolifération et la différenciation des MSCs ainsi que celles des cellules endothéliales [Kilian et al., 2007] [Lange et al., 2007] [Doucet et al., 2005]. De plus, les propriétés immunomodulatives des MSCs conservées permettent l'utilisation de cette alternative de manière allogénique, réduisant les risques de GVHD [Lange and Zander, 2008]. Ainsi, des dérivés humains, le lysat plaquettaire reste l'alternative au sérum animal la plus adaptée [Schallmoser et al., 2008]. Cependant, la composition chimique de ces différents sera est tout aussi inconnue que celle des sera animaux. De plus, la variabilité de composition des lots ainsi que leur disponibilité limitée, en font des inconvénients majeurs ouvrant la voie à la recherche d'autres alternatives.

À la différence du sérum, **les milieux définis** contiennent des facteurs de croissance, des molécules d'attachement et différents composants protéiques à des concentrations précises rendant reproductible l'élaboration d'un milieu de culture. La sélection des additifs et notamment des facteurs de croissance est très importante car ils peuvent considérablement affecter la fonction cellulaire. A titre d'exemple, une augmentation de bFGF dans le milieu peut orienter les MSCs vers une différenciation ostéoblastique [Sotiropoulou et al., 2006]. Le TGF- β influence la prolifération et la survie cellulaire s'il est utilisé de façon synergique avec le bFGF, PDGF [Chase et al., 2010] [Ng et al., 2008].

En présence de ces milieux définis, un revêtement spécifique est souvent nécessaire pour la culture des MSCs. Le plus souvent il s'agit de la fibronectine ou du collagène de type I et III, imitant la matrice extracellulaire et permettant l'adhérence des cellules ainsi que leur expansion et leur différenciation [Tekkatte et al., 2011].

Parmi les autres facteurs, l'albumine sérique est un facteur couramment utilisé dans les milieux sans sérum permettant le transport des lipoprotéines dans la cellule. Les hormones sont également essentielles à la croissance cellulaire, telle que l'hydrocortisone. Certains minéraux et autres molécules agissant comme cofacteurs dans de nombreuses voies de signalisation sont également retrouvés dans la composition de ces milieux définis. Ces éléments sont présents à l'état de traces mais peuvent réguler la prolifération et la différenciation cellulaire [Hill and Treisman, 1995].

De nombreux milieux définis sans sérum, utilisés pour la culture des MSCs, sont commercialisés (STEMPRO MSC SFM, Invitrogen ; MesenCult-ACF Culture Kit ; STEMCELL) [Brunner et al., 2010]. Ces milieux commerciaux permettent de maintenir le potentiel de différenciation des MSCs tout en augmentant leurs capacités prolifératives [Agata et al., 2009] dues à certains facteurs de croissance tels que le bFGF ou encore le LIF [Marshak and Holecek, 1999].

En conclusion, l'avantage des ces milieux définis reste leur composition chimique précise. Ils sont produits, soit pour l'expansion cellulaire, soit pour la différenciation. Elaborés selon les conditions GMP, ils sont parfaitement adaptés à une utilisation en clinique.

Les conditions environnementales peuvent également modifier le devenir des cellules mésenchymateuses.

Parmi ces conditions, **la tension en oxygène** peut influencer la fonction des MSCs. L'hypoxie est le principal activateur du facteur HIF1 qui va agir comme facteur de transcription au niveau de séquences promotrices des gènes cibles de la survie et de la prolifération cellulaire [Tredan et al., 2008] (Figure 32). En effet, plusieurs études ont montré que de basses tensions en oxygène (5%)

pouvaient ralentir la prolifération des MSCs et permettraient de maintenir un état non différencié en culture *in vitro* [Basciano et al., 2011] [Tamama et al., 2011] [Holzwarth et al., 2010].

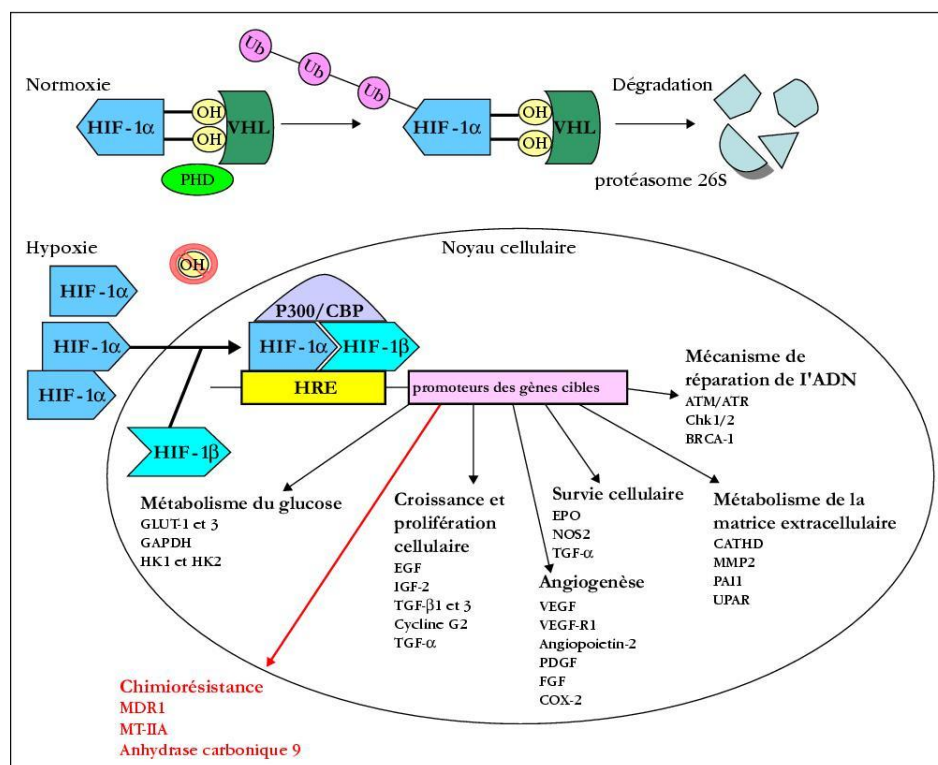


Figure 32. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 et gènes activés transcriptionnellement par HIF-1 [Tredan et al., 2008]

L'hypoxie joue un rôle important dans la différenciation ostéogénique. Il semblerait que des conditions de culture en hypoxie stimuleraient la différenciation chondrogénique des cellules mésenchymateuses issues du tissu adipeux au profit d'une différenciation ostéogénique [Merceron et al., 2010]. L'implantation de MSCs transfectées par un plasmide codant pour le gène HIF montre une augmentation de l'expression de protéines angiogéniques et ostéogéniques *in vitro* et une amélioration significative de la réparation de lésions osseuses de taille critique traduite par une augmentation du volume osseux, de la densité minérale osseuse et du nombre de vaisseaux [Zou et al., 2011]. Ces données confirment l'importance de l'hypoxie et du facteur HIF dans le couplage angiogénèse/ostéogénèse.

La culture en trois dimensions (3D) constitue également un facteur essentiel à la différenciation cellulaire [He et al., 2010] [Tian et al., 2008]. A titre d'exemple, la différenciation ostéoblastique des cellules souches embryonnaires [Tian et al., 2008] et de MSCs [Frohlich et al., 2010] [Naito et al., 2011] cultivées en 3 dimensions est stimulée par rapport à celles cultivées en deux dimensions. D'autre part, la composition même du matériau permet d'orienter la différenciation cellulaire. Marino et coll. montrent ainsi que des ADSCs sont capables d'exprimer les marqueurs de différenciation ostéoblastique lorsqu'elles sont cultivées sur une céramique phosphocalcique sans ajout de facteurs ostéoinducteurs [Marino et al., 2010]. Un autre exemple concerne la culture de MSCs dans une matrice de polymère qui favorise la phase de minéralisation par rapport aux cultures bidimensionnelles [Thimm et al., 2011]. La rigidité du matériau est un paramètre tout aussi

important, permettant également d'orienter la différenciation cellulaire [Tse and Engler, 2011] [Discher et al., 2005]. L'augmentation de la rigidité d'un matériau peut favoriser la différenciation ostéoblastique des MSCs [Kim et al., 2011] sous la dépendance de l'activation de la voie des MAP kinases [Khatriwala et al., 2009] [Khatriwala et al., 2007].

La culture en conditions dynamiques constitue un autre facteur environnemental essentiel à l'expansion des cellules, au maintien de leur survie et de leur fonction cellulaire. Les données cellulaires de mécanotransduction ont largement contribué au développement de bioréacteurs permettant la culture dynamique des matériaux cellularisés favorisant ainsi une meilleure distribution cellulaire, l'établissement d'interactions intercellulaires et une activation de la différenciation [Frohlich et al., 2010] [Sikavitsas et al., 2005] [Bancroft et al., 2002]. Cette partie sera présentée dans le paragraphe IVD.

C. Les facteurs bioactifs en ingénierie du tissu osseux

Des stratégies de fonctionnalisation des structures tridimensionnelles ont largement été décrites dans la littérature afin d'améliorer le processus de régénération, en stimulant l'activité biologique des cellules qu'elles hébergent ou bien celle des cellules de l'hôte.

Parmi ces molécules bioactives, des facteurs ostéogéniques impliqués dans le processus de réparation peuvent contrôler la différenciation ostéoblastique et de façon plus générale l'activité des cellules recrutées au sein de la matrice. Les facteurs ostéogéniques comprennent les BMPs, le TGF- β ainsi que des facteurs de croissance fibroblastiques, comme le bFGF ou encore le PDGF.

Ces facteurs ostéogéniques peuvent être délivrés localement au niveau du site lésé grâce à des systèmes de délivrance, basés sur l'utilisation de biomatériaux dégradables, le plus souvent des polymères (voir paragraphe IVA2). Ces facteurs protéiques ou encore des peptidomimétiques de ces facteurs, peuvent être également greffés de façon covalente à la matrice 3D pour activer les cellules qui seront recrutées dans ce support. En ce qui concerne la cinétique de délivrance de facteurs ostéoinductifs, celle-ci [Luginbuehl et al., 2004] doit être en adéquation avec la cinétique de reconstruction osseuse, les concentrations délivrées doivent être physiologiques et adaptées de façon spatiale et temporelle. Les biomolécules peuvent être incorporées aux matériaux ou adsorbées à leur surface permettant une libération locale et limitée dans le temps. Cette stratégie permet de mimer la sécrétion de facteurs solubles dans le micro-environnement lésionnel.

Les exemples les plus documentés dans la littérature concernent la délivrance de BMP2 qui est un puissant facteur de différenciation ostéogénique. Il s'agit de la molécule la plus utilisée en ingénierie tissulaire osseuse dans les systèmes de délivrance. Yang et coll. en 2004 ont montré que la BMP2 peut être incorporée au sein d'un polymère synthétique biodégradable permettant une libération de la molécule, promouvant la différenciation des ostéoprogéniteurs et la formation osseuse *in vitro* et *in vivo* [Chu et al., 2007] [Yang et al., 2004]. Une bibliographie très abondante a largement confirmé que la BMP2 et la BMP7 associées à un matériau ostéoconducteur stimulaient de manière significative la cicatrisation osseuse [Laflamme and Rouabhia, 2008] [Chu et al., 2007]. La combinaison de BMP2 et de TGF- β 3 permet également d'améliorer la formation osseuse [Simmons et al., 2004].

Ces mêmes biomolécules peuvent également être associées aux biomatériaux par couplage chimique grâce à l'utilisation de différents groupes fonctionnels.

Un autre facteur bioactif, largement utilisé en ingénierie tissulaire pour activer la régénération osseuse dans les matrices, est le VEGF. De nombreux travaux de la littérature décrivent une telle fonctionnalisation afin de stimuler la fonction des cellules endothéliales et ostéogéniques [Wernike et al., 2010] et ainsi le couplage entre l'angiogenèse et l'ostéogénèse. De la même façon que celle décrite pour la BMP2, le VEGF, et principalement l'isoforme VEGF₁₆₅ peut être adsorbé ou délivré par des polymères. D'autres travaux décrivent l'utilisation des peptidomimétiques du VEGF. Ces peptidomimétiques peuvent être greffés de façon covalente au biomatériau. Cette technique de pré vascularisation de matériaux de substitution osseuse sera développée dans le chapitre V.

Les matériaux peuvent également être modifiés par des séquences peptidiques spécifiques impliquées dans l'adhérence cellulaire afin de stimuler la colonisation cellulaire. L'adhésion des cellules à un biomatériau peut être essentielle à la création d'un tissu en 3D et peut jouer un rôle crucial dans la progression de la formation tissulaire. Des séquences peptidiques impliquées dans l'adhésion cellulaire peuvent donc être adsorbées ou greffées de manière covalente à un biomatériau telles que les séquences contenant des motifs peptidiques RGD (Arg-Gly-Asp) [Zhang et al., 2011] [Porte-Durrieu et al., 2004]. Si le couplage RGD/polymère peut permettre d'améliorer *in vitro*, l'adhérence et la prolifération des MSCs ainsi que la cinétique de formation d'une matrice extracellulaire minéralisée par rapport à une matrice non modifiée, l'intérêt de ces modifications *in vivo* dans un modèle expérimental n'est toujours pas démontré.

Enfin, un dernier mode de fonctionnalisation concerne l'introduction de gènes d'intérêt pour la régénération de tissu osseux [Betz et al., 2008]. Ce gène peut être introduit directement dans les cellules mésenchymateuses, par des méthodes de thérapie génique. Les cellules modifiées génétiquement seront ensuiteensemencées dans la matrice tridimensionnelle et transférées *in vivo* au niveau de la lésion osseuse où elles pourront sécréter la protéine d'intérêt de façon continue ou non. Mais les matériaux peuvent être également développés comme des vecteurs de ces acides nucléiques, considérés alors comme de véritables outils de transfection cellulaire [Dupont et al., 2011] [De Laporte and Shea, 2007] [Jang et al., 2004]. Les gènes d'intérêts concernés sont ceux codant pour les BMP 2, 4 et/ou BMP7 [Guo-ping et al., 2010]. A ce jour, cette approche reste encore difficilement applicable en clinique.

D. Les contraintes mécaniques

Le tissu osseux est un tissu soumis continuellement à différents types de contraintes mécaniques (voir paragraphe IID3). A l'échelle tissulaire, ces contraintes jouent un rôle important dans le maintien de la densité osseuse et dans le remodelage osseux. A l'échelle cellulaire, elles jouent un rôle essentiel sur la mécanotransduction et l'orientation de la différenciation des cellules mésenchymateuses. Hébergées dans des structures tridimensionnelles, ces cellules devront coloniser la totalité de l'implant, au sein duquel un apport en nutriments, en oxygène et une évacuation des déchets métaboliques seront des facteurs essentiels à la survie et à la fonctionnalité de ces cellules. Pour ce faire, la culture dynamique de ces structures tridimensionnelles cellularisées dans des bioréacteurs va permettre une meilleure distribution cellulaire et assurer un développement tissulaire plus homogène [Olivier et al., 2007] [Xie et al., 2006] [Wendt et al., 2006] [Wendt et al., 2003] alors que les cultures en conditions statiques conduisent, dans de nombreux cas, à la formation d'un centre nécrotique, lié à la présence d'un foyer hypoxique [Potier et al., 2007a] [Potier et al., 2007b].

Les cellules hébergées dans ces matrices 3D vont répondre différemment en culture statique et en culture dynamique [Altman et al., 2002]. Dans ses travaux, Braccini et coll. [Braccini et al., 2005]

utilise un bioréacteur pour ensemercer, multiplier et différencier les cellules, en s'affranchissant de l'étape d'expansion en deux dimensions. Cette simple culture en dynamique est capable d'activer les cellules mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique et d'augmenter la formation osseuse après transfert *in vivo* de cette construction chez le petit animal. En effet il est connu que l'application de contraintes mécaniques va être perçue par des mécanorécepteurs au niveau notamment des membranes cellulaires [Robling et al., 2006a] [Robling et al., 2006b] et vont transformer le signal mécanique en un signal chimique: c'est la mécanotransduction. Selon le modèle et le régime utilisé (amplitude, fréquence, durée, continu, intermittent) la réponse cellulaire sera différente (activation des voies de signalisation pour la différenciation, prolifération...).

Les bioréacteurs à perfusion ont montré leur efficacité pour augmenter la croissance, la différenciation cellulaire et le dépôt de matrice minéralisée par les cellules osseuses sans ajout de milieu contenant des facteurs ostéoinductifs [Sikavitsas et al., 2005] [Bancroft et al., 2002]. A ce jour, de nombreux types de bioréacteurs ont été développés et commercialisés. Ils répondent à un cahier des charges très complexe : être pratiques d'utilisation, stérilisables, régulés (température et CO₂), ils doivent contenir des volumes faibles de milieux de culture, doivent être adaptés à la forme et à la taille des matériaux qu'il y aura lieu d'implanter [Janssen et al., 2006] et adaptés aux conditions GMP de culture. Le plus simple de ces bioréacteurs est le « spinner-flask » ou « flasque à remous » (Figure 33A). Ces bioréacteurs permettent ainsi un transfert de nutriments efficace pour le développement des tissus. Les structures en 3D peuvent être également cultivées dans un « rotating-wall vessel » bioréacteur rotatif où les contraintes dynamiques sont principalement des contraintes de cisaillement (Figure 39B) ou dans un bioréacteur à perfusion (C). Des cellules mésenchymateuses cultivées dans ce type de bioréacteur et sous l'influence de milieux spécifiques sont capables de se différencier en tissu osseux [Yeatts and Fisher, 2011].

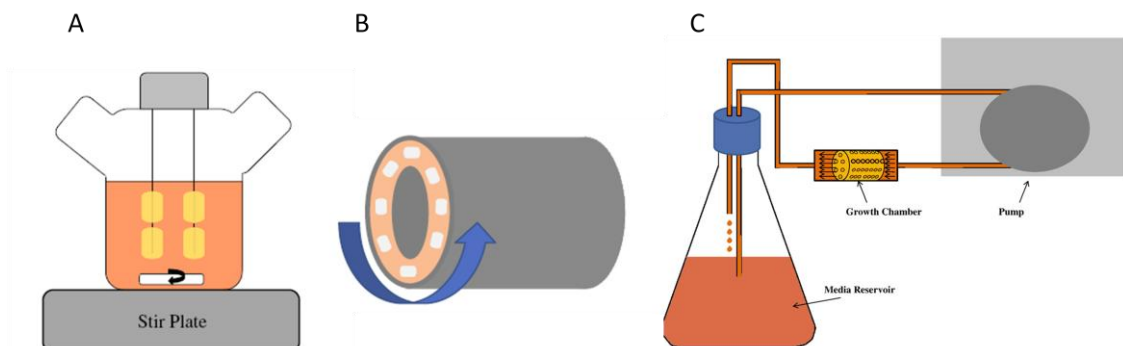


Figure 33. Les différents types de bioréacteurs. A) Spinner flask (ou flasque à remous) (B) vaisseau rotatif (C) bioréacteur à perfusion [Yeatts and Fisher, 2011]

V. Les stratégies de vascularisation des implants osseux

En dépit de l'effet positif des facteurs dynamiques sur l'amélioration de la colonisation tissulaire des produits d'ingénierie tissulaire de grand volume, la vascularisation des implants reste encore un facteur limitant de cette régénération osseuse [Bramfeldt et al., 2010]. Plusieurs stratégies de vascularisation des produits d'ingénierie osseuse sont actuellement proposées et résumées dans la Figure 34. Celles-ci incluent des techniques *in vivo* et *in vitro* de vascularisation des matériaux.

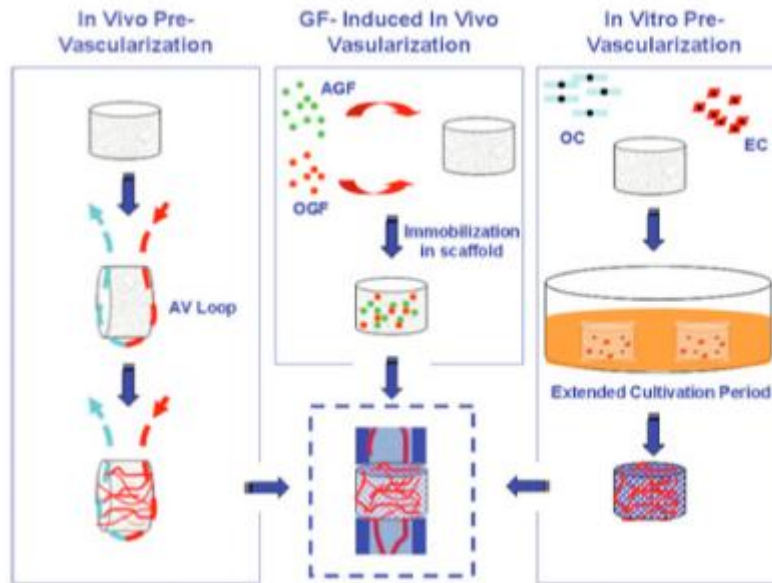


Figure 34. Stratégies de pré-vascularisation de l'implant osseux (A) *in vivo* grâce à une boucle artério-veineuse (B) *in vitro* par immobilisation de facteurs angiogéniques sur le biomatériau ou (C) *in vitro* par la mise en place de coculture de cellules ostéogéniques et endothéliales au sein d'une structure tridimensionnelle [Frohlich et al., 2008]

A. La pré-vascularisation *in vivo* de matrices 3D

Cette approche a pour objectif d'assurer une connexion vasculaire entre l'hôte et l'implant. La vascularisation peut être induite grâce à un vaisseau disposé au centre de l'implant (Figure 35) [Sever et al., 2010]. Par exemple, l'utilisation de l'artère carotidienne ou de la veine jugulaire au sein de biomatériaux ostéoconducteurs à base d'hydroxyapatite associés à des MSCs, entraîne une néoformation osseuse et une néovascularisation du greffon qui peut alors être transplanté au niveau du site orthotopique d'intérêt [Kawamura et al., 2006]. Selon une approche similaire, l'association d'un pédicule vasculaire et de cellules ostéoprogénitrices à un biomatériau à base de corail permet d'augmenter la vascularisation d'environ 60% ainsi que l'ostéogenèse, après implantation en site ectopique chez le rat en site intramusculaire [Pélissier et al., 2003b].



Figure 35. Implantation sous-cutanée chez le rat d'un bloc d'hydroxyapatite avec insertion de l'artère et de la veine épigastrique inférieure dans le tunnel du biomatériau afin d'assurer sa vascularisation *in vivo* [Sever et al., 2010]

B. Fonctionnalisation de matériaux par des facteurs angiogéniques

La vascularisation d'un implant peut être assurée par la libération locale de facteurs de croissance angiogéniques par différents types de biomatériaux (voir paragraphe IVA2). Ces facteurs de croissance tels que le VEGF, le PDGF et le FGF jouent un rôle crucial dans les processus d'angiogenèse et de surcroît dans le processus de réparation osseuse [Jain, 2003]. L'association de ces facteurs aux biomatériaux peut se faire de différentes façons (voir paragraphe V). De nombreux travaux de la littérature démontrent l'efficacité de cette stratégie. Des biomatériaux fonctionnalisés tels que des biocéramiques ou des hydrogels capables de libérer des facteurs angiogènes ont été implantés et permettent de stimuler la réparation osseuse [Wernike et al., 2010]. Des biomatériaux à base de polymères PLGA délivrant du VEGF implantés au sein de lésions crâniennes chez le rat montrent une augmentation importante de la vascularisation ainsi qu'une augmentation de la production de tissu minéralisé, comparé aux biomatériaux implantés seuls [Geiger et al., 2005] [Murphy et al., 2004].

Le VEGF peut également être produit par des MSCs transfectées, permettant alors d'augmenter la vascularisation et la résorption d'un substitut osseux corallien [Geiger et al., 2007]. Dans ce même domaine, le potentiel du bFGF a également été démontré après transfection des MSCs par un plasmide codant pour le gène du bFGF. Ces cellules modifiées génétiquement, placées au sein d'une céramique phosphocalcique, induisent une cinétique de régénération osseuse accélérée et une vascularisation plus importante par rapport aux MSCs contrôles implantées dans ces mêmes matrices [Qu et al., 2011].

Ces facteurs angiogènes peuvent être associés seuls à la matrice, ou avec d'autres facteurs ostéogènes [Leach et al., 2006] [Huang et al., 2005]. De façon plus précise, Richardson et coll. [Richardson et al., 2001] ont développé un système de délivrance basé sur une matrice de polymère (PLA/PLGA) libérant du PDGF et du VEGF 165, initiant la formation et la maturation de vaisseaux sanguins, et ce, avec des cinétiques de délivrance différentes et contrôlées. Un double système de délivrance (VEGF et BMP-2) a été également développé par Kanczler et coll. [Kanczler et al., 2010] et par Xiao et coll. [Xiao et al., 2011] et leur implantation au niveau d'une lésion de taille critique chez le rat a montré une amélioration significative de la reconstruction tissulaire (Figure 36).



Figure 36. Microtomographies aux rayons X. 28 jours après implantation au sein d'une lésion fémorale chez la souris d'un PIT composé d'alginate seul (A, B) associé à du VEGF et de la BMP-2 (C, D) associé à du VEGF et de la BMP-2 et à des MSCs de moelle osseuse (E, F). L'association de biomatériaux à des facteurs bioactifs (angiogéniques et ostéogéniques) et à une composante cellulaire assure une importante régénération osseuse comparée à l'utilisation d'un seul de ces éléments [Kanczler et al., 2010]

L'ajout de cellules à ces structures 3D fonctionnalisées, permet d'augmenter encore ces effets: la combinaison de facteurs ostéogéniques (BMP-4) et de VEGF associés à des MSCs permet d'augmenter la formation osseuse en site ectopique [Huang et al., 2005]. Les travaux de Peters et coll. confirment ces données et montrent également qu'une matrice de PLGA délivrant du VEGF associé à des cellules endothéliales microvasculaires, stimule la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel au bout d'une semaine d'implantation chez la souris [Peters et al., 2002].

C. Pré-vascularisation *in vitro*

Afin d'obtenir un implant osseux vascularisé, une autre approche consiste à réaliser des cocultures de cellules ostéogéniques et de cellules du lignage endothélial [Koob et al., 2011] [Kanczler and Oreffo, 2008] [Unger et al., 2007] [Kaigler et al., 2006].

Cette stratégie de reconstruction tissulaire, développée depuis une dizaine d'années pour le tissu osseux, repose sur des données fondamentales obtenues sur la communication ostéo-endothéliale. Ces travaux ont permis de mieux comprendre le rôle de la vascularisation dans la réparation osseuse et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans cette coopération.

Dans ces modèles de coculture, **les cellules endothéliales matures** peuvent être d'origine humaine, comme les HUVECs, issues de la veine du cordon ombilical [Guillotin et al., 2004] [Villars et al., 2002], des cellules endothéliales issues de micro-vaisseaux présents dans la peau (HDMECs) [Kaigler et al., 2005] ou encore des cellules issues de la veine saphène (HSaVECs). Peu de travaux rapportent des cocultures avec des progéniteurs endothéliaux. Il est connu que la présence de **progéniteurs endothéliaux** circulant dans les tissus adultes participent à la néovascularisation chez l'adulte [Kawamoto et al., 2001] [Asahara et al., 1997]. Ces progéniteurs endothéliaux peuvent être isolés de la moelle osseuse, du sang périphérique [Dong and Ha, 2010], du sang de cordon ombilical [Paprocka et al., 2011] ou encore du tissu adipeux [Miranville et al., 2004]. En effet, la fraction SVF totale contient plusieurs populations cellulaires avec parmi elles des cellules endothéliales matures CD34+/CD31+ [Güven et al., 2011] et une population CD34+/CD31- qui correspondrait aux progéniteurs endothéliaux [Miranville et al., 2004]. Les travaux de Scherberich et coll. en 2007 [Scherberich et al., 2007] ont montré que la culture de la SVF totale issue du tissu adipeux au sein d'une matrice poreuse d'HA, conduit à la formation d'un tissu osseux d'une part et d'autre part à la formation de structures vasculaires. Ces structures sont constituées de cellules CD34+/CD31- différenciées ou de CD34+/CD31+ matures sont fonctionnelles et s'anastomosent avec le réseau vasculaire de l'hôte.

Du côté du lignage ostéoblastique, les cellules utilisées sont soit des ostéoblastes différenciés [Dohle et al., 2010] [Fuchs et al., 2010] soit des cellules mésenchymateuses indifférenciées [Wang et al., 2011a]. Les cellules endothéliales se servent de la matrice extracellulaire produite par ces cellules ostéogéniques ou mésenchymateuses comme support permettant leur adhérence et leur fonction cellulaire.

Dans ces différents modèles de cocultures si le dialogue intercellulaire utilise de façon générale, les mêmes acteurs moléculaires, la réponse des cellules en termes de signalisation intracellulaire et de fonction cellulaire sera différente.

Par ailleurs, lorsque les cellules sont associées en coculture, plusieurs paramètres restent à définir, notamment le rapport entre les deux types cellulaires et le milieu de culture à utiliser. Ces paramètres vont différer en fonction des types cellulaires utilisés. Grellier et coll. utilisent un ratio MSC/HUVEC de 1 :2 dans des billes d'alginate [Grellier et al., 2009]. En ce qui concerne le milieu, les travaux de Bidarra et coll. [Bidarra et al., 2010] ont montré que celui-ci pouvait influencer fortement le dialogue intercellulaire et la réponse des cellules en coculture. Lorsque les cellules utilisées sont des progéniteurs endothéliaux et non des cellules différenciées, la stabilisation de leur phénotype étant plus difficile à obtenir, le milieu utilisé pour la coculture est un milieu riche en facteurs de croissance (VEGF, hFGF-B, IGF-1).

Des constructions pré-vascularisées pourront ainsi être générées *in vitro* en cocultivant ces cellules du lignage endothélial avec des cellules ostéogéniques au sein de différents types de biomatériaux (Figure 37). Elles pourront présenter la formation d'un réseau vasculaire tridimensionnel dont l'anastomose avec le tissu hôte pourra être optimisée selon la matrice, selon le mode de cocultures (dynamique, hypoxique) ou encore selon les types cellulaires utilisés pour réaliser ces cocultures [Rouwkema et al., 2006].

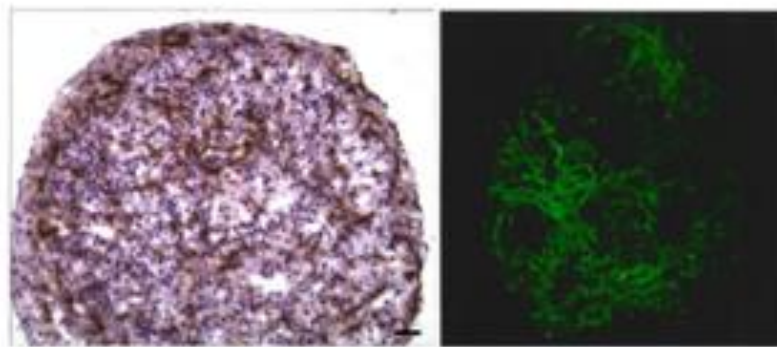


Figure 37. Coculture en contact direct de cellules endothéliales et ostéoblastiques. Sphéroïde créé par des cellules mésenchymateuses en coculture avec des cellules endothéliales. Des cellules mésenchymateuses et des cellules endothéliales sont mises en coculture dans un tube à fond conique et des sphéroïdes se forment spontanément. Le marquage anti-CD31 (marron à gauche ou en vert à droite) et le marquage des noyaux (bleu) montrent la formation d'une pré-vascularisation par les cellules endothéliales dans ces sphéroïdes, après 10 jours de culture. Barre d'échelle = 100µm [Rouwkema et al., 2006]

Seules les études expérimentales dans un modèle animal pertinent, permettra de valider, l'intérêt de ces structures pré-vascularisées *in vitro* et d'optimiser leur intégration osseuse et vasculaire avec le tissu hôte.

VI. Validation préclinique des biomatériaux et des produits d'ingénierie tissulaire : études expérimentales du petit au gros animal

La validation expérimentale de ces produits d'ingénierie tissulaire reste essentielle pour évaluer l'efficacité de ces nouveaux produits. Le choix du modèle animal est critique pour le succès de l'expérimentation mais aussi pour l'extrapolation des résultats. Ce modèle sera sélectionné en fonction de l'application clinique envisagée et des critères à évaluer [Schmidt-Nielsen, 1961].

A. Les modèles animaux et les lésions osseuses

De nombreux paramètres doivent être considérés dans le choix de l'animal comme la capacité d'extrapoler les résultats à l'Homme, les similarités génétiques avec l'Homme, les données connues sur son métabolisme, la morphologie du squelette de l'animal, le coût, la disponibilité, l'adaptabilité aux conditions de laboratoire, et enfin les considérations éthiques.

Le modèle murin (rat et souris) est le plus utilisé grâce aux techniques d'imagerie du petit animal associées, et permettant en particulier d'utiliser des modèles de génétique expérimentale. L'évaluation de produits d'ingénierie tissulaire associant des cellules humaines nécessite l'utilisation d'animaux immunodéficients (*nude*), limitant l'expérimentation aux petits animaux tels que la souris et le rat [Srouji et al., 2011].

Cependant, les études d'ingénierie tissulaire doivent être validées chez de gros animaux en utilisant des cellules autologues ou allogéniques [Field et al., 2011] [Zhao et al., 2009] [Petite et al., 2000]. Ces gros animaux (chiens, brebis, chèvre, cochon, primates non humains) [Buma et al., 2004] présentent pour certains un métabolisme, des propriétés mécaniques et une microarchitecture osseuse plus proches de l'Homme et ces modèles permettent de réaliser des lésions osseuses de taille plus importante, incapable de se réparer naturellement (lésion de taille critique). L'utilisation de ces modèles présente toutefois des difficultés concernant le coût, la disponibilité et parfois des problèmes éthiques.

B. Les sites d'implantation et leur fonction

Il existe 2 types de site d'implantation des matériaux de substitution osseuse ou des produits d'ingénierie tissulaire osseuse :

- **Implantation ectopique** au niveau d'un site non osseux où aucune formation osseuse ne se produit en conditions physiologiques. Elle permet d'évaluer l'ostéoinductivité du biomatériau, c'est-à-dire sa capacité à recruter des cellules mésenchymateuses, à les orienter vers une différenciation ostéoblastique et à induire la formation d'os. Les sites d'implantation ectopique peut être sous-cutané [Boos et al., 2011] ou intramusculaire [Le Nihouannen et al., 2005].
- **Implantation orthotopique** au niveau d'un site osseux [Kim et al., 2008]. Elle permet en particulier d'évaluer un processus d'ostéoconduction à savoir si le biomatériau est capable de permettre la réparation osseuse à son contact et de développer ainsi des modèles de lésion de taille critique.

La « **lésion osseuse de taille critique** » [Hollinger and Kleinschmidt, 1990] caractérise une lésion qui, non traitée, présente moins de 10 % de réparation au cours de la vie de l'animal.

La calvaria (Figure 38) constitue un modèle en ingénierie osseuse pour évaluer les effets de PIT sur la réparation osseuse [Rhee et al., 2011] [Keriquel et al., 2010]. A titre indicatif, la taille critique au niveau du crâne est de 4 mm chez la souris [Aalami et al., 2004], 8 mm chez le rat [Schmitz et al., 1990] et 15 mm chez le lapin [Frame, 1980].



Figure 38. Lésion osseuse de taille critique au niveau de la calvaria [Keriquel et al., 2010]

Ce site est facilement accessible pour la chirurgie et ne nécessite aucun système de fixation. Cependant, l'épaisseur du crâne et le diamètre de la lésion osseuse limitent la taille et la forme des biomatériaux utilisés. De plus, la calvaria fait partie des os plats à formation osseuse membranaire et n'est pas soumis à un environnement mécanique, ce qui limite les étapes de remodelage osseux. Ce modèle permet en particulier l'étude préclinique de matériaux dédiés à la chirurgie maxillofaciale, alors que les études précliniques pour la chirurgie orthopédique vont nécessiter l'utilisation de modèles de lésions osseuses au niveau des os longs dans des situations de charge mécanique [Horner et al., 2010].

Ces lésions osseuses dans les os longs (Figure 39) peuvent-être réalisées au niveau des diaphyses (os cortical) tibiales ou fémorales [Srouji et al., 2011] de manière segmentaire [Field et al., 2011] [Chu et al., 2007] [Petite et al., 2000], partielle [Colnot et al., 2005] ou au niveau des condyles (os trabéculaire) [Shao et al., 2006a] [Shao et al., 2006b]. De manière générale, la procédure opératoire est plus invasive que pour les lésions crâniennes. Les lésions segmentaires nécessitent la plupart du temps une fixation externe ou interne [Zhao et al., 2009].

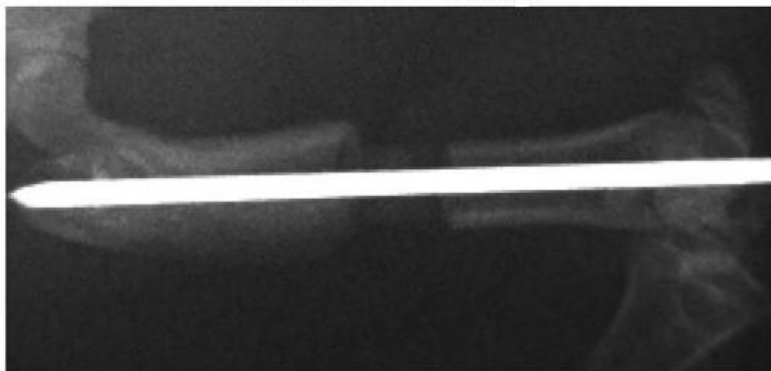


Figure 39. Modèle de lésion fémorale segmentaire stabilisé chez le rat. Groupe contrôle (matériau à base de polypropylène fumarate, sans BMP) 1 semaine après la chirurgie : la lésion osseuse est stabilisée à l'aide d'un dispositif interne fixé au niveau de la cavité médullaire et reliant les deux fragments osseux [Chu et al., 2007]

Des lésions de taille importante sont également réalisées chez le gros animal au niveau mandibulaire (Figure 40). Il s'agit d'un modèle de chirurgie réparatrice maxillo-faciale qui ne nécessite pas de système de fixation [Parrilla et al., 2011] [Zhao et al., 2009] [Schliephake et al., 2008].

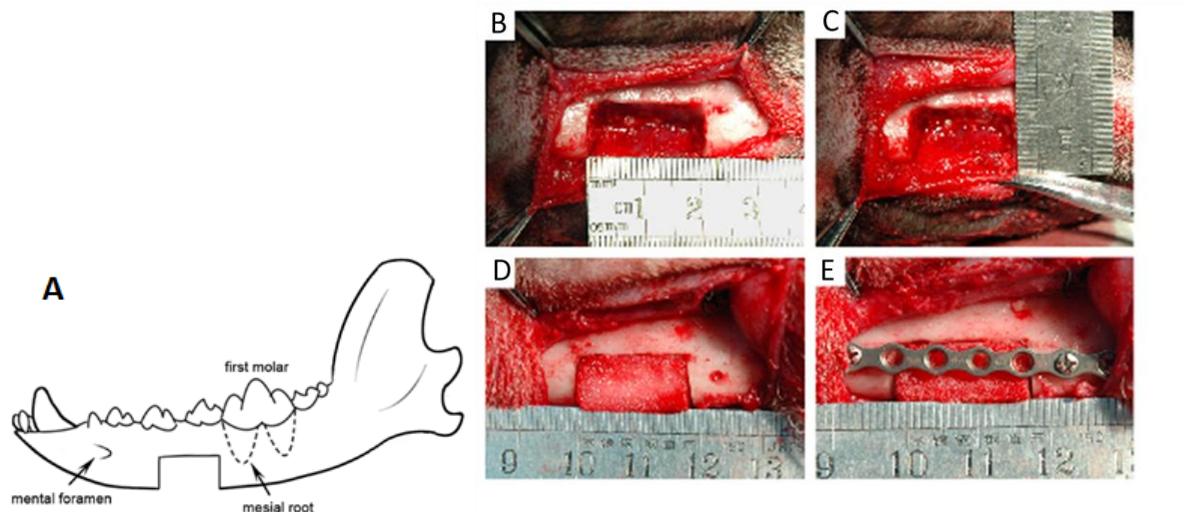


Figure 40. Lésion osseuse mandibulaire chez le chien. (A) Illustration schématique de la région d'intérêt : la lésion osseuse mandibulaire est localisée sous la prémolaire et entre le foramen mental et la racine de la première molaire. (B, C) Lésion mandibulaire de taille critique 2cm x 1cm. (D) La lésion est comblée par un PIT à base de soie contenant des MSCs canines autologues (E) et fixée par une tige de titane [Zhao et al., 2009]

C. Les méthodes d'investigation du tissu néoformé

Après implantation du produit d'ingénierie tissulaire, plusieurs méthodes d'investigation peuvent être utilisées pour suivre le devenir du matériau, la réaction inflammatoire, la nature du tissu néoformé et le devenir et /ou la fonction des cellules associées au produit d'ingénierie tissulaire dans la régénération tissulaire.

Après quelques semaines ou quelques mois d'implantation selon le modèle et l'information recherchée, les animaux peuvent être sacrifiés, les constructions prélevées, fixées le plus souvent en paraformaldéhyde permettant la conservation des échantillons puis inclus en résine de méthylméthacrylate ou en paraffine après décalcification pour une analyse histologique.

L'histologie est l'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer de façon qualitative et quantitative (par histomorphométrie) la néoformation osseuse et vasculaire. L'histologie permet de décrire la morphologie cellulaire et tissulaire en termes d'architecture et d'éléments cellulaires grâce à l'utilisation de colorations spécifiques. La coloration au trichrome de Masson permet de révéler la présence de tissus collagéniques en vert (Figure 41A). Un marquage au Von Kossa sur des coupes en résine non décalcifiées permettra de mettre en évidence la minéralisation de la MEC par une coloration marron foncée (Figure 41B).

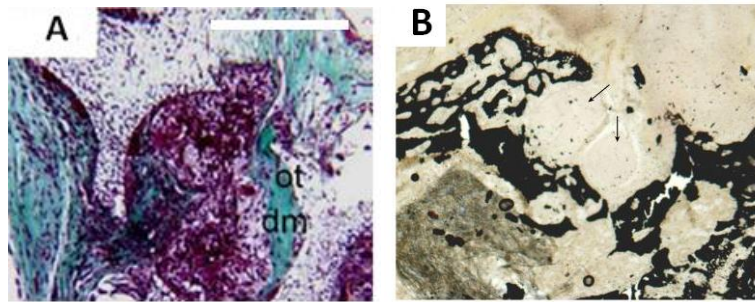


Figure 41. Colorations de coupes histologiques au trichrome de Masson et au Von Kossa. A) Coloration au trichrome de Masson d'une coupe histologique après 8 semaines d'implantation ectopique de SVF associée à de la fibrine, chez la souris *nude*. Une matrice dense est observable (dm) proche du tissu ostéoïde (ot) au niveau du matériau [Müller et al., 2010] B) Coloration au Von Kossa de coupe histologique après 3 semaines d'implantation métaphysaire fémorale chez la souris *nude* de billes d'alginate contenant des MSCs humaines [Grellier et al., 2009]

L'histomorphométrie [Calvo-Guirado et al., 2011] est basée sur l'étude des coupes histologiques, elle permet l'analyse de paramètres tels que les aspects structuraux, cellulaires et permet ainsi de quantifier la néoformation osseuse.

Les cellules implantées pourront être différenciées des cellules hôtes :

- Si elles sont préalablement transfectées par le gène codant pour la GFP (Figure 42A)
- Par hybridation *in situ* qui permet de mettre en évidence des séquences génomiques spécifiques de l'espèce considérée. Par exemple, les séquences *ALU* permettront d'identifier les cellules humaines au sein d'un implant (Figure 42B). La séquence *ALU* est un court fragment d'ADN de type SINE (*short interspersed element*) caractérisé par la présence d'un site de restriction de l'endonucléase de restriction Alu I, elle est spécifique de l'Homme et des primates proches dans l'évolution.

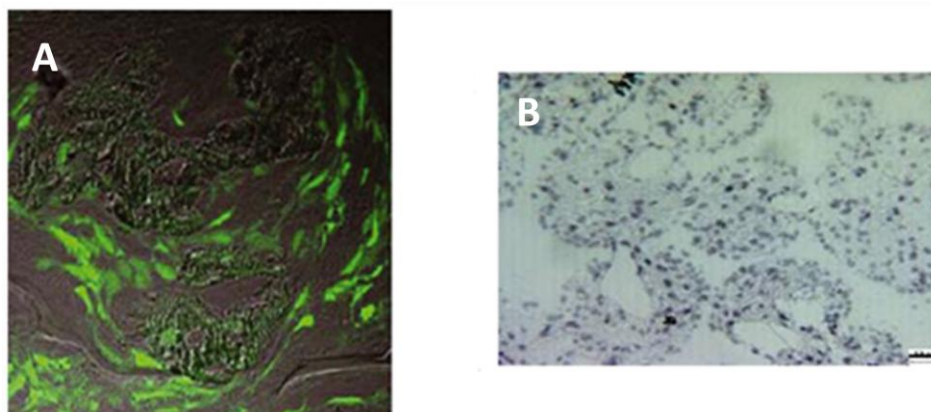


Figure 42. Visualisation des cellules implantées A) Cellules exprimant la GFP au sein du tissu néoformé [Kadowaki et al., 2004] B) Cellules d'origine humaine par hybridation *in situ* révélant les séquences *ALU* [Papadimitropoulos et al., 2011]

Des marquages cytochimiques de la PAL peuvent également être réalisés sur lames (Figure 43) afin de mettre en évidence la différenciation ostéoblastique et la présence de structures vasculaires par un immunomarquage du CD34.

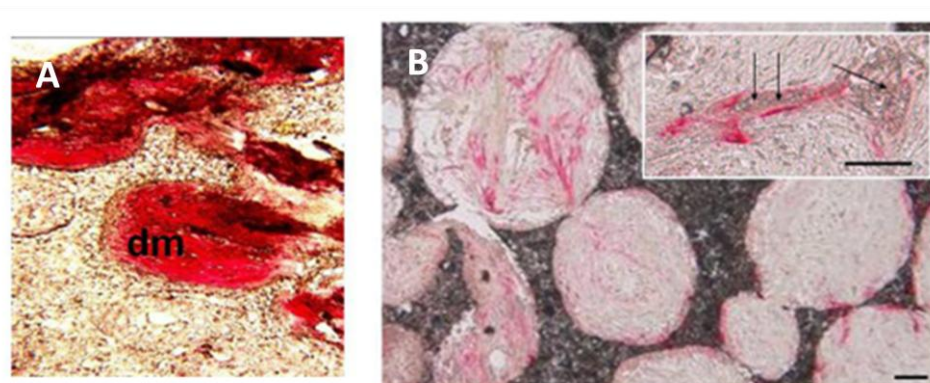


Figure 43. Immunomarquage sur des coupes histologiques après implantation d'un PIT de la A) sialoprotéine osseuse (marquage rouge) [Müller et al., 2010] et du CD34 mise en évidence de la présence d'érythrocytes dans les structures vasculaires (marquage rose) [Papadimitropoulos et al., 2011]

Pour compléter l'étude de la minéralisation du tissu néoformé *in vivo*, la composition chimique du tissu formé pourra être analysée et caractérisée en **diffraction X** ou en **spectroscopie RAMAN** et permettra d'identifier par exemple la présence de cristaux d'hydroxyapatite.

Bien que seules les analyses histologiques et histomorphométriques permettent de conclure de façon définitive sur la nature du tissu néoformé, les méthodes d'investigation du tissu néoformé évoluent à ce jour vers des techniques d'imagerie non invasives permettant un suivi longitudinal.

La bioluminescence est une technique non invasive qui va permettre d'observer les cellules implantées, préalablement transfectées par le gène codant pour la luciférase [Geuze et al., 2010] [Olivo et al., 2008] [Degano et al., 2008]. Après injection du substrat dans l'animal, la luciférine va se complexer à la luciférase et va s'oxyder provoquant l'émission d'un photon.

La production de luminescence par les cellules va être détectée et quantifiée par un capteur photonique. Cette méthode permet de suivre les cellules dans le temps et l'intensité de luminescence, proportionnelle au nombre de cellules. Elle permet d'apprécier en particulier le taux de prolifération cellulaire *in vivo* (Figure 44).

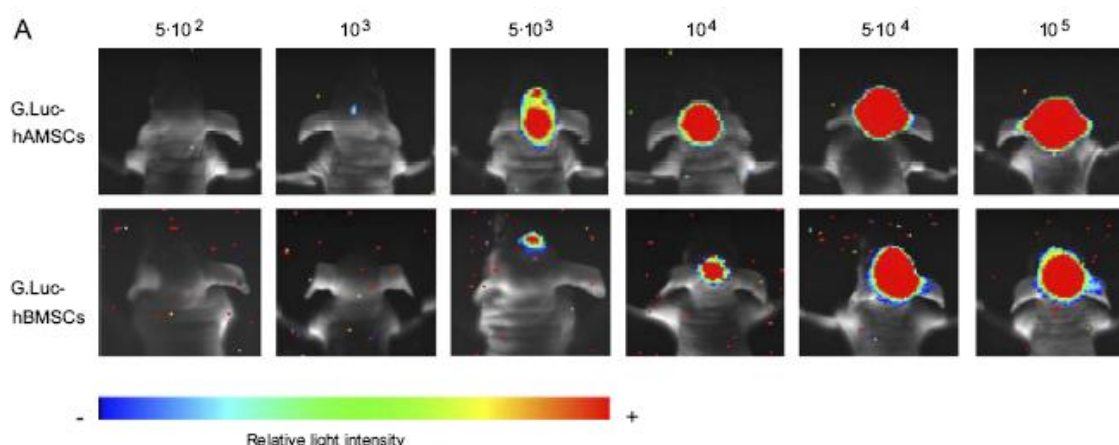


Figure 44. Détection de la luminescence produite par différentes densités d'ADSCs ou de BMSCs humaines (de 5×10^2 à 10^5 cellules) exprimant le gène luc et implantées en site osseux au niveau de la calvaria de souris *nude* [Degano et al., 2008]

Le signal de luminescence produit par les cellules peut être observable sur plusieurs mois [Degano et al., 2008] (Figure 45).

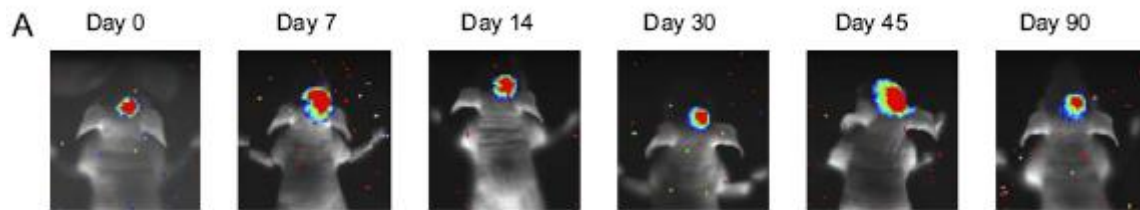


Figure 45. Suivi longitudinal sur 90 jours de la luminescence produite par des BMSCs exprimant le gène luc et implantées en site osseux au niveau de la calvaria [Degano et al., 2008]

Cependant, cette technique peu résolutive ne permet pas une visualisation tridimensionnelle de l'objet, ni une analyse de la formation osseuse.

Afin de mettre en évidence la formation osseuse au sein d'un implant de manière non invasive, la méthode la plus utilisée est la **microtomographie aux rayons X**. Les structures minéralisées étant radio-opaques, cette technique non destructrice va permettre de recréer une image 3D de l'échantillon affichant les différents degrés d'ossification de l'implant. Elle permet de quantifier le contenu minéral et/ou la densité minérale de l'échantillon. Cette technique non invasive permet un suivi longitudinal de l'évolution de la minéralisation (Figure 46) et offre une résolution d'environ 50 μm pour la microtomographie *in vivo* et de 8 μm pour la microtomographie *ex vivo*. Des études ont montré que des quantifications morphologiques sont significativement corrélées avec l'histomorphométrie conventionnelle sur coupes décalcifiées [Malinvaud, 2008].

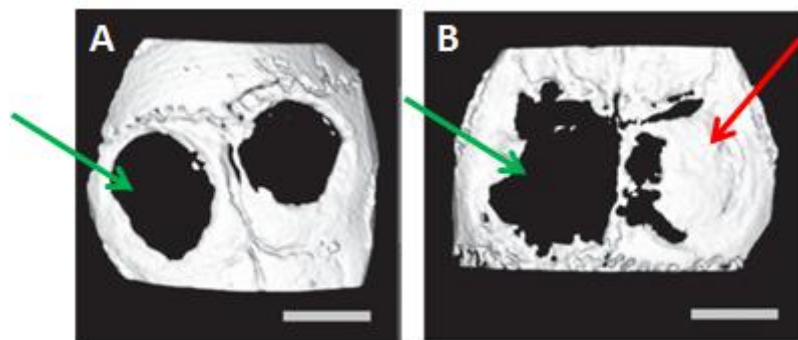


Figure 46. Analyse de la reconstruction osseuse au sein de lésions crâniennes chez la souris par microtomographie aux rayons X A) 1 semaine et B) 1 mois après impression laser d'hydroxyapatite nanocristalline. Les flèches vertes représentent la lésion contrôle, la flèche rouge représente la lésion comblée, un mois après impression laser de nHA. La barre d'échelle représente 3 mm [Keriquel et al., 2010]

La tomographie par émission monophotonique (TEMP) est une autre technique permettant la mise en évidence de la croissance osseuse. Il s'agit d'une technique d'imagerie médicale nucléaire basée sur la scintigraphie et qui permet de réaliser des images et des reconstructions en trois dimensions des organes et de leur métabolisme. Pour effectuer une TEMP, il est nécessaire d'injecter préalablement au patient un produit radioactif émetteur de rayonnements gamma (constitués de photons). Ce radiopharmaceutique, de par ses propriétés chimiques est choisi pour se fixer sélectivement dans le tissu ou l'organe et ainsi mettre en évidence certains processus biologiques. Le

MDP technétium 99 métastable (^{99m}Tc) est un radioisotope utilisé en imagerie osseuse, il s'accumule dans la phase organique de l'os et permet de visualiser la croissance osseuse.

A la différence des techniques présentées précédemment, l'**IRM** est une technique d'imagerie non invasive, non irradiante, résolutive basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire. Il s'agit d'observer la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenue dans le tissu, c'est à dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique.

L'IRM permet d'obtenir une reconstruction tridimensionnelle de la zone d'intérêt sur laquelle il est possible de distinguer le signal de l'os par rapport au signal des tissus mous environnants. Des travaux du laboratoire en interaction avec l'UMR 5536 de l'Université Bordeaux Segalen ont permis l'obtention d'images par IRM de structures osseuses, au niveau du condyle fémoral de souris dans un processus de réparation tissulaire. La cinétique de formation osseuse peut être suivie et quantifiées par un suivi longitudinal [Malaval et al., 2009b] (Figure 47).

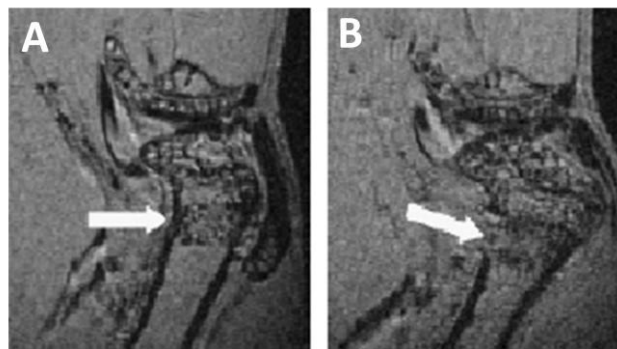


Figure 47. IRM du condyle fémoral de souris 21 jours après induction de la lésion osseuse corticale. A) Souris BSP+/+ et B) Souris BSP-/-. La flèche indique la lésion osseuse qui ne se reconstruit pas chez la souris dont le gène codant pour la BSP a été invalidé (B). La barre d'échelle représente 1 mm [Malaval et al., 2009b]

La technique d'IRM permet de visualiser également la présence d'une réaction inflammatoire suite à l'implantation d'un biomatériau (Figure 48) [Keriquel et al., 2010].

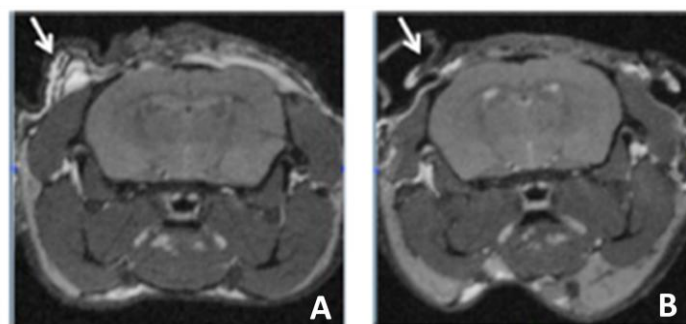


Figure 48. Visualisation par IRM d'un œdème de la dure mère au niveau de sites irradiés. (A) après une semaine et (B) après 2 semaines (B) l'inflammation a régressé [Keriquel et al., 2010]

L'IRM est une méthode qui permet également de suivre longitudinalement le devenir des cellules implantées au sein d'un produit d'ingénierie tissulaire, si elles sont préalablement marquées à l'aide d'agents de contraste [Rivière et al., 2005] [Bulte et al., 2004] [Bos et al., 2004] [Frank et al., 2002]. Il

existe deux types d'agents de contraste, les agents paramagnétiques ou T1 à base de gadolinium, et les agents T2 ou superparamagnétiques à base de fer. Les agents T2 sont préférentiellement utilisés pour le marquage cellulaire car ils sont plus biocompatibles [Hyafil et al., 2006]. Le marquage des cellules mésenchymateuses [Rice et al., 2007] [Bos et al., 2004] à l'aide de nanoparticules ferriques permet d'augmenter leur contraste et de les suivre par IRM. L'IRM permet alors de contrôler l'efficacité de la colonisation d'un biomatériau et de suivre les cellules au sein de la structure tridimensionnelle après implantation pendant plusieurs jours [Poirier-Quinot et al., 2010].

Trois paramètres essentiels devront être pris en compte pour décrire les performances des techniques d'imagerie : la sensibilité, la résolution temporelle et la résolution spatiale. Alors que la médecine nucléaire présente la sensibilité la plus importante, son utilisation est limitée par une faible résolution spatiale et temporelle, l'IRM présente le plus de potentialités, malgré une sensibilité inférieure. L'apparition de machines hybrides comme le TEP-CT et plus récemment l'IRM-TEP permet de combiner la visualisation d'une information moléculaire à l'imagerie anatomique ou fonctionnelle.

Pour finir, l'évaluation clinique d'un produit d'ingénierie tissulaire ainsi que des **tests mécaniques** pourront compléter ces expérimentations et permettront d'évaluer la qualité mécanique du tissu néoformé et sa résistance à l'étirement, à la compression, à la tension et à la torsion [Naito et al., 2011] [Reyes et al., 2007] [Bloemers et al., 2003]. Le développement de polymères composites, leur association avec des facteurs cellulaires ou biochimiques pourront contribuer à l'amélioration des propriétés mécaniques de l'os néoformé.

OBJECTIFS

Les données de la littérature dans le domaine de la régénération de lésions osseuses de grand volume mettent en évidence à ce jour, à côté des autogreffes et des allogreffes, deux types de stratégies de reconstruction osseuse :

- La première propose le développement et l'utilisation de nouveaux matériaux innovants, efficaces sans ajout d'éléments cellulaires,
- La deuxième stratégie repose sur l'association de support tridimensionnel avec une composante cellulaire,

L'implantation de cellules souches autologues dans un biomatériau ouvre une voie au développement de thérapies substitutives à la pratique de la greffe dont les limites ont été présentées. Néanmoins, l'amélioration de ces stratégies thérapeutiques ne pourra être permise qu'avec une meilleure connaissance des interactions entre les différents acteurs de cette reconstruction tissulaire. Identifier les facteurs matriciels, biochimiques et dynamiques qui contrôlent au mieux l'interface entre la composante cellulaire et la structure tridimensionnelle et qui conduisent à une régénération tissulaire, constituent les principaux objectifs de ce champ disciplinaire.

Ce travail de thèse a eu pour mission de développer un nouveau produit d'ingénierie tissulaire, destiné à la régénération osseuse, constitué d'une matrice de polymères et des cellules mésenchymateuses humaines issues du tissu adipeux, d'identifier les conditions de culture optimales, permettant le développement d'un produit fonctionnel.

Les principales étapes de ce travail ont été définies comme suit :

- Réaliser la culture tridimensionnelle des ADSCs dans une matrice macroporeuse de polysaccharides naturels à base de pullulane et de dextrane,
- Etudier leur différenciation ostéoblastique en 3D,
- Utiliser un nouveau modèle de bioréacteur à perfusion pour appliquer des contraintes dynamiques à ces matrices cellularisées, et moduler la différenciation ostéoblastique des ADSCs en 3D,
- Réaliser un marquage magnétique des ADSCs à l'aide de nanoparticules superparamagnétiques pour permettre leur suivi longitudinal *in vivo* par IRM après implantation chez le petit animal,
- Valider un nouveau milieu de culture défini, sans sérum, permettant la différenciation ostéoblastique des ADSCs pour des applications cliniques en ingénierie du tissu osseux.

Ce travail a été réalisé au sein d'un consortium composé de quatre laboratoires académiques et de deux industriels, dans le cadre d'une ANR « Technologies pour la Santé » (TECSAN) intitulée Ingénierie du Tissu Osseux Vascularisé (ITOV). Les résultats de cette thèse sont articulés autour de trois articles présentés ci-après, suivis d'une discussion et des perspectives du travail.

Article 1:

ENHANCED OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS SEEDED IN A MACROPOROUS POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLD CULTURED IN DYNAMIC CONDITIONS

C. Lalande, S.M. Derkaoui, Y. Knapp, E. Bertrand, R. Bareille, C. Bourget, C. Le Visage, V. Deplano, D. Letourneur, J. Amédée

Soumis à ECM (European Cells and Materials)

En collaboration avec la société ICELLTIS (Toulouse), nous avons mis au point un protocole d'extraction et une méthode de mise en culture des ADSCs.

Ces cellules ont été associées à une matrice tridimensionnelle macroporeuse composée de polysaccharides naturels, le dextrane et le pullulane, matrice développée par l'Inserm U698 (Paris), partenaire du programme ANR ITOV.

L'objectif du premier article a été d'étudier le devenir de ces cellules progénitrices dans cette matrice tridimensionnelle de polysaccharides en termes d'adhérence, de prolifération et de phénotype cellulaire. Nous avons étudié la différenciation ostéoblastique de ces cellules souches adultes au sein de la structure tridimensionnelle en présence de différents stimuli biochimiques (milieux de culture) et dynamiques. Nous avons en particulier étudié l'effet de contraintes dynamiques sur la culture tridimensionnelle des ADSCs et sur leur différenciation ostéoblastique, grâce à l'utilisation d'un nouveau bioréacteur à perfusion, développé par l'équipe IRPHE (Institut de Recherche sur les Phénomènes Hors Equilibre), UMR CNRS 6594 (Marseille), partenaire du programme ANR ITOV. Ces contraintes de perfusion permettent une meilleure circulation du flux nourricier, favorisent les échanges cellulaires au sein de la matrice 3D et devraient ainsi réguler la fonction des cellules hébergées dans cette structure.

Ces résultats ont été soumis à publication dans « European cells and Materials ».

Article 2:

MAGNETIC RESONANCE IMAGING TRACKING OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS WITHIN THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

C. Lalande, S. Miraux, S.M. Derkaoui, S. Mornet, R. Bareille, J.C. Fricain, J.M. Franconi, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée and A.K. Bouzier-Sore

Publié dans ECM (European Cells and Materials)

[Lalande et al., 2011]

Après analyse et caractérisation *in vitro*, ces PIT devront être évalués pour leur capacité de régénération osseuse, après implantation chez l'animal en site ectopique, non osseux, pour évaluer leur potentiel ostéoinducteur, puis en site osseux afin de mettre en évidence un processus d'ostéoconduction.

L'implantation de cellules chez l'animal, soulève plusieurs questions: quel est leur devenir après implantation? Restent-elles viables? Restent-elles au sein de la structure? Quelle est leur fonction dans le processus de régénération tissulaire ?

Nous avons voulu répondre aux premières questions en suivant de façon longitudinale, le devenir des cellules hébergées dans ce PIT et implantées chez le petit animal par une technique d'imagerie

non invasive, l'imagerie par résonnance magnétique. Ce travail a été mené en collaboration avec le RMSB (centre de Résonnance Magnétique appliquée aux Systèmes Biologiques), UMR CNRS 5536 (Bordeaux), partenaire du programme TECSAN ITOV, et a fait l'objet d'une publication dans « European Cells and Materials ».

Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole de marquage des ADSCs à l'aide de nanoparticules paramagnétiques de type USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron oxide), et suivi *in vivo* de manière longitudinale, l'évolution de ces cellules au sein du PIT par IRM, après implantation en site sous-cutané chez la souris sur une durée de 28 jours.

Article 3:

DEVELOPMENT OF A DEFINED MEDIUM FOR OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS (ADSCs)

C. Lalande, L. Caillot, C. Conway, R. Bareille, G. Uzan, J. Amédée

Article en préparation

A terme, ces PITs, élaborés à partir de polymères naturels et de cellules mésenchymateuses autologues, pourraient être utilisés pour des applications cliniques. Or dans ce contexte, il est nécessaire qu'ils répondent aux conditions GMP (Good Manufacturing Practices) de développement et de préparation, garantissant la reproductibilité de leur préparation, l'absence de toxicité potentielle liée aux composants de ce produit (cellulaires ou non) et une parfaite innocuité pour le patient. Parmi les critères identifiés dans la réglementation autour des PITs, l'utilisation d'un milieu de culture parfaitement défini, constitué de facteurs protéiques autorisés par l'Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) reste un pré-requis.

Ainsi, l'objectif de cette troisième étude a été de développer et de valider un nouveau milieu de culture sans sérum, permettant de stimuler la différenciation ostéoblastique des ADSCs. Ce travail a été mené en collaboration avec la société ABCell-Bio (Paris). Nous avons dans le cadre de ce travail de thèse, évalué plusieurs lots de milieux de culture. Nous avons identifié une composition, capable de stimuler l'expression des marqueurs précoces et tardifs de la différenciation ostéoblastique des ADSCs, ainsi que la minéralisation de la MEC. Ces résultats font l'objet d'un article en préparation.

La dernière partie du manuscrit est consacrée à la discussion et les perspectives de ce travail en présentant des données préliminaires sur l'apport de la coculture de cellules mésenchymateuses et de cellules du lignage endothélial pour modifier la cinétique de la différenciation ostéoblastique. Ces cocultures cellulaires, grâce au dialogue qu'elles peuvent mettre en place, pourraient contribuer à la formation d'un tissu osseux minéralisé et vascularisé.

Enfin, les études expérimentales réalisées chez le petit animal, puis chez le gros animal, seront les seuls critères permettant de conclure sur l'intérêt de ces nouveaux produits d'ingénierie tissulaire. Ces études sont actuellement en cours d'évaluation.

RESULTATS



ENHANCED OSTEOLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS SEEDED IN A MACROPOROUS POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLD CULTURED IN DYNAMIC CONDITIONS

C. Lalande ^{1,2}, S.M. Derkaoui ^{3,4}, Y. Knapp ⁵, E. Bertrand ⁶, R. Bareille ^{1,2}, C. Bourget ^{1,2}, C. Le Visage ^{3,4}, V. Deplano ⁷, D. Letourneur ^{3,4}, J. Amédée ^{1,2}

¹ Bordeaux Segalen Univ., Bordeaux, F-33076, France

² INSERM, U1026, Tissue Bioengineering, Bordeaux, F-33076, France

³ INSERM, U698, Cardiovascular Bioengineering, Paris, F-75018, France

⁴ Pres Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75005, France

⁵ UMR 1114 EMMAH INRA - UAPV, 84914 Avignon, France

⁶ Aix-Marseille Univ., IRPHE, 13384, Marseille, France

^{5,7} CNRS, IRPHE, 13384, Marseille, France

Soumis à ECM (European Cells and Materials)

I. Etude de la différenciation ostéoblastique des ADSCs associées à une matrice tridimensionnelle, composée de polymères naturels et soumises à des contraintes mécaniques

A. Introduction

L'ingénierie tissulaire consiste à associer des cellules « réparatrices » à un biomatériau capable de véhiculer et de délivrer ces cellules au niveau du site lésé afin d'initier un processus de réparation tissulaire [Howard et al., 2008].

Les cellules mésenchymateuses adultes (MSCs) sont des cellules de choix pour l'ingénierie tissulaire. Elles se définissent par leur capacité d'autorenouvellement, leur potentiel prolifératif et leur plasticité importante permettant leur différenciation en plusieurs lignages (ostéoblastique, adipocytaire, chondrocytaire, endothélial...) [Pittenger et al., 1999]. Les cellules mésenchymateuses ou stromales peuvent être isolées à partir de plusieurs tissus dont le plus utilisé est la moelle osseuse.

Cependant, depuis quelques années, la communauté scientifique assiste à l'émergence d'une nouvelle source de cellules souches adultes, le tissu adipeux, plus facilement accessible et présent en plus grande quantité que le tissu médullaire [Bunnell et al., 2008] [Zuk et al., 2002]. Les ADSCs présentent les mêmes propriétés que celles extraites de la moelle osseuse et apparaissent comme de bons candidats pour des applications en ingénierie tissulaire [Sterodimas et al., 2009].

Dans cette étude, les ADSCs ont été associées à une matrice macroporeuse composée de polysaccharides naturels, le dextrane et le pullulane [Poirier-Quinot et al., 2010] [Robert et al., 2010] [Le Visage, 2009a] [Le Visage, 2009b]. Cette matrice a été sélectionnée ici pour ses propriétés de biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa capacité à mimer les fonctions biochimiques et structurales de la matrice extracellulaire et en particulier la rétention de facteurs bioactifs tels que les facteurs de croissance nécessaires à la régulation de l'activité des cellules hébergées.

De plus, plusieurs études démontrent l'importance de l'architecture de la matrice sur les fonctions biologiques des cellules telles que l'adhérence, la prolifération et la différenciation [Kumar et al., 2011]. Un environnement tridimensionnel peut ainsi orienter un phénotype cellulaire notamment vers une voie ostéoblastique [Keogh et al., 2010a] [Keogh et al., 2010b] [Ravindran et al., 2011].

D'autre part, le développement de telles matrices macroporeuses colonisées par des cellules souches autorise la culture en dynamique, dont on connaît l'effet sur la différenciation ostéoblastique, principalement connue dans le cas de matrices phosphocalciques. Les contraintes de perfusion permettent ainsi une meilleure circulation du flux nourricier, favorisent les échanges cellulaires au sein de la matrice 3D et favorisent la différenciation ostéoblastique des MSCs [McCoy and O'Brien, 2010] [Frohlich et al., 2010].

Cependant, si les ADSCs ont été très bien caractérisées *in vitro* en deux dimensions, peu d'études se sont intéressées au comportement de ces cellules, notamment en termes de différenciation ostéogénique dans une matrice tridimensionnelle de polymères associée à des contraintes mécaniques.

L'objectif de cette première étude a été d'évaluer la capacité d'une matrice à base de pullulane et de dextrane à induire la différenciation ostéoblastiques des ADSCs en conditions statiques et dynamiques et en absence de facteurs ostéoinducteurs.

B. Article 1: Stimulation de la différenciation ostéoblastique des cellules souches issues du tissu adipeux humain associées à une matrice macroporeuse de polysaccharides et cultivées en conditions dynamiques

Abstract

Adipose tissue Derived Stem Cells (ADSCs) are proposed here to be associated with a macroporous polysaccharide-based scaffold for bone tissue engineering. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the osteogenic differentiation of ADSCs seeded in this matrix under static and dynamic culture conditions. Microscopy analyses revealed that this porous scaffold induces the generation of viable and metabolically active multicellular aggregates inside the pores of the tridimensional (3D) structure. Cells were harvested at different times of culture and osteogenic differentiation was assessed by real-time PCR analysis, immunostaining of bone-matrix related proteins, Alkaline Phosphatase (ALP) cytochemistry, and Von Kossa staining. Phenotype analysis showed that this 3D matrix activates expression of differentiation markers and upregulates them relative to 2D culture, without the need for added osteoinductive factors. We also observed widespread osteogenic induction after five days of 3D dynamic culture conditions, with 100-fold higher levels of ALP and osteocalcin mRNA. The junctional protein Cx43 is also greatly increased thanks to improved cell-to-cell contacts and controlled perfusion within the 3D porous matrix. In conclusion, this macroporous scaffold offers a suitable architecture and composition for stimulating osteoblastic differentiation of ADSCs in a multicellular aggregate conformation and the differentiation is greatly enhanced when the tissue-engineered construct is placed in dynamic conditions.

Keywords: Bone tissue engineering, adipose-derived stem cells, 3D culture, macroporous polysaccharide-based scaffold, flow perfusion bioreactor.

Introduction

Bone tissue engineering uses methods from material engineering and life sciences to create an engineered construct for regeneration of tissue. The common approach is to isolate appropriate cells through a biopsy from a patient and to grow them within a 3D scaffold under controlled culture conditions [Dimitriou et al., 2011] [Zippel et al., 2010] [Van Blitterswijk, 2008]. Cell-free and cell-based approaches for bone tissue regeneration have been discussed by Bueno *et al.* [Bueno and Glowacki, 2009] and specific limitations still remain, mainly concerning the source of the reparative cells, the growth factors used for cell expansion and cell induction, and their ability to produce bone-related matrix proteins within the scaffold [Lichte et al., 2011] [Seong et al., 2010].

The choice of the cell source is influenced by their proliferative and differentiation capacity [Seong et al., 2010] [Zhu et al., 2009]. The multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells (MSCs) was identified many years ago and these stem cells are popular candidates for tissue regeneration [Griffin et al., 2011] [Jones and Yang, 2011] [Zippel et al., 2010] [Chatterjea et al., 2010]. They may be isolated from various tissues including bone marrow [Pittenger et al., 1999] and adipose tissue [Zuk et al., 2002]. Extensive reports on differentiation of MSCs from bone marrow (BMSCs) have been described both in two- (2D) and three- (3D) dimensional culture [Dutta and Dutta, 2009] [Costa-Pinto et al., 2009]. Adipose-derived mesenchymal cells have been demonstrated to exhibit functional characteristics in 2D cultures close to those arising from bone marrow stromal tissue [Kachgal and Putnam, 2011] [Hayashi et al., 2008] [Puissant et al., 2005]. They express several Cluster

Differentiation (CD) markers identical to those expressed in BMSCs [Gimble and Guilak, 2003]. The main advantages of using these adipose-derived stem cells include reduced morbidity, easy harvesting and a greater abundance of mesenchymal cells compared to those from bone marrow. Their ability to differentiate towards osteoprogenitor and/or vascular endothelial cells has already been proved [Fischer et al., 2009] mainly in 2D cultures, so they have been proposed as a cell source for vascularized bone tissue engineering strategies [Liu et al., 2011] [Neofytou et al., 2011].

It is now accepted that stem cells in 2D cultures can differ considerably in their morphology, cell adhesion, cell proliferation and differentiation from those growing in a 3D scaffold [Pennesi et al., 2011] [Dutta and Dutta, 2009]. Recently, it has been demonstrated that cell shape controls stem cell fate in a 3D scaffold [Kumar et al., 2011]. In this context, it has been shown that 3D culture could support osteogenic differentiation of primary human osteoblasts [Keogh et al., 2010a] [Keogh et al., 2010b] and BMSCs [Costa-Pinto et al., 2009] [Ravindran et al., 2011]. Only a few reports have described the cell behavior of adipose-derived stem cells in a 3D microenvironment and their orientation to the osteogenic lineage within the scaffold [Marino et al., 2010] [McCullen et al., 2009] [Liu et al., 2008] [Leong et al., 2008].

To mimic a 3D microenvironment, biomaterials are designed to create a favorable physical and chemical structure for cells in order to promote their differentiation and the production of a specific mineralized extracellular matrix [Lichte et al., 2011] [Lu et al., 2011]. Scaffolds for bone tissue engineering should be biocompatible, biodegradable, promote cell interactions, mineralized extracellular matrix formation and finally possess mechanical properties. A further requirement for a scaffold for bone tissue engineering is interconnected porosity so as to direct the cells to grow into the scaffold and to support vascularization of the ingrown tissue [Gleeson et al., 2010] [Karageorgiou and Kaplan, 2005].

Today, scaffolds for bone tissue engineering are bioactive ceramics such as calcium phosphate, bioactive glasses or metallic implants, and are mainly used for maxillo-facial surgery and orthopedic applications [Lew et al., 2011]. Besides these bone substitutes, polymers exhibit great design flexibility in terms of composition and their structure can be tailored to specific needs [Li et al., 2010] [Liu and Ma, 2004] [Gunatillake and Adhikari, 2003]. Another property of polymer systems is their capacity to retain and thereafter deliver growth factors [Geckil et al., 2010] [Richardson et al., 2001], a likely requirement for driving differentiation of MSCs and tissue development.

To date, few polymer-based scaffolds have been proposed as carriers for transplanted cells or as delivery systems for growth factors including vascular endothelial growth factor [Des Rieux et al., 2011] or osteoinductive factors [Yu et al., 2010] [Lin et al.]. The hydrophilic properties of natural-based polysaccharides and their biochemical similarity with the extracellular matrix make them good candidates for bone tissue engineering, for instance, with chitosan for orthopedic/periodontal applications [Costa-Pinto et al., 2011], delivery of growth factors [Akman et al., 2010] [Rajam et al., 2011] and corticosteroids [Tigli et al., 2009], and activation of osteogenesis with osteoblastic cell lines or MSCs [Chesnutt et al., 2009] [Costa-Pinto et al., 2009]. Our previous work [Grellier et al., 2009] indicated that human bone marrow stromal cells encapsulated in RGD-functionalized alginate microspheres produced *in vitro* a bone specific mineralized extracellular matrix. However, *in vivo* implantation of these cellularized microspheres into a critical size bone defect does not lead to complete bone tissue regeneration of the defect.

In the present work, we have used a pullulan-based hydrogel that has been developed for cardiovascular tissue engineering applications [Autissier et al., 2007] [Thébaud et al., 2007]. Pullulan

is a neutral, linear and non-immunogenic polysaccharide produced from starch fermentation by the fungus *A. pullulans*. Moreover, it is also highly biocompatible and biodegradable. Dextran with a high molecular weight was also selected for the preparation of these 3D matrices. The suitability of these polysaccharide-based hydrogels has already been proved for vascular tissue engineering, but they offer a high flexibility, including a variable macroporosity and/or composition for other tissue engineering applications [Park, 2011] [Hayashi et al., 2009] [Ahmed et al., 2008] [Augst et al., 2006] [Granja et al., 2005] including bone tissue regeneration.

In addition to the 3D microenvironment, bioactive factors could be required for activating osteoblastic differentiation of MSCs. Among these factors, besides the osteoinductive factors (Bone Morphogenetic Proteins or BMPs), corticosteroids such as dexamethasone, β -glycerophosphate and ascorbic acid are also well known for activating osteogenic differentiation of MSCs and producing a mineralized extracellular matrix in 2D and 3D structures. However, the exact role played by the 3D matrices on cell differentiation could be masked by the presence of numerous osteogenic factors that induce osteoblast differentiation, whatever the mode of cultivation of these MSCs. In contrast to this mode of culture mentioned above, the present study involves a macroporous matrix that serves as scaffold for 3D cultivation of ADSCs, in a medium totally deprived of osteoinductive factors.

Moreover, the use of bioreactors allowing a controlled perfusion of the cellularized macroporous system is one of the major advantages over other systems mentioned above. Mechanical forces generated by fluid flow were shown to have a significant influence on osteogenic cells [Yeatts and Fisher, 2011] [Carpentier et al., 2011] [Rauh et al., 2011] [McCoy and O'Brien, 2010].

The objective of this study was to evaluate the potential of a macroporous polymer matrix such as a 3D microenvironment to drive osteogenic differentiation of human MSCs from adipose tissue under static and dynamic cultures. Data obtained here showed that in the absence of osteogenic medium, this macroporous architecture induces the formation of multicellular aggregates, promotes cell interactions and stimulates osteoblastic differentiation of ADSCs. In addition, development of a new perfusion bioreactor makes it possible to apply mechanical forces to this tissue-engineered construct, allowing enhancement of osteoblastic differentiation of ADSCs and cell interactions.

Material and methods

Preparation of 3D porous polysaccharide-based scaffold

Porous polysaccharide-based scaffolds (6 mm diameter, 2 mm thickness) were prepared using pullulan/dextran as previously described [Robert et al., 2010] [Poirier-Quinot et al., 2010] [Le Visage, 2009a][Le Visage, 2009b]. Pores were created by a patented gas-foaming technique.

Isolation and culture of hADSCs

Human ADSCs were isolated and cultured as previously described [Bunnell et al., 2008] with minor modifications. Briefly, human adipose tissue was obtained from patients undergoing liposuction. Tissue samples were minced and digested in a solution of 0.1% (w/v) collagenase type I (Worthington, Lakewood, NJ, USA) for 1.5 h at 37 °C with vigorous shaking. After filtration and centrifugation, the top lipid layer was removed and the remaining Stromal Vascular Fraction (SVF) was treated for 10 min with ELB (Erythrocyte Lysis Buffer; 155 mM NH_4Cl (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5.7 mM K_2HPO_4 , 7.4 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM EDTA (all Sigma-Aldrich)) and then centrifuged. The pellet was resuspended in basal medium (BM): DMEM F12 medium (Invitrogen/Life

Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, Basel, Switzerland) and sequentially filtered through 100, 70 and 40 μm cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). Culture medium was replaced every three days. Osteogenic medium (OM) contained IMDM (Invitrogen) supplemented with 10 % (v/v) FBS, 10 mM β -glycerophosphate, 10^{-8}M dexamethasone, and 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid (Sigma-Aldrich). This medium was used as control to induce osteoblastic differentiation.

ADSCs seeding in the 3D scaffolds and cell imaging

Immunocytochemistry

Dried scaffolds (6 mm diameter, 2 mm thickness) were submitted for 30 minutes to UV radiation and seeded with 20 μl of 5×10^5 ADSCs arising from passage two, then exposed to BM. One day after cell seeding, in static conditions, cell distribution within the scaffold was assessed by optical microscopy. Staining of actin fibers of paraformaldehyde fixed and permeabilized cells was performed by incubation with Alexa 488-conjugated phalloidin (Molecular Probes, 1:40). Nuclei were counterstained with 10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst-33342 (Invitrogen). Observations were made on a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Environmental scanning electron microscopy (ESEM)

ADSCs were cultured for 1 day in static conditions within the scaffolds in BM. Cells were fixed with 2.5% (w/w) glutaraldehyde/cacodylate for 18 minutes at room temperature for ESEM analysis. Fixed materials were washed twice into cacodylate 0.1 M buffer for 5 minutes. Samples were observed on a QUANTA 200 (FEI Company) scanning electron microscope with controlled pressure. Environmental conditions in ESEM modality were 7 torr, 7 Kv, 6 mm WD. For the ESEM way, a specific detector "GSED" (gas secondary electron detector) and the Peltier platine at 4°C were used during the observations. Image acquisition was done using SIS Scandium software.

Time lapse videomicroscopy

ADSCs were seeded into the matrix in basal medium in static conditions, and samples were deposited one hour later in a specific chamber settled on a thermostable plate on the microscope at a constant temperature of 37°C and constant CO_2 flux (10L/min). Video-microscopy experiments were done on an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a Quatem camera (Roper Scientific, Evry, France). The objective used was a HC PL APO CS 20X dry 0.7 NA. The microscope was programmed to take a picture every 10 min for 8 hours to detect ADSCs. The resulting film was reconstructed with the LAS-AF (Leica Advanced Suite-Advanced Fluorescence) software.

Dynamic culture experiments

A new perfusion bioreactor system was used for culturing hADSCs within a polysaccharide-based scaffold under dynamic culture conditions [Knapp et al., 2011]. In this patented bioreactor system, a pulsatile vertical flow ensures the sustentation of the porous soft scaffolds. During the experiments, basal culture medium flowed through the system where twelve scaffolds were placed and continuously cultured in suspension. The pulsatile flow was generated using a peristaltic pump (AB1-CAN, AB Pompes). The conditions, 2Hz, 0-6.8L/min with average 3.5L/min flow rate through the system ensured proper suspension of the scaffolds. Such flow conditions resulted in dynamic

perfusion of the porous scaffolds with an average flow rate of about 6×10^{-4} mL/min. The medium was equilibrated with respect to 5% oxygen and 37°C. Briefly, cellularized scaffolds were deposited in the perfusion chamber after 48 hours of static culture, allowing the cells to settle and the bubbles to drain. The perfusion system was carried out for 5 days. Control scaffolds were also kept in static culture in the same basal medium. Afterwards, scaffolds were harvested for gene expression analysis by Q-PCR and for cell viability after 5 days of dynamic culture conditions.

Cell viability assessment and metabolic activity in the 3D scaffold

Cell viability

The viability of cells cultured within the 3D matrix in static or in dynamic conditions was investigated at different culture times using a L3224 LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity kit according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). The 3D cultured cells were stained with calcein AM and ethidium homodimer-1. Membrane-permeant calcein AM is cleaved by esterase in live cells to yield cytoplasmic green fluorescence and membrane-impermeant ethidium homodimer-1 labels membrane-compromised cells with red fluorescence. Images were recorded with a fluorescence microscope (Nikon Diaphot 300 inverted microscope).

Metabolic activity

Metabolic activity of 3D static seeded cells was quantified by measuring endogenous enzyme hexosaminidase activity [Landegren, 1984]. Cells were cultured in the matrices in basal medium (BM) at day 1, 7 and 15 and then rinsed with Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.1 M pH 7.4 before addition of the substrate solution (sodium citrate 0.1M, p-Nitrophenyl-N-Acetyl BD glucosaminidine 7.5 mM, Triton X 100) diluted twice in distilled water for 2 hours at 37°C. After addition of the blocking solution (EDTA 5mM, glycine 50mM, distilled water, pH 10.4), absorption at 405 nm was measured spectrophotometrically.

Immunostaining of osteoblastic specific markers

ADSCs cultured inside the 3D porous matrix, in static culture conditions, in BM or in OM, were fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 40 min at 4°C and permeabilized in Triton X 100 0.1% (v/v) for 30 min at 4°C. Fixed cells were incubated for 1 hour in PBS 0.1 M pH 7.4 (Gibco) containing 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), then overnight at 4°C with primary antibodies (Table 1). Subsequently, cells were washed in PBS 0.1 M pH 7.4 (Gibco) and incubated with Alexa fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG 1:4000 (Molecular probes) for 2 hours at 37°C. Cells were incubated with the nuclear probe DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, FluoProbes 5mg/ml, dilution 1:5000) for 30 min at room temperature to label the nucleus and were thereafter observed with a fluorescence microscope (Nikon Diaphot 300 inverted microscope).

Alkaline phosphatase cytochemistry

Intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity was detected in ADSCs cultured in scaffolds, using the conversion of a colorless *p*-nitrophenyl phosphate to a colored *p*-nitrophenol (Sigma diagnostic kit (85L-2), Aldrich). Tissue-engineered constructs were fixed with paraformaldehyde 4% (v/w) for 40 min at room temperature. Cells were then stained with alkaline dye (Fast blue RR salt supplemented with Naphtol AS-MX phosphate alkaline solution 0.25%, Sigma, Aldrich) for 30 min. Samples were observed with an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

Von Kossa staining

Von Kossa staining was performed to assess the level of calcium deposition by the ADSCs seeded on the 3D matrix in static culture conditions. After 15 days of culture as previously described, in BM or in OM, samples were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 30 min at room temperature, rinsed with distilled water, and incubated with silver nitrate 2.5% (w/v) for 30 min at room temperature in the dark. Silver nitrate was removed and samples were rinsed with distilled water. Carbonate sodium/formalin solution (25mL formalin, 5g Na₂CO₃, 100mL distilled water) was added to the scaffolds for 1 min and rinsed with tap water. The scaffolds were then imaged using an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

Cells were harvested from 2D culture by trypsin-EDTA treatment and from the matrix by Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.1 M pH 7.4. Total RNA was extracted using the Nucleospin[®] RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). One µg was used as a template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco, Paisley, UK) in a 20 µl final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 µg oligo(dT), and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42 °C for 50 min, the reaction was stopped at 70 °C for 15 min. Five µL of cDNA diluted at a 1:80 ratio were mixed with MESA-green (2X, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and 10 µM each of forward and reverse primers (Table 2) in a 25 µL final volume and loaded in a 96-well plate. Amplification was performed using the thermocycler (iCycler, Biorad, Hercules, CA, USA). Data were analyzed with the iCycler IQ[™] software and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each Q-PCR was performed in duplicate. Briefly, the mean C_t value of the target gene was normalized to its averaged C_t values of the housekeeping gene P0 to give a ΔC_t value, which was then normalized to control samples to obtain a $\Delta\Delta C_t$ value.

Statistical analysis

Data are represented as the mean $\pm$ standard deviation resulting from independent experiments. Statistical significance of differences between data from experimental groups was tested using a non-parametric Mann Whitney test. A $p < 0.05$ (*) was considered to be statistically significant.

Results

ADSCs form multicellular aggregates within the 3D porous scaffold in static conditions

Polysaccharide-based scaffolds (6 mm diameter, 2 mm thickness) were prepared with a gas-foaming technique resulting in large pores (200 µm) and a total porosity around 60% (Figure 1A). We first examined the behavior of ADSCs in this 3D porous polysaccharide-based scaffold under static culture, without osteogenic factors in the culture medium. Dried scaffolds allowed easy seeding of cells in suspension (5×10^5 hADSC here). Microscopic observation of the tissue-engineered constructs after 24 hours of culture under static conditions in a basal medium showed that human ADSCs did not spread within the scaffold but formed round multicellular aggregates in the matrix pores (Figure 1B). Their size ranged from 20 to 200 µm and they appeared homogeneously distributed within the scaffold (Figure 1B).

Environmental scanning electron microscopy (ESEM) performed after 24 hours of culture confirmed that these cell clusters were integrated within the porous structure of the scaffold (Figure 1C) and

surrounded by an extracellular matrix. Actin/phalloidin and DAPI staining indicated that the aggregates were composed of numerous cells exhibiting actin fibers (Figure 1D).

Time lapse videomicroscopy revealed that ADSCs, previously dispersed within the 3D structure after cell seeding (Figure 2_{10min}), had migrated during the first eight hours of culture to form well-organized aggregates after 8 hours of culture (Figure 2_{460min}).

Cell viability assessment in ADSC aggregates cultured under static conditions in the 3D scaffold

Live/dead assay (Figure 3A-D) evidenced that the vast majority of ADSCs under static 3D culture conditions were alive inside the aggregates after 3 days (Figure 3A, 3C), 15 days (Figure 3B, 3D) and until 70 days of culture (data not shown). The cell aggregates were distributed in the border (Figure 3A, 3B) as well as in the center of the scaffold (Figure 3C, 3D). Few dead cells were observed in the center of the matrix, especially inside the multicellular aggregates (Figure 3C, 3D), indicating that this mode of cultivation of ADSCs in static conditions could be further improved by increasing the nutrients and gas exchanges inside the construct. However, quantification from day 1 to day 15 of the metabolic activity of ADSCs seeded in this polymer matrix in a basal medium (BM) revealed that the cells remained metabolically active (Figure 3E) and that the activity increased significantly with time of culture.

Osteogenic differentiation of ADSCs cultured in the 3D scaffold under static conditions

The mRNA levels of early osteoblastic markers, i.e. alkaline phosphatase (ALP), collagen type 1 α 1 (Col1A1), a predominant collagen in mineralized bone matrix, and late osteoblast differentiation markers, i.e. osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN) were quantified after 1 (D1), 7 (D7) or 15 days (D15) of static 3D culture in a basal medium (BM). Three-dimensional cultures were also performed in the osteogenic differentiation medium (OM) used here as positive control for osteoblastic differentiation.

Figure 4 (A-D) revealed that this new 3D polymer matrix enhanced the expression of early osteoblastic differentiation markers (ALP, Col1A1) after 7 days (D7) of 3D culture in the absence of osteogenic factors (BM) in comparison with their corresponding expression at day 1. The mRNA levels of ALP and Col1A1 at day 7 compared to day 1 were 1.84 ± 0.32 and 2.78 ± 0.06 fold higher respectively, and the expression at day 15 compared to day 1 was 1.85 ± 0.87 and 6.73 ± 0.32 fold higher respectively.

Although OPN mRNA was weakly expressed by ADSCs in this 3D scaffold, the expression of OCN, another late specific osteoblastic marker, was 4.36 ± 0.1 fold higher in a basal medium (BM) at day 7 compared to day 1, and reached the same level of expression as in induced culture (OM) conditions. OCN expression level in ADSCs decreased after 15 days of 3D culture in BM and remained comparable to the corresponding 3D cultures in OM culture conditions.

As expected for numerous substitutes, the osteogenic differentiation medium (OM) stimulated the expression of early and late osteoblast differentiation markers in the 3D cultures of ADSCs. Immunostaining confirmed that ADSCs in the aggregate conformation were able to synthesize early and late osteoblastic proteins (Col1A1, OPN and OCN) from day one to day 15 under static culture conditions in a basal medium (BM) (Figure 4E). This expression was also detected after 7 days of 3D culture (data not shown) and was easily detectable after 15 days of culture. Three-dimensional cultures in the osteogenic culture medium (OM) under static conditions used as positive control confirmed the deposition of bone-related matrix proteins inside the 3D multilayered aggregates.

On the other hand, ALP cytochemistry analysis of ADSCs in the matrix showed that multicellular aggregates in non-induced conditions (BM) demonstrated an elevated ALP activity at day 15 (Figure 4E) compared to day 1. All the aggregates were positive for ALP activity (Figure 4E). Furthermore, Von Kossa staining (Figure 4E) at day 15 (D15) indicated the presence of calcium deposits in the extracellular matrices in non-induced (BM) conditions compared to day 1. As expected, addition of β -glycerophosphate, dexamethasone and ascorbic acid in the culture medium (OM) activated the mineralization process (Figure 4E).

Taken together, these data suggested that this 3D macroporous polysaccharide-based scaffold offers a suitable microenvironment for initiating osteogenic differentiation of human ADSCs, under static culture configuration, without any of the additional factors used for driving osteoblastic differentiation.

Osteoblast differentiation of ADSCs in 3D scaffold compared to 2D

To check the role of this 3D scaffold, we compared osteogenic differentiation of ADSCs in 2D conventional cultures on plastic culture dishes and in 3D cultures in the macroporous polysaccharide-based matrix. 2D and 3D cultures were performed both in basal (BM) and in osteogenic differentiation (OM) media for 15 days. Quantification of mRNA levels of osteoblast differentiation markers (ALP and OCN) showed that, whatever the medium used, the polysaccharide-based matrix stimulated significantly the early (ALP) and late osteoblastic differentiation marker (OCN) compared to 2D cultures. Expression of ALP and OCN of ADSCs in the 3D matrix relative to 2D culture was about 1.71 ± 0.12 and 2.33 ± 0.05 fold higher in BM conditions, and 4.42 ± 0.96 and 10.39 ± 0.76 fold higher in OM conditions, respectively.

Effect of dynamic conditions on ADSCs cultured in the 3D matrix

We applied dynamic strain to this tissue-engineered construct using a new bioreactor device [Knapp et al., 2011] at an average flow rate of about 6×10^{-4} mL/min to increase the mass exchange inside the scaffold for nutrient and gas supply of ADSCs. After 5 days of dynamic culture in basal media, Live/Dead assay showed that multicellular aggregates of similar size as in static culture conditions were present in the matrix and were distributed homogeneously within the 3D scaffold (Figure 6A-B). In addition, there were no dead cells in the center of the scaffold (Figure 6B). mRNA levels of osteoblastic markers (ALP, OPN, OCN) and the gap junctional protein (Cx43) were quantified after 5 days of static and dynamic cultures in the basal medium. Data revealed that cells cultured in the scaffold under fluid flow presented a massive increase in osteoblast differentiation marker expression compared to static conditions (Figure 6C-6F). The expression of ALP, OPN and OCN in hADSCs cultured in dynamic conditions compared to static conditions was 99.87 ± 33.6 , 14.07 ± 11.01 , 104.22 ± 10.19 fold higher respectively, while the junctional protein (Cx43) was expressed 7.54 ± 1.46 fold higher than in static condition. These data demonstrated that perfusion of the tissue-engineered constructs strongly activates cell interactions and osteoblastic differentiation of human ADSCs.

Discussion

A major challenge facing the field of bone tissue engineering is the development of scaffolds capable of promoting the differentiation of immature progenitor cells down an osteoblastic lineage, without additional biochemical factors that could hamper industrial developments and clinical applications. It

is now accepted that the composition and the tridimensional structure of a scaffold can direct stem cell differentiation [Kaivosoja et al., 2011] [Fu et al., 2011] [Lutolf et al., 2009]. Despite the fact that ceramics are the most widely used biomaterials for bone, polymers are promising for tissue regeneration thanks to their similarities with the extracellular matrix, chemical versatility, biological performance, inherent cellular interactions. This provides an innovative platform influencing cell differentiation, including bone cell differentiation.

In this study, we demonstrate that a biocompatible and biodegradable natural scaffold composed of pullulan and dextran offers a suitable 3D microenvironment, designed here to drive osteoblastic differentiation of human MSCs from adipose tissue without an osteogenic differentiation medium. Although the static culture configuration of this new tissue engineered scaffold initiates both early (ALP, Col1A1) and late osteoblastic markers (OCN) involved in bone matrix mineralization, the fate of these human MSCs is greatly oriented to osteoblastic lineage when this cellularized porous scaffold is submitted to dynamic culture thanks to cell-to-cell contact in aggregate conformation.

We used a macroporous matrix with an interconnected porosity of 60 % and pore size between 40 and 200 μm . The porosity allows cell colonization while preserving the mechanical properties of the scaffold. Based on the literature, the minimum requirement for pore size is considered to be approximately 100 μm , due to cell size, cell migration and metabolite transport. In addition, high porosity may promote osteogenesis due to the larger surface area, resulting in higher nutrient and gas exchange, especially under dynamic culture conditions [Karageorgiou and Kaplan, 2005] [Holtorf et al., 2006]. The versatility of this matrix in terms of porosity and composition offers a great potential for numerous tissue engineering applications. Functionalization with proteins, including growth and osteoinductive factors or with calcium phosphate components, constitutes an alternative to modify its properties for bone tissue regeneration. All our results validate this polysaccharide-based porous scaffold as a new construct for inducing osteoblastic differentiation of MSCs for bone tissue engineering, without the need for exogenous biochemical stimuli in the culture medium or for functionalization of the 3D matrix.

This effect on osteoblastic differentiation of ADSCs could be due to the cell distribution inside the matrix. Human ADSCs were organized in the 3D matrix in multicellular aggregates within the large pores. This process occurred during the first eight hours of culture and remained for at least two months thereafter. Cell viability as assessed over 70 days revealed that these multicellular aggregates exhibited high survival and metabolic activity.

According to the literature, cell morphology and cell function are strongly linked [Kumar et al., 2011]. For many years, cell spreading of MSCs into the scaffold and cell/matrix interactions were a prerequisite for driving intracellular signals through integrin activities in order to induce osteoblast differentiation. The concept of spheroids or multicellular aggregates and their role for cell differentiation developed once cell to cell communication was identified as a key factor for cell differentiation and extracellular matrix production. Moreover, the formation of these cell aggregates inside a 3D structure for tissue regeneration has received some attention [Saleh and Genever, 2011] [Foty, 2011] [Frohlich et al., 2010] [Burns et al., 2010]. This spheroid configuration may promote interactions between cells by way of cellular junctional proteins (cadherins and connexins), thereby promoting osteogenic differentiation and stimulating the production of a mineralized matrix. This was observed with mesenchymal stem cells [Burns et al., 2010] [Frohlich et al., 2010] and embryonic stem cells [Handschel et al., 2011] [Gothard et al., 2010]. In this context, Cx43, a gap junctional protein that appeared to be a critical parameter regarding osteoblastic differentiation of

mesenchymal stem cells in 2D conventional structures [Civitelli, 2008] [Guillotin et al., 2004] [Villars et al., 2002], probably plays a major role in osteoblastic differentiation of hADSCs in this new 3D matrix. The massive increase in Cx43 mRNA level in human ADSCs cultured in these 3D matrices under dynamic cultures correlates with the osteoblastic differentiation markers (ALP, OPN and OCN) to support this hypothesis. Moreover, in comparison with 2D cultures, 3D cultures of human ADSCs represent an innovative tool for establishing physiologically oriented *in vitro* models for osteogenesis. The expression level of osteoblastic markers (ALP, OCN) remained higher after 15 days of culture than in 2D cultures, even when cells were not activated by β -glycerophosphate, ascorbic acid or growth factors. Therefore, human stem cells grown in 3D scaffolds could display tissue development patterns distinct from their 2D counterparts, which do not reproduce the complexity of a tissue [Di Maggio et al., 2011].

The direct osteogenic differentiation of ADSCs seeded on a scaffold is one of the key issues determining the success of bone regeneration leading to clinical applications [Müller et al., 2010]. Our results show that after seven days of culture, the polysaccharide-based scaffold initiates the expression of both early (ALP, Col1A1) and late osteoblastic markers (OCN) involved in the mineralization matrix. Calcium deposition in the matrix observed in the absence of β -glycerophosphate and ascorbic acid confirmed the mineralization of the ECM. In such a scaffold, the increased expression of Col1A1 after one week of culture provides a structural framework for inorganic deposition and constitutes a major determinant of the biomechanical strength of bone tissue [Liu et al., 2008]. Osteocalcin is also an established indicator of osteogenic differentiation and is synthesized only by mature osteoblasts to bind both collagen and calcium in the ECM of bone tissue. The expression profiles of these osteogenic markers are in agreement with other reports describing osteogenic differentiation of 3D cultured ADSCs in several bone substitutes [Vergroesen et al., 2011] [Marino et al., 2010] [Liu et al., 2008]. Indeed, those data were obtained after addition of osteogenic factors in the culture medium, such as dexamethasone, β -glycerophosphate, ascorbic acid or bone morphogenetic proteins which stimulate cell bone differentiation, whatever the osteoblastic cell type and scaffold used [Lu et al., 2011] [Kang et al., 2011] [Ryu et al., 2011] [Marino et al., 2010] [Leong et al., 2008] [Liu et al., 2008]. In contrast, the osteoblastic differentiation of human ADSCs in our scaffold was initiated without adding osteogenic factors.

Besides these biochemical stimuli which could influence the fate of mesenchymal stem cells, it is widely recognized that mechanical stimulation of tissue-engineered scaffolds, including shear stress, can enhance osteogenic differentiation and stimulate new bone matrix deposition within a 3D scaffold [Brindley et al., 2011] [Yeatts and Fisher, 2011] [McCoy and O'Brien, 2010]. Physical cues can be provided by other cells or matrix components and be passive in nature, or may result from applied forces through the use of specific bioreactors. Numerous publications address the question of whether bioreactors used to create bone grafts have the potential to be implemented in clinical approaches for bone repair and regeneration [Yeatts and Fisher, 2011] [Salter et al., 2011] [Naing and Williams, 2011]. Recently, Salter *et al.* assessed the usefulness of bioreactor-based approaches for extended *in vitro* cultivation of cells in functional bone grafts within a perfused scaffold when set against the cost of the additional cultivation time and the recourse to numerous expensive growth factors [Salter et al., 2011].

The macroporous architecture and interconnected pores of the scaffold allow cultivation under dynamic culture conditions using a new device especially developed for this matrix [Knapp et al., 2011]. It has been previously shown that, by creating a pulsatile flow perfusion through a three-

dimensional scaffold, some bioreactors could improve cell seeding efficiency, cell viability, cell functionality and *in vivo* engraftment [Yeatts and Fisher, 2011] [Rauh et al., 2011] [Papadimitropoulos et al., 2011] [Du et al., 2009] [Holtorf et al., 2006] [Sikavitsas et al., 2005] [Cartmell et al., 2003]. For polysaccharide-based scaffolds, the challenges to ensure such perfusion are numerous and cannot be solved by traditional rotating wall or direct perfusion bioreactors, which have been considered until now as the reference systems for such tissue engineering [Martin et al., 2004]. The main specification of the bioreactor here is to provide a culture environment for a large number of soft scaffolds through which pulsatile flow perfusion should take place. Indeed, a large number of scaffolds can be cultured simultaneously in rotating wall bioreactors in which scaffolds are freely suspended. In such systems, scaffolds can be perfused since they exhibit porosity. However, such bioreactors are difficult to drive at typical biomimetic 1Hz frequencies because of the mechanical inertia of the rotating walls and fluid. Moreover, the simultaneous culture of many scaffolds usually clamped in frame can be envisaged but is difficult to implement. Our novel patented bioreactor system takes advantage of both standards by using the sustentation of porous soft scaffolds within a controlled pulsatile vertical flow environment. The differential pressure between the upper and lower faces of the scaffolds results from the balance between apparent weight and viscous forces and ensures the perfusion of the scaffolds. Because of the shape of the pulsatile velocity profiles generated in the culture chamber, the scaffold position and orientation vary slowly over time. Wall contacts are limited and random reversal of the scaffolds is observed.

To date, few studies have been conducted to assess the impact of mechanical forces on human stem cell populations [Bjerre et al., 2011] [Papadimitropoulos et al., 2011] [Grayson et al., 2011]. Here, we analyzed the impact of flow perfusion on human adipose-derived stem cell survival and differentiation capacity *in vitro* once loaded into the polysaccharide-based scaffold. Our data show that multicellular aggregates remained in dynamic culture conditions and exhibited better survival in comparison with static culture conditions, especially inside the aggregates in the center of the scaffold. In addition, the 3D dynamic culture induces the massive expression of ALP and late osteoblastic marker (OPN and OCN) in comparison with static culture conditions. Furthermore, only 5 days were necessary to activate cell signaling and promote osteoblastic differentiation in basal culture medium. Ban *et al.* [Ban et al., 2011] showed that the response of osteoblasts to low fluid shear stress (1ml/min which is about 1 dyne/cm²) is time-dependent, and they demonstrated the role of continuous flow perfusion for initiating osteoblast activity compared with intermittent flow perfusion [Ban et al., 2011]. They used differentiated osteoblastic cells and cultured them in 3D for 4, 8 and 12 days before analysis. Here, we used undifferentiated ADSCs cultured for 5 days under pulsatile flow perfusion in basal culture medium at a fluid flow rate of only 6×10^{-4} mL/min which is about 5×10^{-5} Pa, a very low flow rate compared to those used in the literature for inducing osteogenic differentiation [Ban et al., 2011] [Bancroft et al., 2002] but in the range of those used in other studies [Cartmell et al., 2003]. This mode of cultivation appears very efficient for enhancing the expression of osteogenic genes and increasing cell-cell interactions. This hypothesis is supported by the high expression of Cx43 in dynamic conditions compared to static ones. Cx43 is one of the components of gap junctions that allows cell-to-cell communications and is known to stimulate osteoblastic differentiation of stem cells [Civitelli, 2008] [Villars et al., 2002] [Niger et al., 2008]. This very low fluid flow might thus activate intercellular junctional activities and subsequent intracellular pathways.

Taken together, these results show that this biodegradable porous scaffold allows osteoblastic differentiation of ADSCs in a basic culture medium under static culture conditions. The dynamic

cultures in our innovative perfusion bioreactor greatly enhanced this differentiation. ADSCs colonize the porous scaffold homogeneously and form during the first eight hours of culture numerous aggregates of living cells, which express both early and late osteoblastic markers within one week. The exact role of these aggregates and the cell signaling mechanisms activated inside these cell clusters remain to be studied in detail.

In conclusion, this polysaccharide-based scaffold associated with ADSCs cultured under low fluid flow in a bioreactor could be a relevant tissue-engineered construct for cell-based bone tissue engineering applications.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, CNRS, University Bordeaux Segalen, Universities Paris 7 and 13, University of Marseille, by the “Délégation Générale de l’Armement” (DGA), and by grants from the French National Research Agency (ANR-07-TecSan-011-01 ITOV; ANR-09-EBIO-001 3D Cell). Thanks to ICELTIS (Toulouse, France) for providing human adipose-derived stromal cells, ABCELLBIO (France) for providing cell culture medium and I. Svahn and C. Poujol (BIC University Bordeaux 2, France) for ESEM and time lapse analyses. Thanks to Patrick Guitton for technical support and to R. Cooke for editing the manuscript.

References

- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. 2008. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 14:199-215.
- Akman AC, Seda Tigli R, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. 2010. Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells. *Artif Organs* 34:65-74.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 6:623-33.
- Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. 2007. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A* 82:336-42.
- Ban Y, Wu YY, Yu T, Geng N, Wang YY, Liu XG, Gong P. 2011. Response of osteoblasts to low fluid shear stress is time dependent. *Tissue Cell* 43:311-7.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12600-5.
- Bjerre L, Bunger C, Baatrup A, Kassem M, Mygind T. 2011. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on coralline hydroxyapatite scaffolds with various pore sizes. *J Biomed Mater Res A* 97:251-63.
- Brindley D, Moorthy K, Lee JH, Mason C, Kim HW, Wall I. 2011. Bioprocess forces and their impact on cell behavior: implications for bone regeneration therapy. *J Tissue Eng* 2011:620247.
- Bueno EM, Glowacki J. 2009. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration *Nature reviews, Rheumatology* 5:685-697.
- Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45:115-20.
- Burns JS, Rasmussen PL, Larsen KH, Schroder HD, Kassem M. 2010. Parameters in three-dimensional osteospheroids of telomerized human mesenchymal (stromal) stem cells grown on

- osteoconductive scaffolds that predict *in vitro* bone-forming potential. *Tissue Eng Part A* 16:2331-42.
- Carpentier B, Layrolle P, Legallais C. 2011. Bioreactors for bone tissue engineering. *Int J Artif Organs* 34:259-70.
- Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldberg RE. 2003. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs *in vitro*. *Tissue Eng* 9:1197-203.
- Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. 2010. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2010:215625.
- Chesnutt BM, Yuan Y, Buddington K, Haggard WO, Bumgardner JD. 2009. Composite Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Osteocalcin Production by Osteoblasts *In vitro* and Support Bone Formation *In vitro*. *Tissue Eng Part A*.
- Civitelli R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473:188-92.
- Costa-Pinto AR, Correlo VM, Sol PC, Bhattacharya M, Charbord P, Delorme B, Reis RL, Neves NM. 2009. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on melt based chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 10:2067-73.
- Costa-Pinto AR, Correlo VM, Sol PC, Bhattacharya M, Srouji S, Livne E, Reis RL, Neves NM. 2011. Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Des Rieux A, Ucar B, Mupendwa BP, Colau D, Feron O, Carmeliet P, Preat V. 2011. 3D systems delivering VEGF to promote angiogenesis for tissue engineering. *J Control Release* 150:272-8.
- Di Maggio N, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. 2011. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* 32:321-9.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. 2011. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 9:66.
- Du D, Furukawa KS, Ushida T. 2009. 3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 102:1670-8.
- Dutta RC, Dutta AK. 2009. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv*.
- Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golezorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I, DiMuzio PJ. 2009. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 152:157-66.
- Foty R. 2011. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*.
- Frohlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble JM, Kregar-Velikonja N, Vunjak-Novakovic G. 2010. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Eng Part A* 16:179-89.
- Fu RH, Wang YC, Liu SP, Huang CM, Kang YH, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. 2011. Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplant* 20:37-47.
- Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. 2010. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)* 5:469-84.
- Gimble J, Guilak F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy* 5:362-9.

- Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. 2010. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 20:218-30.
- Gothard D, Roberts SJ, Shakesheff KM, Bittery LD. 2010. Engineering embryonic stem-cell aggregation allows an enhanced osteogenic differentiation *in vitro*. *Tissue Eng Part C Methods* 16:583-95.
- Granja PL, De Jeso B, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Barbosa MA. 2005. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels induced by human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater* 10:31-7; discussion 37-9.
- Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Vunjak-Novakovic G. 2011. Bioreactor cultivation of functional bone grafts. *Methods Mol Biol* 698:231-41.
- Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amedee J, Barbosa MA. 2009. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 30:3271-8.
- Griffin M, Iqbal SA, Bayat A. 2011. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br* 93:427-34.
- Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amedee-Vilamitjana J. 2004. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 14:325-32.
- Gunatillake PA, Adhikari R. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 5:1-16; discussion 16.
- Handschel J, Naujoks C, Depprich R, Lammers L, Kubler N, Meyer U, Wiesmann HP. 2011. Embryonic stem cells in scaffold-free three-dimensional cell culture: osteogenic differentiation and bone generation. *Head Face Med* 7:12.
- Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, Hemmi H, Hayata T, Nakashima K, Ezura Y, Amagasa T, Akiyoshi K, Noda M. 2009. Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. *J Cell Physiol* 220:1-7.
- Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. 2008. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 82:238-47.
- Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. 2006. Modulation of cell differentiation in bone tissue engineering constructs cultured in a bioreactor. *Adv Exp Med Biol* 585:225-41.
- Jones E, Yang X. 2011. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 42:562-8.
- Kachgal S, Putnam AJ. 2011. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis* 14:47-59.
- Kaivosoja E, Barreto G, Levon K, Virtanen S, Ainola M, Konttinen YT. 2011. Chemical and physical properties of regenerative medicine materials controlling stem cell fate. *Ann Med*.
- Kang SW, Kim JS, Park KS, Cha BH, Shim JH, Kim JY, Cho DW, Rhie JW, Lee SH. 2011. Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration. *Bone* 48:298-306.
- Karageorgiou V, Kaplan D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-91.

- Keogh MB, FJ OB, Daly JS. 2010a. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis-applications for bone tissue engineering. *Cell Tissue Res* 340:169-77.
- Keogh MB, O'Brien FJ, Daly JS. 2010b. Substrate stiffness and contractile behaviour modulate the functional maturation of osteoblasts on a collagen-GAG scaffold. *Acta Biomater* 6:4305-13.
- Knapp Y, Bertrand E, Deplano V. 2011. Bioréacteur Conique pulsatoire. Déclaration d'Invention référencée DI 03999-01, dépôt de brevet en cours avec la filiale de valorisation du CNRS (FIST) et le cabinet Plasseraud, Lyon.
- Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, Young MF, Simon CG, Jr. 2011. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials*.
- Landegren U. 1984. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 67:379-88.
- Le Visage C, Letourneur D. 2009a. Method for preparing porous scaffold for tissue engineering, cell culture and cell delivery. International patent number 047346 A1.
- Le Visage C, Chaubet F, Autissier A, Letourneur D. 2009b. Method for preparing porous scaffold for tissue engineering. International patent number 047347 A1.
- Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW, Woodruff MA. 2008. The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in a 3D scaffold/matrix environment. *Curr Drug Discov Technol* 5:319-27.
- Lew KS, Othman R, Ishikawa K, Yeoh FY. 2011. Macroporous Bioceramics: a Remarkable Material for Bone Regeneration. *J Biomater Appl*.
- Li Z, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang M. 2010. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials* 31:404-12.
- Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. 2011. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury* 42:569-73.
- Lin ZY, Duan ZX, Guo XD, Li JF, Lu HW, Zheng QX, Quan DP, Yang SH. Bone induction by biomimetic PLGA-(PEG-ASP)_n copolymer loaded with a novel synthetic BMP-2-related peptide *in vitro* and *in vivo*. *J Control Release* 144:190-5.
- Liu Q, Cen L, Yin S, Chen L, Liu G, Chang J, Cui L. 2008. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials* 29:4792-9.
- Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng Z, Jin Y. 2011. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A* 17:725-39.
- Liu X, Ma PX. 2004. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 32:477-86.
- Lu Z, Roohani-Esfahani SI, Wang G, Zreiqat H. 2011. Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine*.
- Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. 2009. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 462:433-41.
- Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, Barbarisi A. 2010. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: *in vitro* study. *J Mater Sci Mater Med* 21:353-63.

- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22:80-6.
- McCoy RJ, O'Brien FJ. 2010. Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review. *Tissue Eng Part B Rev* 16:587-601.
- McCullen SD, Ramaswamy S, Clarke LI, Gorga RE. 2009. Nanofibrous composites for tissue engineering applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1:369-90.
- Müller AM, Mehrkens A, Schafer DJ, Jaquiere C, Guven S, Lehmicke M, Martinetti R, Farhadi I, Jakob M, Scherberich A, Martin I. 2010. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater* 19:127-35.
- Naing MW, Williams DJ. 2011. Three-dimensional culture and bioreactors for cellular therapies. *Cytotherapy* 13:391-9.
- Neofytou EA, Chang E, Patlola B, Joubert LM, Rajadas J, Gambhir SS, Cheng Z, Robbins RC, Beygui RE. 2011. Adipose tissue-derived stem cells display a proangiogenic phenotype on 3D scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 98:383-93.
- Niger C, Geneau G, Fiorini C, Defamie N, Pointis G, Mesnil M, Cronier L. 2008. Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation: influence of connexin-43 expression level. *J Cell Biochem* 103:110-22.
- Papadimitropoulos A, Scherberich A, Guven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F, Scheffler K, Zallone A, Martin I. 2011. A 3D *in vitro* bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 21:445-58; discussion 458.
- Park JB. 2011. The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16:e115-8.
- Pennesi G, Scaglione S, Giannoni P, Quarto R. 2011. Regulatory influence of scaffolds on cell behavior: how cells decode biomaterials. *Curr Pharm Biotechnol* 12:151-9.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.
- Poirier-Quinot M, Frasca G, Wilhelm C, Luciani N, Ginefri JC, Darrasse L, Letourneur D, Le Visage C, Gazeau F. 2010. High-resolution 1.5-Tesla magnetic resonance imaging for tissue-engineered constructs: a noninvasive tool to assess three-dimensional scaffold architecture and cell seeding. *Tissue Eng Part C Methods* 16:185-200.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118-29.
- Rajam M, Pulavendran S, Rose C, Mandal AB. 2011. Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications. *Int J Pharm* 410:145-52.
- Rauh J, Milan F, Gunther KP, Stiehler M. 2011. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 17:263-80.
- Ravindran S, Gao Q, Kotecha M, Magin R, Karol S, Bedran-Russo A, George A. 2011. Biomimetic ECM Incorporated Scaffold Induces Osteogenic Gene Expression in Human Marrow Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*.

- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. 2001. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19:1029-34.
- Robert D, Fayol D, Le Visage C, Frasca G, Brule S, Menager C, Gazeau F, Letourneur D, Wilhelm C. 2010. Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells. *Biomaterials* 31:1586-95.
- Ryu YM, Hah YS, Park BW, Kim DR, Roh GS, Kim JR, Kim UK, Rho GJ, Maeng GH, Byun JH. 2011. Osteogenic differentiation of human periosteal-derived cells in a three-dimensional collagen scaffold. *Mol Biol Rep* 38:2887-94.
- Saleh FA, Genever PG. 2011. Turning round: multipotent stromal cells, a three-dimensional revolution? *Cytotherapy* 13:903-12.
- Salter EK, Goh BC, Hung BP, Hutton DL, Ghone NV, Grayson WL. 2011. Bone Tissue Engineering Bioreactors - A Role in the Clinic? *Tissue Eng Part B Rev*.
- Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 5:062001.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. 2005. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 33:63-70.
- Thébaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. 2007. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 18:339-45.
- Tigli RS, Akman AC, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. 2009. *In vitro* release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 20:1899-914.
- Van Blitterswijk C. 2008. Tissue engineering. Academic press series in biomedical engineering.
- Vergroesen PP, Kroeze RJ, Helder MN, Smit TH. 2011. The use of poly(L-lactide-co-caprolactone) as a scaffold for adipose stem cells in bone tissue engineering: application in a spinal fusion model. *Macromol Biosci* 11:722-30.
- Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. 2002. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C775-85.
- Yeatts AB, Fisher JP. 2011. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48:171-81.
- Yu NY, Schindeler A, Little DG, Ruys AJ. 2010. Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93:285-95.
- Zhu M, Kohan E, Bradley J, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. 2009. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Zippel N, Schulze M, Tobiasch E. 2010. Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent Pat Biotechnol* 4:1-22.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-95.

Figures and legends

Table 1: Primary antibodies used for immunostaining

<u>Primary antibodies</u>	<u>Clone/reference</u>	<u>Source</u>	<u>Dilution</u>
Anti-pro collagen-1 Type I C-peptide (PIP)	Takara PC5-5	Mouse monoclonal	1:500
Anti-OPN (AKm2A1)	Santa Cruz sc-21742	Mouse monoclonal	1:100
Anti-OCN	Takara OCG2	Mouse monoclonal	1:100

Table 2: Primer sequences used in Q-PCR

<u>Gene</u>	<u>Primers sequences</u>	<u>TM (°C)</u>	<u>GenBank</u>
P0	forward 5' ATG CCC AGG GAA GAC AGG GC 3' reverse 5' CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC 3'	65	<u>BC015690</u>
ALP	forward 5' AGC CCT TCA CTG CCA TCC TGT 3' reverse 5' ATT CTC TCG TTC ACC GCC CAC 3'	65	<u>BC021289</u>
Col1A1	forward 5' GGA ATG AGG AGA CTG GCA ACC 3' reverse 5' TCA GCA CCA CCG ATG TCC AAA 3'	65	<u>NM000089</u>
OCN	forward 5' ACC ACA TCG GCT TTC AGG AGG 3' reverse 5' GGG CAA GGG CAA GGG GAA GAG 3'	65	<u>NM 199173</u>
OPN	forward 5' TGG ATG ACC AGA GTG CTG AAA 3' reverse 5' ATC TTC TTC CTT ACT TTT GGG 3'	58	<u>BC007016</u>
Cx43	forward 5' GGG CGT TAA GGA TCG GGT TAA GG 3' reverse 5' GTT GGT GAG GAG CAG CCA TTG AA 3'	65	<u>NM000165</u>

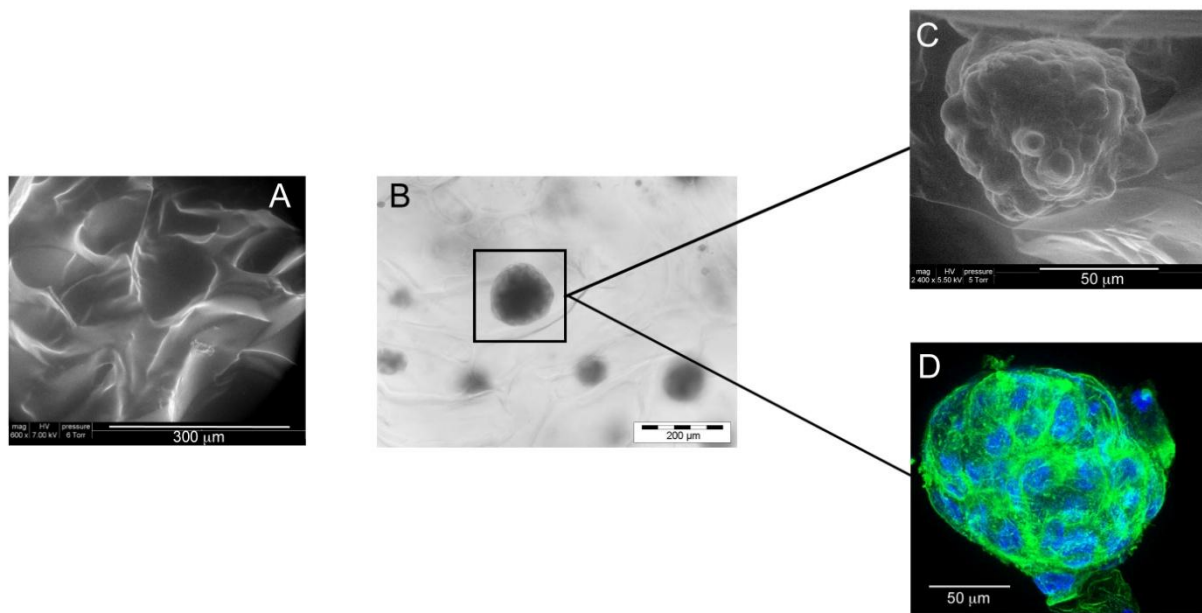


Figure 1: 3D porous polysaccharide-based scaffold after 24 hours of culture in basal medium. A) ESEM observation of the hydrated porous scaffold without cells (magnification x600). Scale bar: 300 μm . B) Optical microscopy observation of cell clusters inside the matrix (objective x10). Scale bar: 200 μm . C) ESEM observation of a cell aggregate in a hydrated construct (magnification x2400). Scale bar: 50 μm . D) Actin/phalloidin (green) and DAPI staining (blue) of cells in a cluster (objective x40). Scale bar: 50 μm .

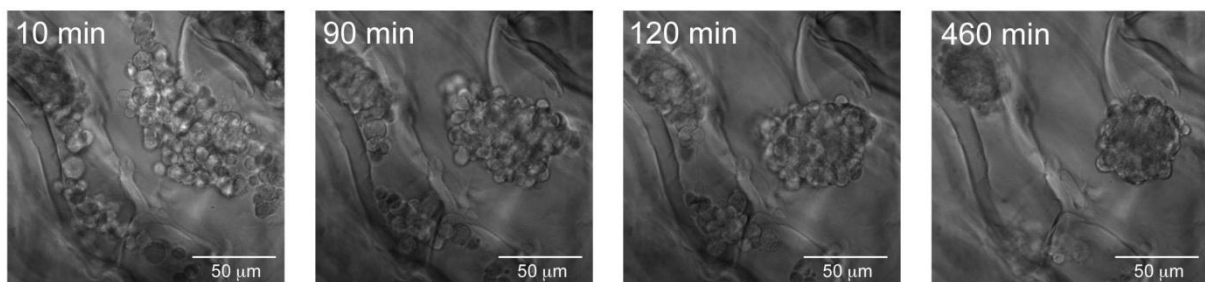


Figure 2: Analyses of cell behaviour inside the matrix after seeding in basal medium. Time lapse videomicroscopy recorded during the first 8 hours after seeding of ADSCs inside the scaffolds. Images show cells at 10, 90, 120 and 460 minutes after seeding (objective x20). Scale bars: 50 μm .

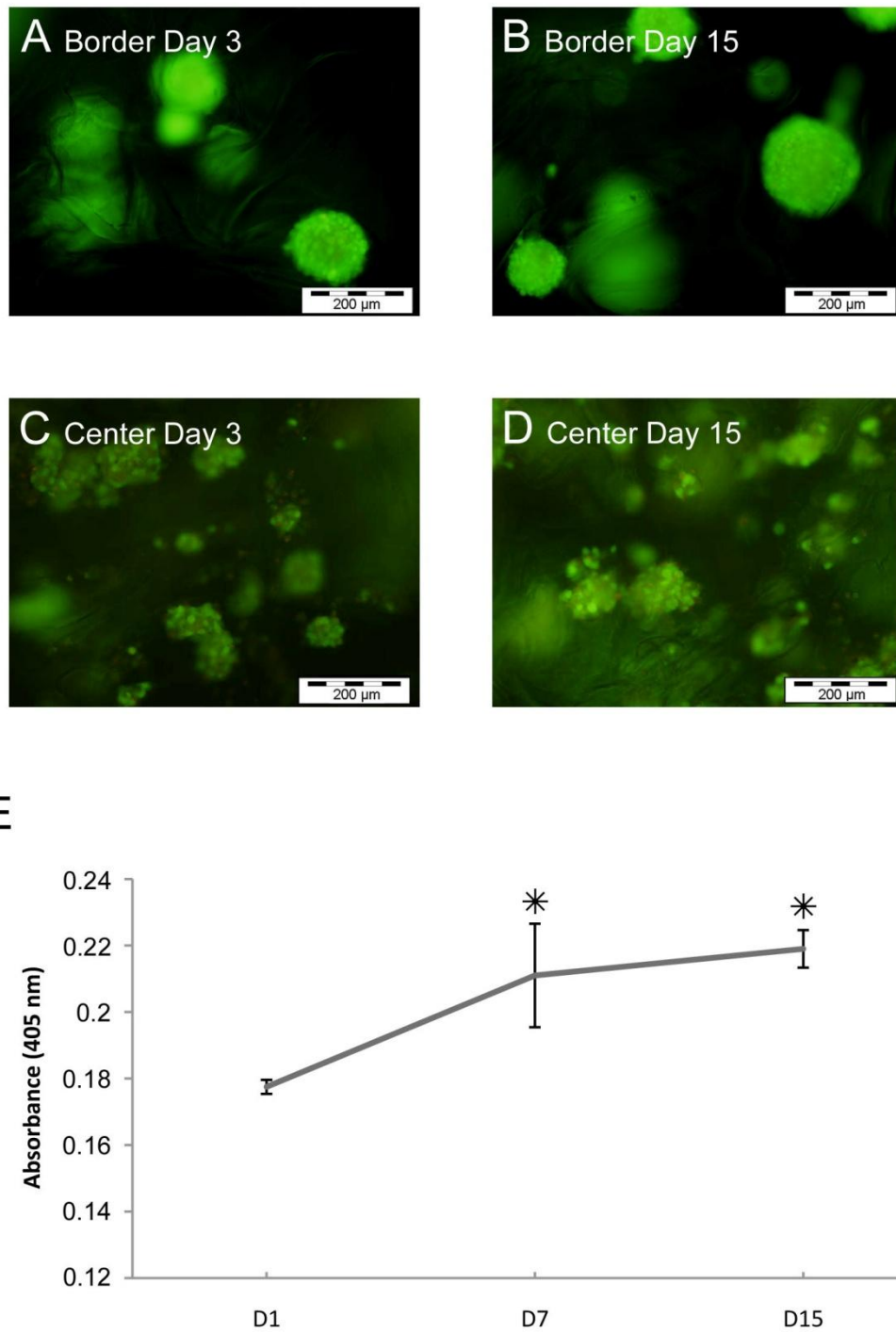


Figure 3: Cell viability and metabolic activity in 3D scaffold in basal medium. Cell viability was revealed by live/dead staining of ADSCs on the edges of the scaffold (A, B) or in the center (C, D) at day 3 (A, C) and 15 (B, D) (objective x10). Scale bar: 200 μm E) Metabolic activity of 3D seeded cells was assessed by hexosaminidase activity assay at day 1, 7 and 15 (n=4).

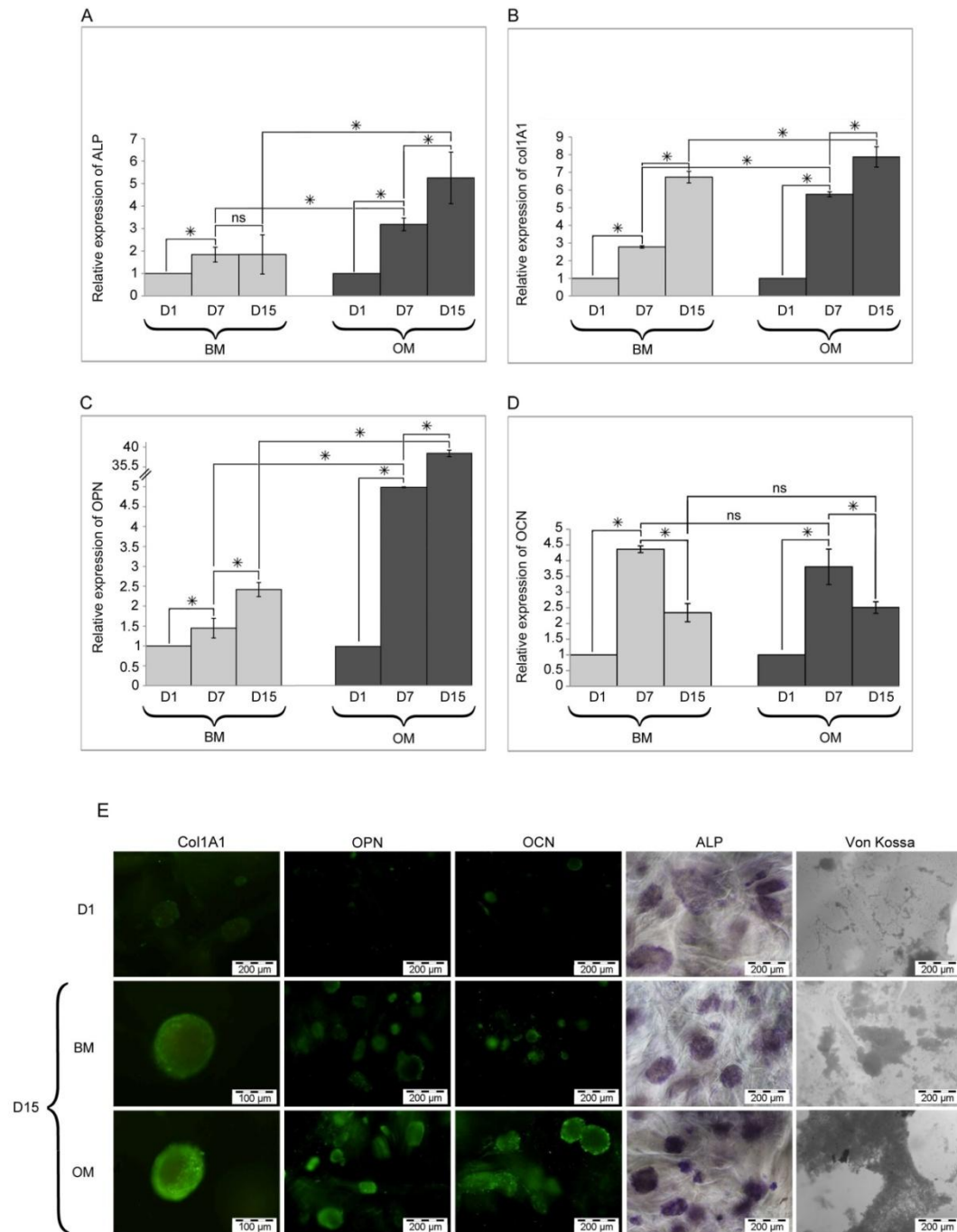


Figure 4: Osteogenic differentiation of ADSCs cultured in 3D over time. Relative expression of mRNA levels of bone-specific markers ALP (A), Col1A1 (B), OPN (C) and OPN (D) in 3D ADSCs after 1, 7 and 15 days of culture in basal medium (BM) or in osteoinductive medium (OM). Data were quantified relative to ALP, Col1A1 and OPN gene expression of hADSCs after 1 day of culture standardized to 1, (n=3 or 4). E) Immunostaining of bone specific markers (Col1A1, OPN, OCN), ALP and Von Kossa staining in 3D cells after 1 or 15 days of culture in basal or in osteoinductive medium (objective x10 and x20). Scale bars: 200 and 100 μ m.

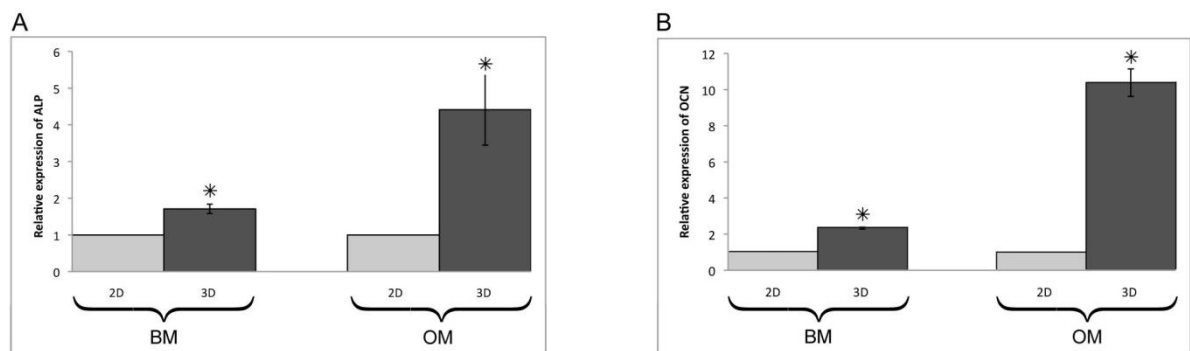


Figure 5: Osteogenic differentiation of 3D cultured cells versus 2D ones. Relative expression of mRNA levels of bone specific markers ALP (A) and OCN (B) in 3D and 2D ADSCs after 15 days of culture in basal medium (BM) or in osteoinductive medium (OM). 2D = dishes cultures; 3D = polysaccharide-based scaffold. Data were quantified relative to ALP and OCN gene expression of hADSCs cultured in 2D at day 15 normalized to 1 (n=3 or 4).

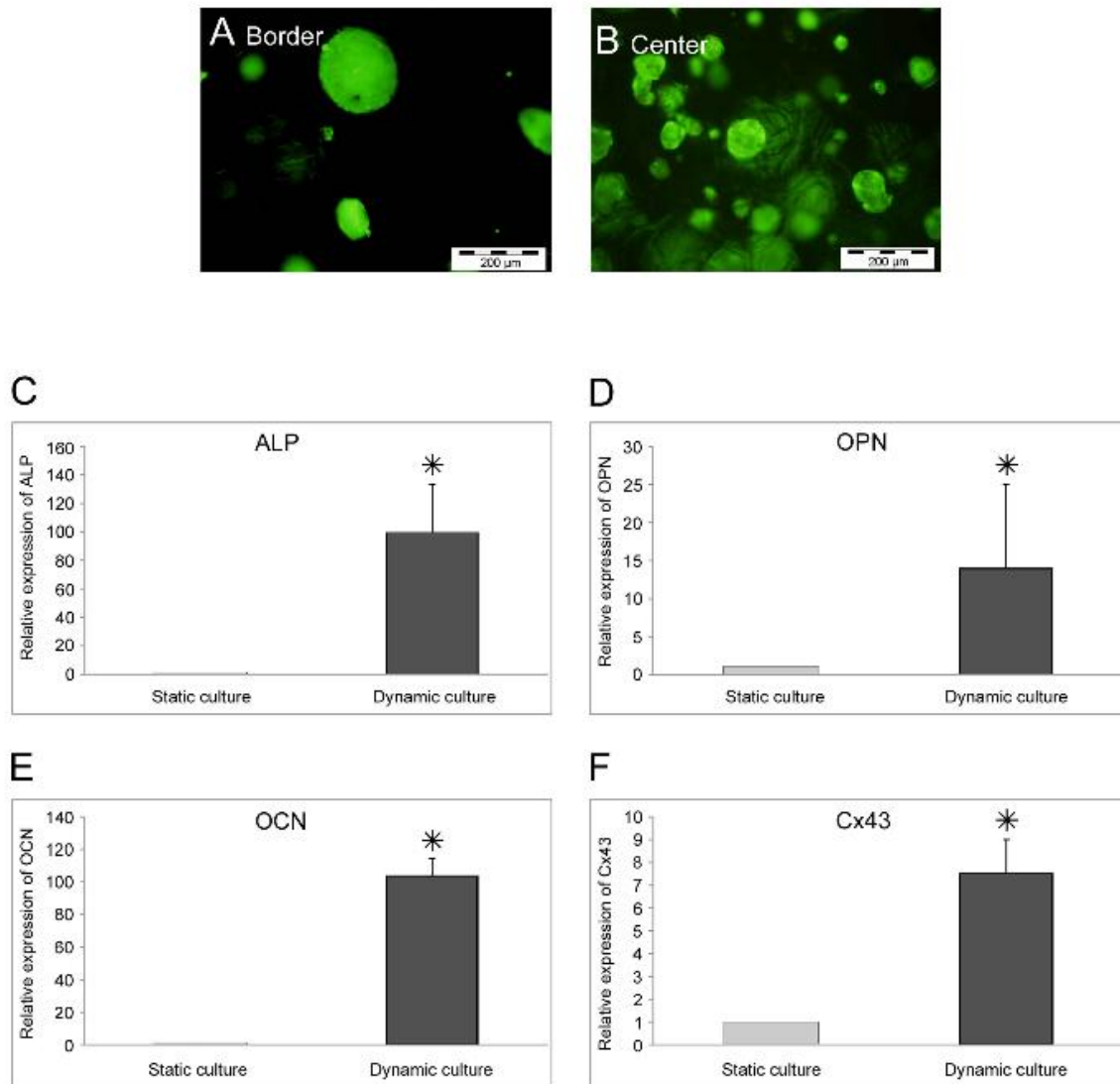


Figure 6: Viability assessment and osteogenic differentiation of cells cultured in 3D static or dynamic conditions. Cell viability was revealed by live/dead staining of ADSCs inside the matrix after 5 days of dynamic culture in basal medium on the edges of the scaffold (A) or in the center (B) (objective x10). Scale bar: 200 μ m. Relative expression of mRNA levels of bone-specific markers ALP (C), OPN (D), OCN (E) and Cx43 (F) in 3D cells after 5 days of static or dynamic culture in basal medium. Data was quantified relative to ALP, OPN, OCN and Cx43 gene expression of hADSCs cultured in static conditions normalized to 1 (n=2).

C. Conclusion

Dans ce travail, les cellules mésenchymateuses issues du tissu adipeux humain ont été associées à une matrice macroporeuse synthétisée à partir de polysaccharides naturels, le dextrane et le pullulane. Le but de cette étude était d'analyser la différenciation ostéoblastiques des ADSCs au sein de la matrice tridimensionnelle en condition statique et dynamique et en l'absence de facteurs ostéoinducteurs.

Cette matrice de polymères présente une porosité permettant une colonisation cellulaire homogène dans tout le matériau. Après ensemencement, les ADSCs envahissent toute la structure, migrent et forment des agrégats multicellulaires intégrés dans les pores de la matrice et présentent une viabilité et une activité métabolique importante, pendant les 15 jours de culture. Nos résultats montrent que cette matrice offre un environnement tridimensionnel capable d'orienter la différenciation des ADSCs vers la voie ostéogénique sans adjonction de facteurs ostéoinducteurs au milieu de culture. De façon plus précise, quel que soit le milieu de culture utilisé, la culture tridimensionnelle stimule l'expression des marqueurs ostéoblastiques par rapport à une culture bidimensionnelle. Après 15 jours de culture, les cellules cultivées en trois dimensions sont capables d'exprimer les marqueurs osseux spécifiques précoces (PAL, Col1A1) ou tardifs (OCN, OPN) et présentent une minéralisation de la matrice extracellulaire, même en absence de facteurs ostéoinducteurs. Enfin, cette différenciation est augmentée de façon très importante après seulement 5 jours de culture en conditions dynamiques au sein d'un bioréacteur, en absence de tous facteurs ostéogènes, à une vitesse de flux extrêmement faible.

L'effet du matériau sur la différenciation ostéogénique des ADSCs pourrait être dû à la conformation que les cellules adoptent lorsqu'elles sont hébergées dans cette matrice 3D sous forme de sphéroïdes. Depuis des années, l'adhérence et l'étalement cellulaire était un pré-requis nécessaire à l'établissement de signaux cellulaires, *via* l'activité des intégrines, initiant un processus de différenciation ostéoblastique. Or, depuis peu, le concept d'agrégats composés de plusieurs cellules semble être recherché et prometteur. En effet, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, la communication intercellulaire a montré son importance dans la différenciation cellulaire et la production de matrice extracellulaire et de nombreuses études soulignent l'intérêt de cette conformation cellulaire au sein de structure tridimensionnelles pour la régénération tissulaire [Saleh and Genever, 2011] [Foty, 2011] [Frohlich et al., 2010] [Burns et al., 2010]. Cet assemblage favorise les contacts entre cellules *via* des protéines jonctionnelles (cadhérines et connexines) stimulant la différenciation ostéogénique et la production de matrice extracellulaire minéralisée [Frohlich et al., 2010] [Burns et al., 2010] [Gothard et al., 2010]. Dans ce contexte, la connexine 43, protéine constituant les jonctions communicantes, connue pour stimuler la différenciation ostéoblastique en deux dimensions, semble également jouer un rôle essentiel au sein de cette matrice 3D. Les résultats montrant une augmentation importante de l'expression de cette protéine par les ADSCs cultivées en 3D en conditions dynamiques, associées à une expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique pourraient supporter cette hypothèse.

L'orientation ostéogénique des cellules préalable à l'implantation, semble être un pré-requis pour le succès de la régénération osseuse *in vivo* et les applications cliniques [Müller et al., 2010]. Si de nombreuses publications font état de l'induction ostéoblastique au sein de biomatériau, c'est

toujours en présence de facteurs ostéogènes tels que la dexaméthasone, le β -glycérophosphate, l'acide ascorbique ou encore les BMPs [Lu et al., 2011] [Ryu et al., 2011] [Kang et al., 2011] [Marino et al., 2010] [Leong et al., 2008] [Liu et al., 2008]. Dans notre étude, la stimulation ostéogénique provient uniquement de l'organisation cellulaire liée à la structure de la matrice de polymères.

L'application d'un stress mécanique permet d'augmenter cette induction ostéoblastique en favorisant la circulation du flux nourricier et les échanges intercellulaires. En effet, dans ces conditions, nos résultats montrent que les agrégats présentent une meilleure survie aussi bien sur les bords qu'au centre du matériau, sensibles au phénomène d'hypoxie en condition statique. De plus, seulement 5 jours de culture en conditions dynamiques en absence de facteurs ostéogènes sont nécessaires pour activer la différenciation ostéoblastique des ADSCs.

En conclusion, ces résultats montrent que la matrice de polysaccharides permet de cultiver les ADSCs et de les engager vers une voie de différenciation ostéoblastique, dans un milieu de culture basal, en conditions statiques, phénomène largement amplifié par la culture en conditions dynamiques au sein d'un bioréacteur à perfusion. La communication cellulaire au cœur des agrégats multicellulaires *via* l'expression de la connexine 43 semble être un des facteurs majeurs de l'induction de cette différenciation. Cependant, le rôle exact de ces agrégats et des mécanismes de signalisation cellulaire impliqués restent encore à démontrer.

Ces PITs sont actuellement en cours d'évaluation chez la souris après implantation en site ectopique, non osseux (sous-cutané), afin de démontrer un potentiel ostéoinducteur, puis, ces mêmes matrices cellularisées seront implantées en site osseux afin de mettre en évidence un processus d'ostéoconduction.



MAGNETIC RESONANCE IMAGING TRACKING OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS WITHIN THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

C. Lalande ^{1,2}, S. Miraux ^{1,3}, S.M. Derkaoui ^{4,5}, S. Mornet ⁶, R. Bareille ^{1,2}, J.C. Fricain ^{1,2}, J.M. Franconi ^{1,3}, C. Le Visage ^{4,5}, D. Letourneur ^{4,5}, J. Amédée ^{1,2} and A.K. Bouzier-Sore ^{1,3}

¹ Université Bordeaux, Bordeaux F33076, France

² INSERM U1026, Tissue Bioengineering, Bordeaux F33076, France

³ RMSB Centre, UMR 5536, CNRS, 33076 Cedex, France

⁴ INSERM, U698, Paris, F-75018, France

⁵ Pres Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75005, France

⁶ CNRS, Université de Bordeaux, ICMCB, 87 Ave Dr A. Schweitzer, 33608 Pessac Cedex, France

II. Etude du suivi longitudinal des ADSCs au sein de la matrice tridimensionnelle de polymères, par imagerie par résonance magnétique

A. Introduction

L'implantation de cellules hébergées dans une matrice 3D chez l'animal soulève de nombreuses questions quant au devenir des cellules après implantation, leur viabilité, leur différenciation ainsi que leur participation et leur implication dans le processus de régénération. Pour ce faire, il est nécessaire de pouvoir les suivre chez l'animal de manière longitudinale et non invasive. De même, le devenir du matériau, la réaction inflammatoire qu'il peut éventuellement engendrer mais aussi sa dégradation qui pourra être corrélée avec une formation osseuse, constituent d'autres paramètres qu'il est nécessaire d'évaluer.

Dans ce cadre, l'imagerie par résonance magnétique est une méthode de choix pour répondre à ces questions et pour le suivi longitudinal des cellules implantées. Il s'agit d'une technique non invasive, non irradiante, qui présente un fort potentiel, en terme de résolution spatiale et temporelle, et permet une observation tridimensionnelle [Poirier-Quinot et al., 2010] [Rogers et al., 2006].

L'IRM est une technique basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la RMN des protons de l'eau contenus dans l'organisme, c'est à dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Les protons de l'organisme (le corps humain est constitué à 70% d'eau) s'alignent dans le même sens que le champ magnétique de l'appareil. Une antenne Radio-Fréquence (RF) émet des ondes à la fréquence de résonance des protons. Ceux-ci entrent alors en résonance. Les protons absorbent une partie de l'énergie des ondes radio et lorsque l'émission de l'antenne s'interrompt, les atomes d'hydrogène reprennent leur position d'équilibre dans le champ magnétique en restituant de l'énergie (suivant deux constantes de temps, les temps de relaxation T1 et T2). Les temps de relaxations « T1 » et « T2 » dépendent de la nature des tissus. C'est à partir de ces différences en fonction des tissus que l'on peut obtenir des images de contraste différent. Ces images sont appelées images pondérées « T1 » ou « T2 ». En IRM, il n'existe pas d'échelle de densité. On parle alors « d'hyper-intensité » ou « d'hypo-intensité » en « T1 » ou en « T2 », défini par rapport à l'aspect d'un tissu quelconque adjacent.

Afin d'être suivies par IRM, les cellules implantées doivent être préalablement marquées à l'aide d'agents de contraste [Rivière et al., 2005] [Bos et al., 2004] [Bulte et al., 2002]. Il existe deux types d'agents de contraste, les agents paramagnétiques ou T1 à base de gadolinium, et les agents T2 ou superparamagnétiques à base de fer. Les agents T2 sont préférentiellement utilisés pour le marquage cellulaire car ils sont biocompatibles et permettent d'obtenir un signal magnétique plus important qu'avec les agents T1 [Hyafil et al., 2006]. Le marquage des cellules mésenchymateuses à l'aide de nanoparticules ferriques permet d'augmenter leur contraste, et permet de les suivre sur plusieurs jours par IRM [Rice et al., 2007] [Bos et al., 2004].

Les agents utilisés dans cette étude sont des nanoparticules à base d'oxyde de fer encapsulées dans une coque de dextran et fonctionnalisées au PEG (PolyEthylèneGlycol) [Duguet et al., 2006] [Mornet

et al., 2005]. Comparés aux autres agents T2 tels que les SPIONs (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticle) ou les MIONs (Monocristalline Iron Oxyde Nanoparticles), ces USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxyde) présentent des liaisons covalentes entre leurs différentes couches permettant d'accroître leur stabilité, faisant de ces nanoparticules des outils intéressants pour le suivi cellulaire *in vivo* par IRM. De plus, ces agents magnétiques sont fonctionnalisés par un fluorochrome permettant une analyse multimodale associant la microscopie à fluorescence à l'IRM. Plusieurs travaux de la littérature présentent le marquage magnétique de cellules mésenchymateuses, mais à notre connaissance, aucune publication ne fait état du marquage des ADSCs humaines à l'aide de nanoparticules ferriques dans un contexte d'ingénierie osseuse.

Le but de cette étude, réalisée en collaboration avec le RMSB (centre de Résonance Magnétique appliquée aux Systèmes Biologiques), a été de réaliser le marquage magnétique des ADSCs par des nanoparticules T2 et de les suivre *in vivo* de manière longitudinale au sein de la matrice de polysaccharides par IRM, après implantation en site sous-cutané chez la souris *nude*.

B. Article 2: Suivi par IRM des ADSCs associées à une matrice polysaccharidique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Abstract

For bone tissue engineering, human Adipose-derived Stem Cells (hADSCs) are proposed to be associated with a scaffold for promoting bone regeneration. After implantation, cellularized scaffolds require a non-invasive method for monitoring their fate *in vivo*. The purpose of this study was to use Magnetic Resonance Imaging (MRI)-based tracking of these cells, labelled with magnetic agents for *in vivo* longitudinal assessment. ADSCs were isolated from human adipose tissue and labelled with USPIO-rhodamine (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide). USPIO internalization, absence of toxicity towards hADSCs, and osteogenic differentiation of the labelled cells were evaluated in standard culture conditions. Labelled cells were then seeded within a 3D porous polysaccharide-based scaffold and imaged *in vitro* using fluorescence microscopy and MRI. Cellularized scaffolds were implanted subcutaneously in *nude* mice and MRI analyses were performed from 1 to 28 days after implantation. *In vitro*, no effect of USPIO labeling on cell viability and osteogenic differentiation was found. USPIO were efficiently internalized by hADSCs and generated a high T2* contrast. *In vivo* MRI revealed that hADSCs remain detectable until 28 days after implantation and could migrate from the scaffold and colonize the area around it. These data suggested that this scaffold might behave as a cell carrier capable of both holding a cell fraction and delivering cells to the site of implantation. In addition, the present findings evidenced that MRI is a reliable technique to validate cell seeding procedures in 3D porous scaffolds, and to assess the fate of hADSCs transplanted *in vivo*.

Keywords: Bone tissue engineering, adipose-derived stromal cells, magnetic resonance imaging, human stem cell magnetic labeling, ultrasmall superparamagnetic iron oxide, 3D porous scaffold.

Introduction

Regeneration of large bone defects represents a major challenge for orthopedic and reconstructive surgeons. Until recently, the use of autologous bone grafts has been the gold standard method for bone repair (Brown and Cruess, 1982). However, the concept of bone tissue engineering has emerged in response to tissue reconstruction problems involved with autologous bone grafts such as lack of donor, donor site morbidity and immune reaction (De Boer, 1988). The concept consists in developing a hybrid substitute that combines the osteogenic potential of autologous cells with a biocompatible three-dimensional scaffold to generate a new bone tissue that must be structurally and functionally similar to the surrounding bone. Such a scaffold is implanted in a bone defect, remodeled *in vivo* and results in newly formed tissue (Frohlich *et al.*, 2008).

Human adult mesenchymal stem cells (MSCs) are an interesting cell source of autologous osteogenic cells thanks to their properties of self-renewal and differentiation towards many lineages (adipogenic, osteogenic, chondrogenic, endothelial, neurogenic) and have a clinical potential for tissue engineering (Hodgkinson *et al.*, 2009; Kwan *et al.*, 2008). For bone regeneration, MSCs from bone marrow aspirates are usually used (Pittenger *et al.*, 1999), but account for only for 0.001% to 0.0001% of total nucleated cells (Fraser *et al.*, 2006). Recently, human Adipose-derived Stem Cells (hADSCs) have been described as an alternative source with easier accessibility, higher abundance and osteogenic differentiation potential (Gimble *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2004), making them

attractive for bone tissue engineering and clinical applications (Dudas *et al.*, 2006; Kakudo *et al.*, 2008).

In the context of tissue engineering, cells must be associated with a biocompatible scaffold able to carry and deliver them *in vivo* (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005). These scaffolds should create a 3D environment suitable for allowing cell expansion, osteogenic differentiation, extracellular matrix production and, ultimately, supporting tissue reconstruction (Jeon *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2008). Numerous papers describe the efficiency of polymers as scaffolds (Rezwan *et al.*, 2006; Swetha *et al.*, 2010) for bone tissue engineering applications. Among polymers, some natural polysaccharides with biocompatibility, ability to mimic extracellular matrix and trap growth factors, have been tested as scaffolds for transplanted cells to promote regeneration of mineralized and vascularized tissues. Here, we used a 3D porous scaffold made of pullulan and dextran polysaccharides (Le Visage, 2009a; Le Visage, 2009b) for bone tissue engineering applications. This biomaterial has already been successfully used *in vitro* for cardiovascular engineering applications (Autissier *et al.*, 2007; Autissier *et al.*, 2010; Thébaud *et al.*, 2007). Furthermore, its porosity is compatible with the ingrowth of bone tissue (Karageorgiou and Kaplan, 2005) and our preliminary data showed that human ADSCs were able to differentiate into osteogenic cells within these 3D matrices and to express *in vitro* bone specific markers.

With the promising data from tissue engineering strategies and the potential of these scaffolds for carrying cells, the critical issues are to monitor the engraftment efficiency, temporal and spatial migration of implanted cells, as well as their viability and functional capability *in vivo*. To track in real-time changes of cell location and the functional status of transplanted cells, non-invasive cell imaging techniques have been introduced. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a method of choice for *in vivo* longitudinal assessments since it is a non-invasive and non-irradiant technique offering high spatial and temporal resolution (Poirier-Quinot *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2006). To produce an identifiable change in signal intensity, the cells of interest must be labelled with MR contrast agents (Bos *et al.*, 2004; Bulte *et al.*, 2002; Riviere *et al.*, 2005). These agents cause hydrogen relaxivity changes and create contrast modifications. They include paramagnetic agents or T1 agents mainly based on Gadolinium and superparamagnetic agents or T2 agents based on iron oxide core. Superparamagnetic T2 agents are preferentially used for cellular MRI (Hyafil *et al.*, 2006) since they are more biocompatible than T1 agents. Furthermore, they are highly magnetic, resulting in high contrast modification on MRI with lower concentration than T1 paramagnetic agents. T2-agents based on maghemite cores bonded to dextran and functionalized with poly(ethylene glycol) have been used here (Duguet *et al.*, 2006; Mornet *et al.*, 2005). Compared to the other T2 agents (USPIO, SPIO, MION), they possess covalent bonds between dextran layers that increase their stability and make them an ideal tool for *in vivo* cell MRI tracking. Furthermore, they possess high relaxivity, and have already been used in another study with microglia in which it was demonstrated that these nanoparticles allow *in vitro* and *in vivo* MRI cell tracking (Bouzier-Sore *et al.*, 2010). However, the uptake of these particles could vary largely between different cell types, and some non-phagocytic cells need the combination of particles with transfection agents for efficient cell labeling (Frank *et al.*, 2003; Kustermann *et al.*, 2008).

Regarding mesenchymal stem cells, numerous papers described the high labeling efficiency in labeling bone marrow stromal cells from different sources, while only few data were published with ADSCs, and mainly from animal sources. To our knowledge, no papers describe the use of USPIO for labeling human adipose-derived stromal cells and tracking them in a tissue engineered construct.

Since our macroporous polysaccharide-based scaffold allowed osteogenic differentiation of hADSCs, we conducted here *in vivo* studies to examine the cellular behavior of hADSCs within this scaffold for developing new bone tissue-engineered constructs.

First, we studied the cytocompatibility of USPIO and their effect on metabolic activity and osteoblastic differentiation capability of labelled hADSCs. We also evaluated *in vitro* the nuclear magnetic resonance properties of labelled cells. Finally, we performed *in vivo* MRI cell tracking up to one month after implantation in a subcutaneous site in *nude* mice of the scaffold loaded with labelled cells. Our results demonstrate that high-resolution 4.7-T MRI shows promise for non-invasive 3D visualization of labelled hADSCs within a macroporous polysaccharide-based scaffold before and after *in vivo* implantation. In addition, images revealed that transplanted hADSCs could migrate within the scaffold, and could colonize the surrounding area of the scaffold. This suggests that these scaffolds act as carriers and cell delivery structures for tissue regeneration.

Material and methods

Isolation and culture of hADSCs

hADSCs were isolated and cultured as previously described (Bunnell *et al.*, 2008) with minor modifications. Briefly, human adipose tissue was obtained from patients undergoing liposuction. Tissue samples were minced and digested in a solution of 0.1% (w/v) collagenase type I (Worthington) for 1h30 at 37°C with vigorous shaking. After filtration and centrifugation, the top lipid layer was removed and the remaining Stromal Vascular Fraction (SVF) was treated for 10 minutes with ELB (Erythrocyte Lysis Buffer; 155 mM NH₄Cl (Sigma), 5.7 mM K₂HPO₄ (Sigma), 7.4 mM K₂HPO₄-3H₂O (Sigma), 0.1 mM EDTA (Sigma)) and then centrifuged. The pellet was resuspended in basal medium, DMEM F12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (Lonza) and sequentially filtered through 100, 70 and 40 µm cell strainer (BD Falcon). Cells were plated (10⁴ cells/cm²) and cultivated at 37°C in 5% CO₂. Culture medium was replaced every three days. Osteoinductive medium contains IMDM (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FBS, 10 mM β glycerophosphate (Sigma), 10⁻⁸M dexamethasone (Sigma) and 50µg/ml ascorbic acid (Sigma).

Synthesis of USPIO nanoparticles

USPIO magnetic particles are composed of maghemite cores modified on their surface by aminosilane coupling agents and covalently embedded by a dextran corona. Their surface was functionalized with homo and heterobifunctional poly(ethylene glycol) (PEG) to improve their colloidal stability and stealth. Moreover, they were dye-labelled with a rhodamine derivative (5(6)-carboxy-X-rhodamine N-succinimidyl ester). All the synthesis details have already been reported (Duguet *et al.*, 2006; Mornet *et al.*, 2005). The mean diameter of the maghemite (γ-Fe₂O₃) cores was 7.5 ± 0.27 nm as determined by transmission electron microscopy and was increased to a hydrodynamic diameter determined by photon correlation spectroscopy of 50-80 nm as dextran and PEG modifications occurred.

Cell labeling and flow cytometric experiments

Adherent cell cultures (around 80% confluence) were incubated with USPIO (15 mM Fe³⁺) associated with protamine sulfate (PS) at 1 µg/ml (USPIO-PS) in a serum-free DMEM F12 medium (Invitrogen). After 24 hours of incubation, cells were washed with PBS 0.1M pH 7.4 and harvested by trypsinization for flow cytometric analysis using a FacScan (BD-Bioscience) flow cytometer equipped

with an argon laser ($\lambda=488\text{nm}$). Labeling of hADSCs with rhodamine-coupled USPIO-PS was checked by conventional fluorescent microscopy (ZEISS AXIOVERT 25). The percentage of internalized nanoparticles in hADSCs was quantified by flow cytometry according to our previous paper (Bouzier-Sore *et al.*, 2010). Three samples were analyzed: USPIO-PS nanoparticles alone, hADSCs alone and hADSCs after USPIO-PS incubation. Nanoparticles were easily distinguished from hADSCs on the dot-plot (SSC versus FSC) since they appeared in two different gates in which distribution and fluorescence intensity were quantified.

Transmission electronic microscopy for analysis of nanoparticle uptake

To assess the uptake and localization of the nanoparticles in hADSCs, transmission electron microscopy was performed. After washing with Sørensen buffer 0.1 M (Pottu-Boumendil, 1989) labelled cells were fixed with glutaraldehyde 25% (v/v) and 0.2M PBS pH 7.4 for 2 hours at 4°C and rinsed with 0.1 M PBS pH 7.4. Cells were post-fixed with 4% (v/v) osmium tetroxide in 0.2 M PBS pH 7.4 for 1.5 hours at room temperature, and then rinsed twice in 0.1 M PBS pH 7.4 and once in distilled water. Dehydration was then performed by successive incubations in the following order: alcohol 50°, 70°, 95° and 100° and then embedding in a mix of resin and alcohol 100° (1:1) for 2 hours at room temperature and thereafter in pure resin overnight at room temperature. Samples were transferred to a new bath of pure resin for 5 hours at room temperature and included in the resin. Polymerization occurred at 60°C for 48 hours. Ultrathin sections (thickness 70-72 nm) were produced on an ultramicrotome (LEICA, ULTRACUTE) using a diamond knife. Sections were stained in uracyl acetate or in ethanol 50° for 25 minutes, washed with distilled water, dried, incubated for 8 minutes in lead citrate, rinsed and dried. The specimens were imaged using a transmission electron microscope (HITACHI H7650) with high contrast, saturation filament and an acceleration voltage of 80KV. Digital images were obtained with a camera (GATAN, ORIUS 11M pixels).

Assessment of USPIO-PS cytotoxicity and labelled hADSCs metabolic activity

The biocompatibility of USPIO-PS complexes was investigated by flow cytometry. Different fluorochromes were used to assess the viability of labelled and non-labelled hADSCs. Cells were incubated with USPIO associated with protamine sulfate for 24 hours. Viable cells were determined using propidium iodide (PI, $\lambda_{\text{abs}}= 546 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 590 \text{ nm}$, Molecular Probes). PI was added to the medium (3 $\mu\text{g/ml}$) of labelled and unlabelled cells for 10 min at 37°C, then cells were harvested by trypsinization for flow cytometric measurements. Mitochondrial membrane potential was investigated with 3,3' dihexyloxacarbocyanine iodine (DIOC₆(3), $\lambda_{\text{ex}}= 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 522 \text{ nm}$, Molecular Probes). Labelled and non-labelled cells were incubated for 10 minutes at 37°C in 0.1M DIOC₆(3) before flow cytometric measurements.

To determine the effect of the cell labeling on metabolic activity, cells were plated at 2×10^4 cells/cm² in a 96-well plate and USPIO associated with protamine sulfate were added to the cells for 24h. Metabolic activity of labelled and unlabelled cells was evaluated using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) at day 1, 6, 11, 14 and 20. MTT was added (1mg/ml) at 37°C for 3 hours. Then, cells were washed with PBS and the insoluble formazan salt accumulated inside the cells was solubilized with DMSO and quantified spectrophotometrically at 540 nm.

Quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR)

Unlabelled cells were harvested by trypsin-EDTA treatment at day 1 of culture for negative reference. Cells were then labelled or not and harvested in the same way after 15 days of culture in basal or osteoinductive medium. Total RNA was extracted using the Nucleospin®RNA kit (Macherey-Nagel). One µg was used as template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco) in a 20 µl final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM, MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 µg oligo(dT), and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 50 min, the reaction was stopped at 70°C for 15 min. Five µL of cDNA diluted at a 1:80 ratio were mixed to MESA-green (2X, Fischer scientific) and 10 µM each of forward and reverse primers (Table 1) in a 25 µL final volume and loaded in a 96-well plate. Amplification was performed using the thermocycler (iCycler, Biorad). Data were analyzed with the iCycler IQ™ software and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each Q-PCR was performed in duplicate. Data was normalized to P0 mRNA expression for each condition and was quantified relative to cbfa1/runx2, ALP and type I collagen gene expression of hADSCs after 24 h of culture standardized to 1.

Alkaline phosphatase (ALP) assay

Labelled and unlabelled hADSCs were plated at 2×10^4 cells/cm² and cultured for 15 days in an osteoinductive medium, or in basal medium. ALP activity was detected using a diagnostic kit (85L-2, Sigma). Samples were fixed with paraformaldehyde 4% (w/v) then stained with alkaline dye (Fast blue RR salt supplemented with Naphtol AS-MX phosphate alkaline solution 0.25%, Sigma) for 30 min. Samples were observed with an optical microscope (Zeiss, AXIOVERT 25).

Intracellular ALP activity was quantified on cell lysates as described by Ackerman (1962). Cells were harvested with trypsin-EDTA (0.125 % (w/v) - 0.0625 % (v/w), Sigma) then lysed by freezing/thawing steps and by SDS addition (Sodium Dodecyl Sulfate, Biorad) 0.1% (w/v). Alkaline buffer (Alkaline buffer solution 1.5M, (Sigma) and Triton X100 and *p*-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma)) was added to the sample and incubated at 37°C for 30 minutes. Then, after addition of 0.1 M NaOH to stop the enzymatic reaction, the absorption at 410 nm was measured by spectrophotometry. ALP activity levels were normalized to the amount of protein in each sample. The protein quantification was performed according to the BCA (BicinChoninic Acid) protein assay protocol (Thermoscientific) described by Smith PK *et al.* (1985). Absorbance was read at 550 nm. ALP activity was expressed as nanomoles of inorganic phosphate (Pi) cleaved in 30 minutes per microgram of proteins (n=3).

Von Kossa staining

Extracellular matrix mineralization was analyzed by Von Kossa staining. After 15 days of culture in basal or osteoinductive medium, labelled and unlabelled cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Fixed cells were then rinsed with distilled water, and incubated with silver nitrate 2,5% (w/v) for 30 min at room temperature in the dark. Silver nitrate was removed, cells were rinsed with distilled water. Carbonate sodium/formalin solution (25 mL formalin, 5g Na₂CO₃, 100 mL distilled water) was added to the cells for 1 min and cells were rinsed with tap water. Extracellular matrix coloration was observed with an optical microscope.

Preparation of 3D scaffold and hADSCs seeding

Porous polysaccharide-based scaffolds were prepared using a mixture of pullulan/dextran 75:25. Chemical cross-linking of polysaccharides was carried out with sodium trimetaphosphate (STMP) and pores were created by a patented gas-foaming technique (Le Visage, 2009b). Resulting scaffolds were washed extensively with 0.1 M PBS pH 7.4 and then with distilled water. After a freeze-drying step, porous scaffolds were stored at room temperature until use. Here, scaffolds of 6-mm diameter, 2-mm thickness (20 mm^3) were used for cell seeding in basal or in osteoinductive medium. For *in vitro* and *in vivo* MRI experiments, hADSCs were induced for 15 days in osteoinductive medium and 5×10^4 or 5×10^5 cells were seeded onto the porous scaffolds.

MRI analyses

MRI experiments were performed on a 4.7 T Biospec system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 6-cm BG6 gradient system capable of 950 mT/m maximum strength. Measurements were performed with a birdcage resonator (35-mm diameter and 80-mm length) tuned to 200.3 MHz.

5×10^5 labelled or unlabelled cells were collected in PBS 0.1M, pH 7.4 and spun down. The pellet was trapped in small tubes between two layers of agarose gel 1% (w/v) in PBS 0.1M, pH 7.4 (n=3). T2* measurements were performed at 25°C with a multi gradient echo sequence (TR = 500 ms; Interecho-time: 1.0 ms; Number of echo images: 20; Field-Of-View (FOV): 20 x 20 mm; Matrix: 128 x 128; Slice thickness: 1mm). Relaxation data were analyzed with home-made software developed on Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). For each sample, they were fitted according to a mono-exponential function. MRI analyses were also done with control and labelled cells seeded inside scaffolds (5×10^4 or 5×10^5 cells / disk of 20 mm^3) and cultured for 48 hours before experiments (n=3). T2* gradient echo experiments were performed with the following parameters: (TE/TR: 5/42 ms; flip angle: 7°; Bandwidth: 16 Hz/Pixel; FOV: 30 x 35 x 35 mm; Matrix: 256 x 192 x 192; Spatial Resolution: $117 \times 182 \times 182 \text{ (}\mu\text{m)}^3$; Number of averages: 4).

In vivo experiments

Both the procedure and the animal treatment complied with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research. The studies were carried out in accredited animal facilities at the University of Bordeaux 2, under authorization (N°: 3300048 of the Ministère de l'Agriculture, France). *Nude* mice (n=4) weighing 20g (Charles River Laboratories, France) were anesthetized by isoflurane inhalation (1%-1.5% in air), the back was disinfected, a mid vertical incision was made, and tissue-engineered constructs prepared with two cell densities (5×10^4 or 5×10^5 hADSCs/scaffold) were introduced subcutaneously, one side with labelled hADSCs-seeded scaffolds and the other side with the unlabelled hADSCs-seeded scaffold. The skin was then sutured (Vicryl 4/0).

In vivo MRI experiments were performed at 1, 7, 14, 21 and 28 days after scaffolds implantation. Mice were anesthetized with isoflurane (1%–1.5% in air) and maintained at a constant respiration rate of 75 ± 15 respirations/min. The animals were positioned prone within the magnet with the liver at the center of the NMR coil. A 3D T2*-weighted TrueFISP (Oppelt, 1986) imaging with alternating RF phase pulse method (42) and Sum-Of-Square reconstruction were used as already described (Vasanawala *et al.*, 2000; Miraux *et al.*, 2009) (TE/TR: 5/10 ms; flip angle: 35°, Bandwidth: 203 Hz/Pixel; FOV: 32 x 27.5 x 25 mm; Matrix: 256 x 128 x 110; Spatial Resolution: $125 \times 215 \times 227 \text{ (mm)}^3$; Number of averages: 4; Total acquisition time: 38 min).

Statistical analysis

Data are represented as the mean $\pm$ standard deviation resulting from independent experiments. Statistical significance of differences between data from experimental groups was tested using a non-parametric Mann-Whitney. The level of significance was set at *: $p < 0.05$.

Results

Analysis of USPIO internalization inside the hADSCs

We first tested the ability of hADSCs to internalize USPIO *in vitro*. hADSCs were incubated for 24h with fluorescent USPIO associated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of protamine sulfate and the efficiency of internalization was checked by flow cytometry. Figure 1a shows an increase in fluorescence when USPIO-PS concentrations increased. We also observed that cell labeling efficiency increased with time since fluorescence intensity was 10-fold higher after 24h of incubation compared to 4h (data not shown). Fluorescent microscopic images (Fig. 1b, 1c) show a positive labeling of hADSCs after 24 hours of incubation with fluorescent USPIO-PS. Transmission electron microscopic images of labelled cells (Fig. 1d-f) revealed USPIO-PS internalization by hADSCs, and demonstrated the presence of iron aggregates inside cytoplasmic vesicles (from 0.5 to 1.5 μm diameter), typical of nanoparticle endocytosis.

The amount of free nanoparticles remaining in the cellular sample after washing was quantified by flow cytometry. Data indicated that 91.26 ± 1.82 % of nanoparticles were internalized by hADSCs, while 0.13 ± 0.007 % of the signal after USPIO-PS incubation was due to the remaining free nanoparticles.

USPIO-PS are not cytotoxic for ADSCs

The influence of labeling on the immediate cell survival and on long-term metabolic activity was determined for labelled cells compared to unlabelled cells (Fig. 2). Using flow cytometric analyses, cellular mortality was checked using propidium iodide (Fig. 2a), and the mitochondrial redox potential was studied by assessing the mitochondrial DiOC₆ probe accumulation (Fig. 2b). Three sets of samples were analyzed: hADSCs before and after USPIO and USPIO-PS internalization. There was no difference between these three conditions: neither the cellular viability (Fig. 2a) nor the redox potential (Fig. 2b) were modified, indicating that the USPIO-PS complex internalization was not toxic for these cells. The metabolic activity of labelled cells was checked by MTT assay for up to 20 days (Fig. 2c). There was only a slight, but significant, loss of metabolic activity at day 11 and 14 for hADSCs labelled with USPIO-PS compared to unlabelled cells.

Osteogenic differentiation of labelled hADSCs

mRNA levels of bone specific markers (cbfa1/runx2, ALP, type I collagen), quantified after 15 days of culture in osteoinductive medium, revealed no significant difference between labelled and unlabelled hADSCs (Fig. 3a). After 15 days of culture of labelled hADSCs in osteoinductive medium, the expression at day 15 relative to day 1 is about 8 fold higher for cbfa1/runx2, 1,5 fold higher for ALP mRNA level and 100 fold higher for type 1 collagen. ALP cytochemical staining (Fig. 3b1-b4) and enzymatic activity quantification (Fig. 3b5) in labelled hADSCs were also assessed. After 15 days of induction, labelled cells exhibited a similar enzymatic activity to that of unlabelled cells, confirming the results of gene expression (Fig. 3a). In addition, Von Kossa staining (Fig. 3c) reveals at day 15 the

presence of black calcium deposits in the extracellular matrices showing that labelled cells with USPIO, kept their ability to mineralize *in vitro*.

Taking together, these data indicate that labeling with USPIO does not alter the capability of hADSCs to differentiate *in vitro* toward the osteogenic lineage.

Labelled hADSCs within 3D scaffold and MRI images

Labelled cells within the macroporous polysaccharide-based scaffold were first imaged by fluorescent microscopy. When the suspension of labelled cells was added to the scaffold, cells immediately colonized the scaffold (Fig. 4a, b), and formed after 8 hours numerous clusters (from 50 to 200 μm -diameters) inside the pores (Fig. 4c, d).

In vitro MRI analyses (Fig. 5a) were performed on labelled and unlabelled hADSCs embedded in agarose gels. Labelled cells presented a higher relaxivity compared to the unlabelled ones on MRI T2* measurements, corresponding to a decrease in the T2* value (35 ± 6 ms for unlabelled cells vs 2 ± 2 ms for labelled cells). MRI T2* imaging was thereafter performed with labelled and unlabelled hADSCs seeded at two cell densities (5×10^4 or 5×10^5) within the macroporous scaffolds (Fig. 5b). The highest contrast was obtained in 3D scaffolds seeded with 5×10^5 labelled cells compared to the unlabelled ones. A contrast was still visible in scaffold loaded with 5×10^4 labelled cells. Furthermore, images evidenced that with increasing cell density in the scaffold, the signal appeared more widespread.

In vivo MRI after subcutaneous implantation of tissue-engineered constructs in nude mice

Labelled or unlabelled cells were seeded within the scaffolds at the same cell densities than for *in vitro* MRI studies (5×10^4 or 5×10^5) and were implanted in *nude* mice for 28 days (Fig. 6 and 7). A 3D T2*-weighted TrueFISP MRI experiment was performed at day 1, 7, 14, 21 and 28. Tissue-engineered construct with 5×10^5 labelled cells creates a hyposignal with distinguishing labelled cells (Fig. 6a) from unlabelled cells (Fig. 6b). The signal was still detectable until 28 days after implantation (Fig. 6b), but decreased with time. Further time points were not investigated.

For the lowest cell density (5×10^4 hADSCs/scaffold) (Fig. 7a, b), the signal remains visible during the first two weeks (Fig. 7a) and then seems to locate more at the periphery of the scaffold with time (see arrow). It could suggest that some cells remain in the scaffold, while some other cells could migrate and colonize the area around the matrix (Fig. 7a). This event is clearly observed for the scaffolds cellularized with the two cell densities after 14 days of implantation (Fig. 6a, 7a; see arrows). Regarding the fate of the scaffold, here seen as a rectangular shape, it was still visible at the same location 28 days after subcutaneous implantation.

Discussion

The novelty of this study was to combine the use of i) adipose-derived stromal cells from human tissues, ii) an innovative scaffold as a cell carrier and iii) biocompatible superparamagnetic nanoparticles, internalized by hADSCs, to follow their *in vivo* location by MRI in a non-invasive way, in the context of a new bone tissue engineered construct. Taking together, fluorescence analysis, flow cytometry, TEM and *in vitro* MRI demonstrated an efficient internalization of the contrast agents in human mesenchymal stem cells. Moreover, neither the cell viability, nor the osteogenic differentiation capacity of labelled hADSCs was modified. The high relaxivity of USPIO allowed to monitor as few as 5×10^4 labelled hADSCs both *in vitro* and *in vivo* by T2*-weighted MRI during one

month. Interestingly, the location of the signal within the scaffold changes with time of implantation suggesting that some hADSCs were able to migrate to the periphery of the scaffold for participating to tissue regeneration.

Indeed, MRI is a method of choice to track stem cells in a tissue-engineered construct, because of its excellent spatial resolution, high tissue contrast and lack of ionizing radiation. However, magnetic labeling of cells is a prerequisite for their visualization. Many studies have investigated USPIO-based labeling protocols for monocytes (Oude Engberink *et al.*, 2007), neural stem cells (Politi, 2007) and mesenchymal stem cells (Farrell *et al.*, 2008). Few papers used ADSCs (Rice *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009) a relevant cell source for bone tissue engineering applications. However, these data were performed on ADSCs arising from animal tissues and revealed that a 24-hour incubation time was required for their labeling (Rice *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009). In another study (Bouzier-Sore *et al.*, 2010) performed with highly phagocytic microglia cells, a 4-hour incubation was sufficient to obtain a high efficiency for particle internalization. Therefore, for each cell type, these parameters have to be determined and optimized for monitoring transplanted cells after their implantation. In our study, human ADSCs were efficiently labelled after a 24 hour-incubation with USPIO at 15 mM Fe³⁺ associated with 1µg/ml PS. The efficiency of USPIO internalization increased with time but beyond 24 hours of incubation, cell division occurred, inducing labeling dilution. Fluorescence microscopy, TEM observations and flow cytometric analyses confirmed that the nanoparticles preferentially localized in vesicles inside the cytoplasm, either *via* phagocytosis (Cousin *et al.*, 1999; Villena *et al.*, 2001) or by endocytosis involving or not specific receptors (Raynal *et al.*, 2004).

Several transfection agents can be used to increase cellular nanoparticle uptake (Arbab *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2003). Arbab *et al.* (2004) used protamine sulfate, a positively charged surfactant, to improve USPIO internalization. With the addition to USPIO of PS at a non-cytotoxic concentration before incubation with hADSCs, we observed homogenization of the labelled population (data not shown) and a decrease in T2* values after MRI analyses (T2* values: 35 ± 6 ms for USPIO-PS compared to 2 ± 2 ms for USPIO alone). We hypothesized that after incubation, some nanoparticles attached to the cell membrane (Ribot *et al.*, 2009) could no longer enter the cells. PS might facilitate this internalization, which does not occur spontaneously. Therefore, we decided to use PS at 1µg/ml because beyond this concentration there was no longer any beneficial effect, while the toxicity for cells starts at 10µg/ml (data not shown).

In a first step, we analyzed the behavior of these labelled hADSCs in standard two dimensional cultures. The viability of hADSCs was not modified after labeling, as already demonstrated with USPIO in microglia (Bouzier-Sore *et al.*, 2010). Moreover, the hADSC osteogenic differentiation capacity *in vitro* was not altered after labeling, and they kept their ability to calcify the extracellular matrix. Mesenchymal stem cells usually maintain their properties of multi-lineage differentiation after magnetic labeling (Arbab *et al.*, 2005), except for one report indicating inhibition of the human chondrogenic differentiation potential (Kostura *et al.*, 2004).

In a bone tissue engineering context, MSCs are associated with a biocompatible scaffold allowing their functionality and the production of a new bone tissue. In this study, we choose to develop a tissue-engineered construct using a natural polymer, a macroporous polysaccharide-based scaffold (Le Visage, 2009a; Le Visage, 2009b). Here, the use of fluorescent USPIO-PS allowed monitoring *in vitro* the behavior of labelled hADSCs after seeding within the scaffold. Results showed that cells colonized the scaffold and were organized in clusters in the pores after 8 hours of 3D culture. We hypothesized that this cluster configuration may favor interactions between cells, thereby promoting

osteogenic differentiation (Frohlich *et al.*, 2010) and then production of mineralized matrix, as recently observed with embryonic stem cells (Gothard *et al.*, 2009).

USPIO displayed a high relaxivity that allowed visualizing labelled cells *in vitro* and *in vivo* by MRI. However, T2* of labelled cells associated within the scaffold could not be measured owing to external parameters related to the scaffold (presence of air bubbles and various water densities within the scaffold). Although a direct quantitative analysis by MRI on the scaffold was not possible, 5×10^5 cells containing nanoparticles were distributed within the entire scaffold and created a high contrast on T2*-weighted images. Interestingly, this contrast was still visible for the lowest cell density (5×10^4) loaded on the scaffold.

According to these *in vitro* data, 5×10^4 and 5×10^5 labelled cells were loaded in the scaffolds before the subcutaneous implantation in *nude* mice. We selected the 3D T2*-weighted TrueFISP method instead of a 3D FLASH gradient echo for *in vivo* studies. The 3D T2*-weighted TrueFISP combines a higher intrinsic contrast and a higher T2* sensitivity (Heyn *et al.*, 2006; Mohammadi-Nejad *et al.*, 2010) compared to classical gradient echo methods. Hence, 5×10^5 labelled cells were detectable for up to 28 days after implantation. For both cell densities, we observed a loss of signal in the center of the biomaterial from day 7. Several assumptions are issued from these data. It could be due to cell division of labelled cells, leading to a signal dilution, but it would be surprising to observe this phenomenon only at the center of the scaffold. It could be also due to cell death in the center of the biomaterial, leading to nanoparticles release and their diffusion to the periphery of the implant. We could also hypothesize that if cells are suffering in the center because of hypoxia environment they could migrate at the periphery as happens *in vitro*. However, if free nanoparticles relocate at the periphery of the implant, we should observe a high increase of the signal, which is not the case. The most probable hypothesis is that labelled cells migrate from the region of implantation and escape from the scaffold and thus could participate to tissue regeneration and implant integration within a bone defect. However, despite the signal loss observed from day 7, the signal remained detectable *in vivo* within the scaffold until at least 14 or 28 days for scaffolds cellularized with 5×10^4 or 5×10^5 of hADSCs, respectively. Then, the scaffold might therefore behave as a cell carrier capable of holding its own cell fraction and delivering another fraction to the site of implantation for inducing a better tissue regeneration process. This would throw light on their contribution to tissue reconstruction and biomaterial integration within the host tissue. Further studies should address the outcome of implanted scaffolds and cells over time. For instance, the fluorescence of the labelled cells could help in determining their distribution and in discriminating host cells from implanted cells. MRI allowed also monitoring the implanted biomaterial and surrounding tissues. Indeed, at no time point we detected a change on the location of the biomaterial, degradation or an inflammatory reaction at the site of implantation.

In conclusion, we have established conditions for labeling hADSCs with USPIO nanoparticles without affecting metabolic activity and osteogenic differentiation capacity. Furthermore, the present findings show that labelled hADSCs within a 3D scaffold can be monitored *in vivo* by MRI for at least 28 days. In the near future, MRI-based cell tracking could be used for *in vivo* longitudinal assessment of bone tissue engineered constructs, although MRI should be combined with other methods, like micro-computer tomography (micro-CT) and histomorphometry, to evaluate the capability of this new tissue-engineered construct to generate mineralized bone tissue.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, University Bordeaux Segalen, Universities Paris 7 and 13, "Délégation Générale de l'Armement" (DGA), and by grants from the French National Research Agency (ANR-07-TecSan-011-01 ITOV; ANR-09-EBIO-001 3D Cell). Thanks to ICELLTIS (Toulouse, France) for providing human adipose-derived stromal cells, ABCell-Bio (France) for providing cell culture medium and S. Lacomme (BIC University Bordeaux 2, France) for TEM analyses. Thanks to Patrick Guitton for technical support and to R. Cooke for English improvements.

References

- Ackerman GA (1962) Substituted Naphthol as Phosphate Derivatives for the Localization of Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity. *Lab Invest* **11**:563-567.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA (2004) Efficient Magnetic Cell Labeling with Protamine Sulfate Complexed to Ferumoxides for Cellular MRI. *Blood* **104**:1217-1223.
- Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ, Frank JA (2005) Labeling of Cells with Ferumoxides-Protamine Sulfate Complexes Does Not Inhibit Function or Differentiation Capacity of Hematopoietic or Mesenchymal Stem Cells. *NMR Biomed* **18**:553-559.
- Autissier A, Letourneur D, Le Visage C (2007) Pullulan-Based Hydrogel for Smooth Muscle Cell Culture. *J Biomed Mater Res A* **82**:336-342.
- Autissier A, Visage CL, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D (2010) Fabrication of Porous Polysaccharide-Based Scaffolds Using a Combined Freeze-Drying/Cross-Linking Process. *Acta Biomater* **6**:3640-3648.
- Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, Dubus I, Ivanovic Z, Rosenbaum J, Charbord P, Combe C, Bulte JW, Moonen CT, Ripoché J, Grenier N (2004) *In Vivo* MR Imaging of Intravascularly Injected Magnetically Labelled Mesenchymal Stem Cells in Rat Kidney and Liver. *Radiology* **233**:781-789.
- Bouzier-Sore AK, Ribot E, Bouchaud V, Miraux S, Duguet E, Mornet S, Clofent-Sanchez G, Franconi JM, Voisin P (2010) Nanoparticle Phagocytosis and Cellular Stress: Involvement in Cellular Imaging and in Gene Therapy against Glioma. *NMR Biomed* **23**:88-96.
- Brown KL, Cruess RL (1982) Bone and Cartilage Transplantation in Orthopaedic Surgery. A Review. *J Bone Joint Surg Am* **64**:270-279.
- Bulte JW, Duncan ID, Frank JA (2002) *In Vivo* Magnetic Resonance Tracking of Magnetically Labelled Cells after Transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**:899-907.
- Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C (2008) Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods* **45**:115-120.
- Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L (1999) A Role for Preadipocytes as Macrophage-Like Cells. *Faseb J* **13**:305-312.
- De Boer HH (1988) The History of Bone Grafts. *Clin Orthop Relat Res*:292-298.
- Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE (2006) The Osteogenic Potential of Adipose-Derived Stem Cells for the Repair of Rabbit Calvarial Defects. *Ann Plast Surg* **56**:543-548.
- Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM (2006) Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Medicine. *Nanomedicine (Lond)* **1**:157-168.

- Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Weinans H, Krestin G, O'Brien FJ, van Osch G, Bernsen M (2008) Effects of Iron Oxide Incorporation for Long Term Cell Tracking on Msc Differentiation *in Vitro* and *in Vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **369**:1076-1081.
- Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH, Jr., Bulte JW (2003) Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents. *Radiology* **228**:480-487.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat Tissue: An Underappreciated Source of Stem Cells for Biotechnology. *Trends Biotechnol* **24**:150-154.
- Frohlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble JM, Kregar-Velikonja N, Vunjak-Novakovic G (2010) Bone Grafts Engineered from Human Adipose-Derived Stem Cells in Perfusion Bioreactor Culture. *Tissue Eng Part A* **16**:179-189.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G (2008) Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**:254-264.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* **100**:1249-1260.
- Gothard D, Roberts SJ, Shakesheff K, Buttery LD (2009) Engineering Embryonic Stem Cell Aggregation Allows an Enhanced Osteogenic Differentiation *in Vitro*. *Tissue Eng Part C Methods* **16**:583-595.
- Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M (2004) Osteogenic Potential of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as an Alternative Stem Cell Source. *Cells Tissues Organs* **178**:2-12.
- Heyn C, Ronald JA, Mackenzie LT, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ (2006) *In Vivo* Magnetic Resonance Imaging of Single Cells in Mouse Brain with Optical Validation. *Magn Reson Med* **55**:23-29.
- Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A (2009) Adult Stem Cells in Tissue Engineering. *Expert Rev Med Devices* **6**:621-640.
- Hyafil F, Laissy JP, Mazighi M, Tchetché D, Louedec L, Adle-Biasette H, Chillon S, Henin D, Jacob MP, Letourneur D, Feldman LJ (2006) Ferumoxtran-10-Enhanced MRI of the Hypercholesterolemic Rabbit Aorta: Relationship between Signal Loss and Macrophage Infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:176-181.
- Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH (2008) *In Vivo* Bone Formation Following Transplantation of Human Adipose-Derived Stromal Cells That Are Not Differentiated Osteogenically. *Tissue Eng Part A* **14**:1285-1294.
- Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K (2008) Bone Tissue Engineering Using Human Adipose-Derived Stem Cells and Honeycomb Collagen Scaffold. *J Biomed Mater Res A* **84**:191-197.
- Karageorgiou V, Kaplan D (2005) Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **26**:5474-5491.
- Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW (2004) Feridex Labeling of Mesenchymal Stem Cells Inhibits Chondrogenesis but Not Adipogenesis or Osteogenesis. *NMR Biomed* **17**:513-517.

- Kustermann E, Himmelreich U, Kandal K, Geelen T, Ketkar A, Wiedermann D, Strecker C, Esser J, Arnhold S, Hoehn M (2008) Efficient Stem Cell Labeling for MRI Studies. *Contrast Media Mol Imaging* **3**:27-37.
- Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT (2008) Cell-Based Therapies for Skeletal Regenerative Medicine. *Hum Mol Genet* **17**:R93-98.
- Le Visage C, Chaubet F, Autissier A, Letourneur D (2009a). Method for Preparing Porous Scaffold for Tissue Engineering, Cell Culture and Cell Delivery. Patent WO2009/047346.
- Le Visage C, Letourneur D (2009b) Method for Preparing Porous Scaffold for Tissue Engineering. Patent WO2009/047347.
- Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW, Woodruff MA (2008) The Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Precursor Cells in a 3D Scaffold/Matrix Environment. *Curr Drug Discov Technol* **5**:319-327.
- Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H (2005) Engineering Bone: Challenges and Obstacles. *J Cell Mol Med* **9**:72-84.
- Miriaux S, Calmettes G, Massot P, Lefrancois W, Parzy E, Muller B, Arsac LM, Deschodt-Arsac V, Franconi JM, Diolez P, Thiaudiere E (2009) 4D Retrospective Black Blood Truefisp Imaging of Mouse Heart. *Magn Reson Med* **62**:1099-1105.
- Mohammadi-Nejad AR, Hossein-Zadeh GA, Soltanian-Zadeh H (2010) Quantitative Evaluation of Optimal Imaging Parameters for Single-Cell Detection in MRI Using Simulation. *Magn Reson Imaging* **28**:408-417.
- Mornet S, Portier J, Duguet E (2005) A Method for Synthesis and Functionalization of Ultrasmall Superparamagnetic Covalent Carriers Based on Maghemite and Dextran. *J Magnetism Magnetic Mater* **293**:127-134.
- Oppelt A, R. Graumann, H. Barfu, H. Fischer, W. Hartl, W. Schajor (1986) Fisp:A New Fast MRI Sequence. *Electromedica* **54**:15-18.
- Oude Engberink RD, van der Pol SM, Dopp EA, de Vries HE, Blezer EL (2007) Comparison of SPIO and USPIO for *in Vitro* Labeling of Human Monocytes: MR Detection and Cell Function. *Radiology* **243**:467-474.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **284**:143-147.
- Poirier-Quinot M, Frasca G, Wilhelm C, Luciani N, Ginefri JC, Darrasse L, Letourneur D, Le Visage C, Gazeau F (2010) High-Resolution 1.5-Tesla Magnetic Resonance Imaging for Tissue-Engineered Constructs: A Noninvasive Tool to Assess Three-Dimensional Scaffold Architecture and Cell Seeding. *Tissue Eng Part C Methods* **16**:185-200.
- Politi LS (2007) MR-Based Imaging of Neural Stem Cells. *Neuroradiology* **49**:523-534.
- Pottu-Boumendil J (1989) Microscopie électronique, principes et méthodes de préparation. Editions INSERM. Paris.
- Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C (2004) Macrophage Endocytosis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Mechanisms and Comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10. *Invest Radiol* **39**:56-63.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006) Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **27**:3413-3431.

- Ribot EJ, Miraux S, Delville MH, Bouchaud V, Lacomme S, Gontier E, Bouzier-Sore AK, Franconi JM, Thiaudiere E, Voisin P (2009) Study of the MR Relaxation of Microglia Cells Labelled with Gd-DTPA-Bearing Nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging* **4**:109-117.
- Rice HE, Hsu EW, Sheng H, Evenson DA, Freemerman AJ, Safford KM, Provenzale JM, Warner DS, Johnson GA (2007) Superparamagnetic Iron Oxide Labeling and Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Middle Cerebral Artery Occlusion-Injured Mice. *AJR Am J Roentgenol* **188**:1101-1108.
- Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, Allaire E, Michel JB, Letourneur D, Deux JF (2005) Iron Oxide Nanoparticle-Labelled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation. *Radiology* **235**:959-967.
- Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM (2006) Technology Insight: *In Vivo* Cell Tracking by Use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **3**:554-562.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N (2010) Biocomposites Containing Natural Polymers and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Int J Biol Macromol* **47**:1-4.
- Thébaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L (2007) Human Endothelial Progenitor Cell Attachment to Polysaccharide-Based Hydrogels: A Pre-Requisite for Vascular Tissue Engineering. *J Mater Sci Mater Med* **18**:339-345.
- Vasanawala SS, Pauly JM, Nishimura DG (2000) Linear Combination Steady-State Free Precession MRI. *Magn Reson Med* **43**:82-90.
- Villena JA, Cousin B, Penicaud L, Casteilla L (2001) Adipose Tissues Display Differential Phagocytic and Microbicidal Activities Depending on Their Localization. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**:1275-1280.
- Wang L, Deng J, Tian W, Xiang B, Yang T, Li G, Wang J, Gruwel M, Kashour T, Rendell J, Glogowski M, Tomanek B, Freed D, Deslauriers R, Arora RC, Tian G (2009) Adipose-Derived Stem Cells Are an Effective Cell Candidate for Treatment of Heart Failure: An MR Imaging Study of Rat Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**:H1020-1031.
- Wong S, Steinbach L, Zhao J, Stehling C, Ma CB, Link TM (2009) Comparative Study of Imaging at 3.0 T Versus 1.5 T of the Knee. *Skeletal Radiol* **38**:761-769.

Figures and legends

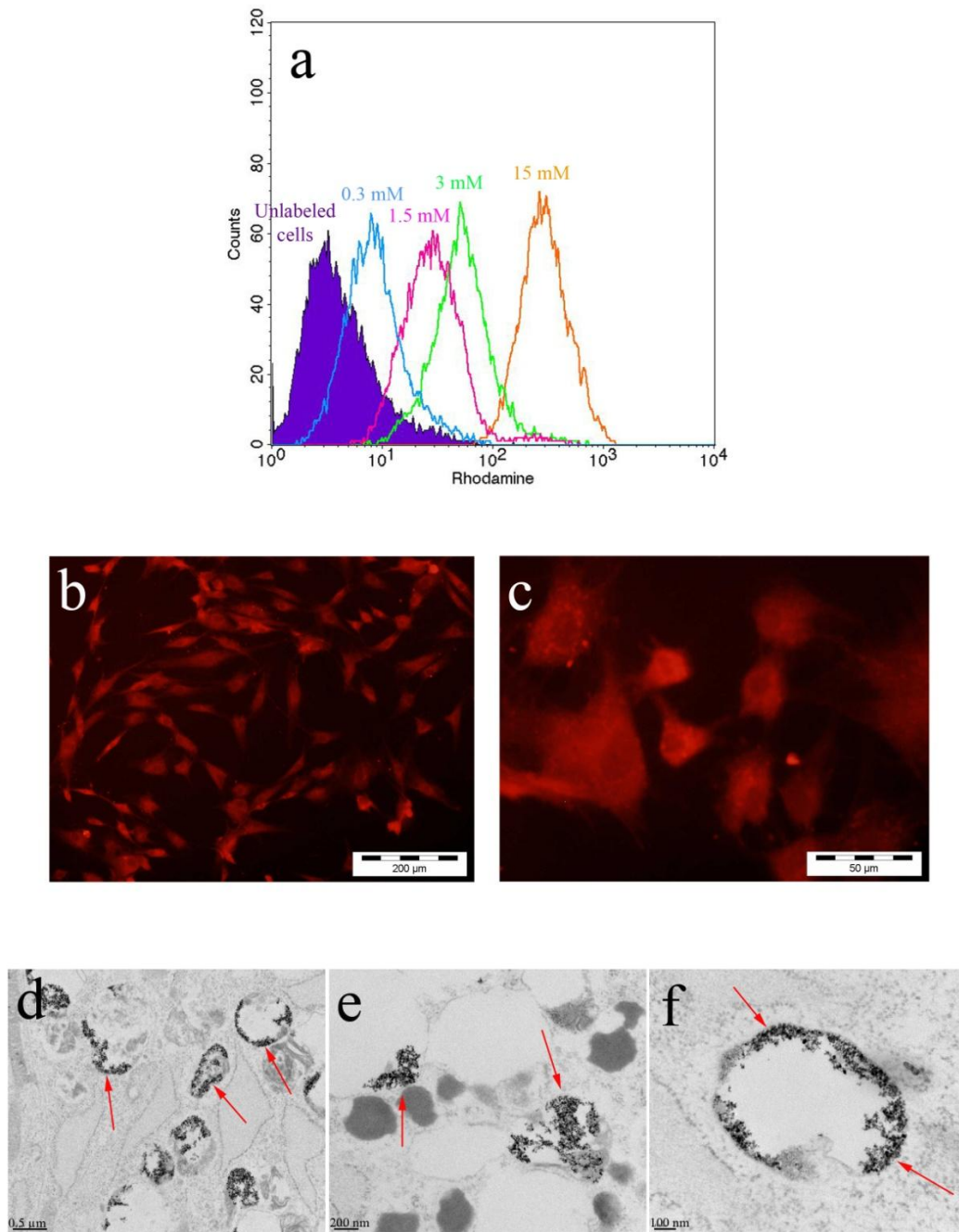


Figure1: USPIO internalisation. (a): flow cytometric measurement of fluorescence of hADSCs before and after USPIO-PS labelling with various concentrations of USPIO. (b, c): fluorescent microscopy of labelled hADSCs. (d-f): electronic transmission microscopy on labelled hADSCs; arrows indicate USPIO particles taken up by the cells inside cytoplasmic vesicles.

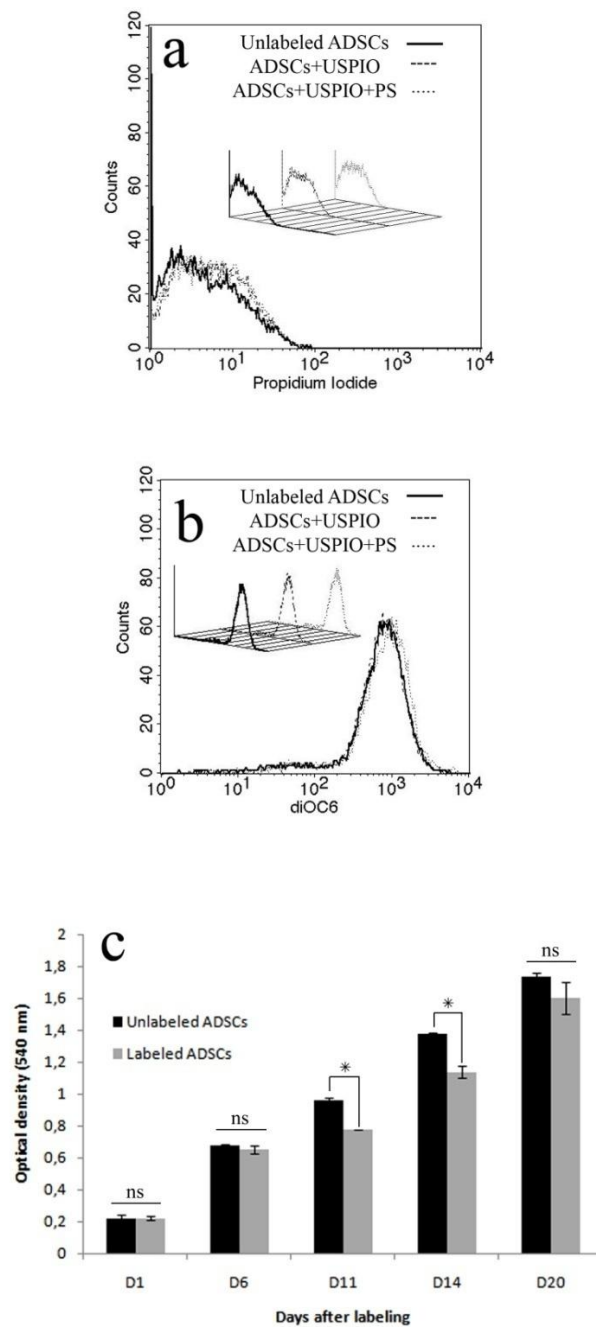


Figure 2: Assessment of potential USPIO toxicity. (a,b): hADSCs viability was analyzed 24 hours after labelling by flow cytometry. Histograms represent the fluorescence of PI (a) and DiOC₆ (b); unlabelled hADSCs (—), hADSCs + USPIO (----), hADSCs + USPIO-PS (.....). (c): Metabolic activity of unlabelled and USPIO-PS labelled hADSCs was assessed by MTT assay from day 1 to day 20. A difference between labelled and unlabelled hADSCs was observed at day 11 and day 14.

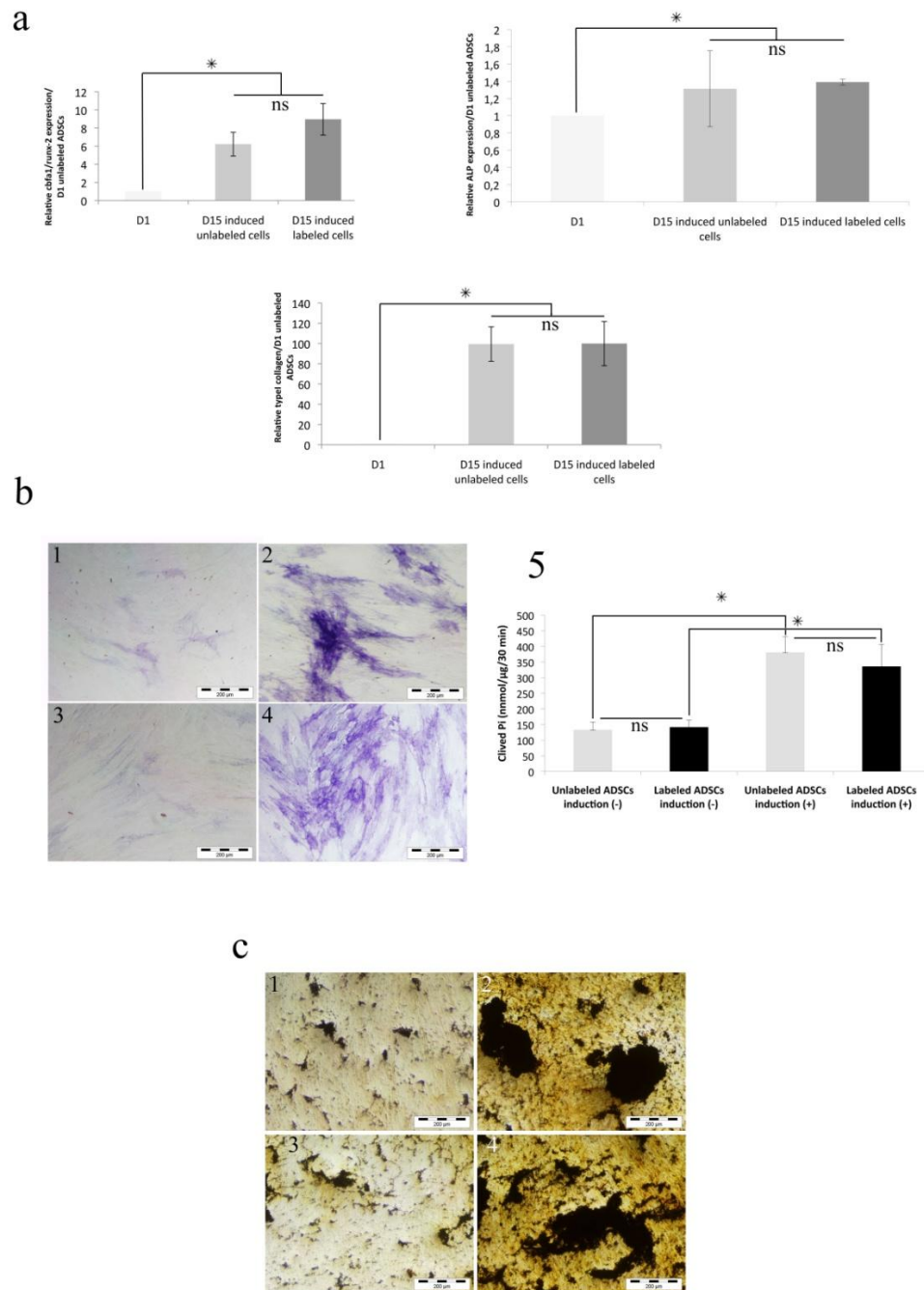


Figure 3: Osteogenic differentiation capability of cells after USPIO labelling. (a): relative expression of mRNA levels of bone specific markers (*cbfa1/runx2*, alkaline phosphatase or ALP and type I collagen) in USPIO-labelled and unlabelled ADSCs after 15 d of induction. (b) ALP cytochemical staining of unlabelled hADSCs (b1, b2) and labelled hADSCs (b3, b4), either non-osteo-induced (b1, b3) or cultured in the osteoinductive medium (b2, b4). ALP quantitative enzymatic activity (b5) was quantified in labelled and unlabelled hADSCs, osteo-induced or not. (c) Von Kossa staining of unlabelled hADSCs (c1, c2) and labelled hADSCs (c3, c4), either non-osteoinduced (c1, c3) or cultured in the osteoinductive medium (c2, c4).

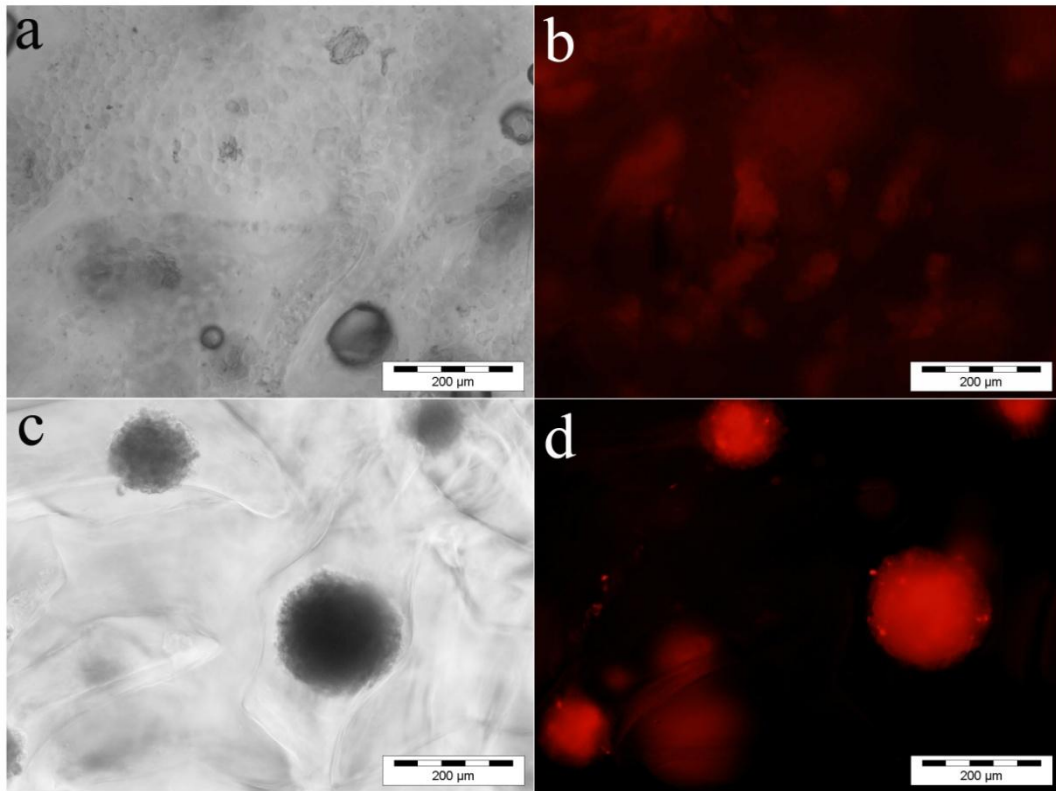


Figure 4: 3D culture of labelled hADSCs. Optical (a, c) and fluorescence (b, d) microscopy of labelled hADSCs seeded into a porous polysaccharide-based scaffold, 1 h (a, b) and 8 h (c, d) after seeding where cells are organized in clusters inside the pores of the 3D structure. Scale bar: 200 μm .

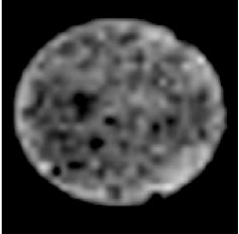
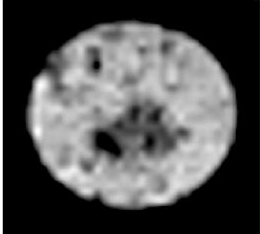
		Unlabeled cells	Labeled cells
a	T_2^* (ms)		
	in agarose gel	35 ± 6	2 ± 2
b	T_2^* -imaging		
	in the scaffold		
		5x10 ⁵ cells	5x10 ⁵ cells
			
			5x10 ⁴ cells

Figure 5: *In vitro* MRI analyses of unlabelled and labelled hADSCs. (a): T_2^* values obtained for unlabelled and labelled hADSCs in agarose gel ($n=3$) . (b) T_2^* -imaging obtained for 5×10^5 unlabelled hADSCs and for 5×10^4 and 5×10^5 labelled hADSCs associated to the disk-shaped scaffold (20 mm^3). Images were obtained at 4.7 T.

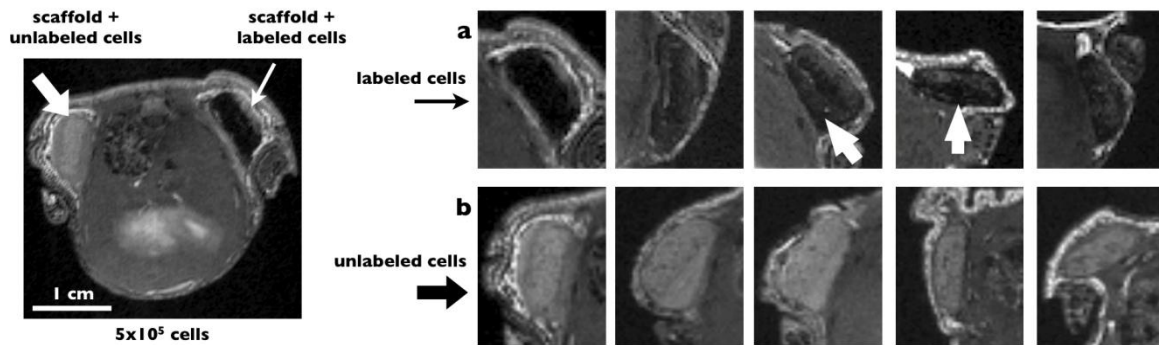


Figure 6: *In vivo* MR imaging of scaffolds loaded with 5×10^5 labelled (a) or unlabelled hADSCs (b) per 20 mm^3 disk at different times (days 1, 7, 14, 21 and 28) after implantation. On the left, macroscopic MR images obtained at day 1 showing both scaffold loaded with labelled and unlabelled cells seeded with 5×10^5 . The arrows indicate the position of the scaffold with labelled (small arrow on the right) and unlabelled cells (large arrow on the right). Images were obtained at 4.7 T with a T2*-gradient echo sequence.

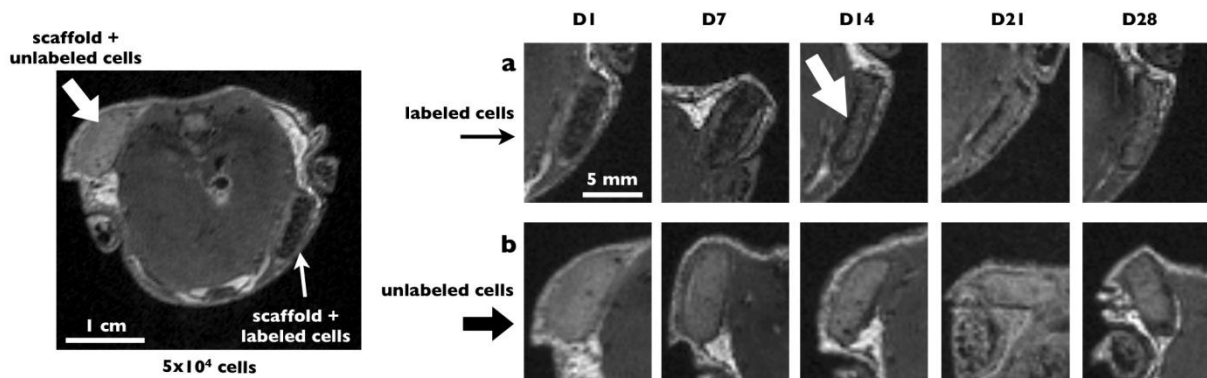


Figure 7: *In vivo* MR imaging of scaffolds loaded with 5×10^4 labelled (a) or unlabelled hADSCs (b) per 20 mm^3 disk at different times (days 1, 7, 14, 21 and 28) after implantation. On the left, macroscopic MR images obtained at D1 showing both scaffold loaded with labelled and unlabelled cells seeded with 5×10^4 . The arrows indicate the position of the scaffold with labelled (small arrow on the right) and unlabelled cells (large arrow on the right). Images were obtained at 4.7 T with a T2*-gradient echo sequence.

C. Conclusion

L'originalité de ce travail a été de combiner l'utilisation de cellules souches adultes issues du tissu adipeux humain à une matrice poreuse innovante à base de polysaccharides naturels et des nanoparticules biocompatibles permettant leur suivi cellulaire *in vivo* non invasif par IRM.

Les résultats de cette étude montrent que les nanoparticules USPIO sont efficacement internalisées par les ADSCs aussi bien en 2D qu'en 3D dans les matrices de polymères. La présence de ces agents de contraste dans les cellules cultivées en 2D est mise en évidence par microscopie électronique à transmission au niveau de vésicules cytoplasmiques. Ce marquage n'affecte en rien les propriétés de viabilité, de prolifération et de différenciation ostéogénique de ces cellules qui préservent leur capacité à minéraliser leur matrice extracellulaire. De plus, les cellules marquées avec les USPIOs associées au matériau, peuvent être observées par microscopie à fluorescence et révèlent la formation d'agrégats multicellulaires au sein de la structure poreuse, comme cela a pu être montré dans l'article 1. Ces agrégats cellulaires présentent un fort contraste par rapport au matériau après imagerie par résonance magnétique (IRM) *in vitro*. Le signal est détectable pendant un mois après implantation des constructions au niveau d'un site sous-cutané chez la souris immunodéficiente. De façon intéressante, nous avons pu observer une perte de signal au centre du biomatériau à partir du septième jour.

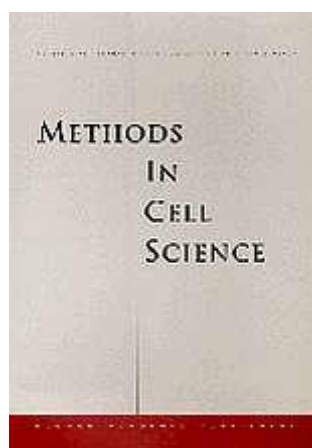
L'hypothèse la plus probable est que les cellules marquées migrent au sein de la matrice et diffusent en périphérie, pouvant éventuellement participer au processus de régénération. Le biomatériau, servirait de véhicule, capable de conserver une partie des cellules en son sein, mais aussi comme système de délivrance d'éléments cellulaires au niveau du site d'implantation.

La fluorescence liée aux USPIOs des ADSCs marquées ainsi que l'hybridation *in situ* des séquences ALU sur coupes histologiques pourraient permettre de discriminer les cellules implantées des cellules de l'hôte. De même, ces approches méthodologiques seront utiles pour identifier le rôle exact de ces cellules humaines implantées dans un processus de formation osseuse. Comme cela peut être visualisé dans les images IRM, le matériau apparaît en hypersignal, contrasté par rapport aux cellules marquées et aux tissus environnants. Il est donc possible de suivre son évolution, les réactions inflammatoires qu'il peut déclencher ainsi que sa dégradation.

En conclusion, nous avons établi un protocole de marquage des ADSCs efficace pour l'IRM, sans affecter les propriétés biologiques de ces cellules, ni leur fonction. Dans cette étude, les cellules marquées associées à la matrice peuvent être suivies *in vivo* par IRM, au moins pendant 28 jours. La matrice utilisée constituerait un excellent transporteur de cellules *in vivo*.

Cependant, ces méthodes d'imagerie non invasives doivent être couplées à des techniques d'investigations permettant l'observation et la quantification du tissu néoformé minéralisé. La microtomographie aux rayons X ainsi que l'histomorphométrie restent les techniques de référence pour l'analyse du tissu osseux néoformé.

Cette même approche devra être réalisée en site osseux afin de confirmer si ces cellules ont la capacité de migrer *in vivo* dans cette matrice de polysaccharides et de participer à la réparation d'un tissu osseux, en son sein et à la périphérie de l'implant.



DEVELOPMENT OF A DEFINED MEDIUM FOR OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS (ADSCs)

C. Lalande ^{1,2}, L. Caillot ³, C. Conway ³, R. Bareille ^{1,2}, G. Uzan ³, J. Amédée ^{1,2}

Article en préparation

¹ Université Bordeaux, Bordeaux F33076, France

² INSERM U1026, Tissue Bioengineering, Bordeaux F33076, France

³ ABCell-Bio, Paris, France

III. Développement d'un milieu défini pour la différenciation ostéoblastique des ADSCs

A. Introduction

Le développement de produits de thérapie cellulaire et de produits d'ingénierie tissulaire destinés à la clinique comporte de nombreuses contraintes réglementaires afin d'assurer l'efficacité et l'innocuité du produit pour le patient. Les produits d'ingénierie tissulaire sont à ce jour considérés comme des produits thérapeutiques annexes (PTAs).

L'afssaps définit les PTAs comme « *tout produit, à l'exclusion des dispositifs médicaux, entrant en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits issus du corps humain ou d'origine animale au cours de leur conservation, de leur préparation, de leur transformation, de leur conditionnement ou de leur transport, avant leur utilisation thérapeutique chez l'homme* ».

Par ailleurs, les PTAs sont soumis aux règles de bonnes pratiques de fabrication (BPF) dont les principes sont définis par l'afssaps. Ces normes permettent « *d'assurer la qualité de ces produits, garantissent qu'ils soient fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché* » (OMS). Dans ce cadre, les conditions d'isolement, d'expansion et de différenciation des cellules composant un produit d'ingénierie tissulaire doivent être effectuées dans un milieu de culture complètement défini et contrôlé afin de limiter les risques pathogènes et renforcer la reproductibilité de ces milieux d'expansion et/ou de différenciation [Sensebe, 2008] [Sensebe et al., 2011].

Actuellement, le sérum de veau fœtal est le principal complément nutritif présent dans les milieux de culture cellulaire. Il contient un grand nombre de facteurs de croissance et d'adhérence, essentiels pour la croissance cellulaire. Cependant, le sérum peut être une source importante d'agents infectieux ou pathogènes, sa composition chimique reste incontrôlée et sa production non reproductible, rendant son utilisation clinique impossible [Tekkotte et al., 2011] [Heiskanen et al., 2007] [Tuschong et al., 2002]. Des séras ou des alternatives d'origine humaines ont vu le jour comme des substituts au sérum d'origine animale [Schallmoser et al., 2007] [Schallmoser et al., 2009] [Bernardo et al., 2011] mais présentent néanmoins de nombreux autres inconvénients. Dans le cadre du sérum humain hétérologue, le risque de contamination ne peut être exclu. Le problème d'hétérogénéité entre les lots persiste et nécessite le prélèvement d'une importante quantité de sang chez le patient. Toutes ces limites privilégient le développement d'un milieu de culture défini c'est-à-dire dont la composition chimique est connue, élaboré de façon reproductible et exempt d'éléments pathogènes ou infectieux. Les milieux définis sont composés d'un milieu de base auquel sont ajoutés plusieurs éléments tels que des facteurs de croissance, des protéines, des lipides, des facteurs d'adhérence à des concentrations très précises. La mise au point d'un milieu sans sérum doit s'adapter à chaque lignage cellulaire et nécessite une connaissance approfondie du métabolisme cellulaire propre à chaque type cellulaire.

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire osseuse présenté dans ce travail de thèse, les ADSCs doivent être amplifiées dans cette matrice 3D, voire orientées vers le lignage ostéoblastique, si la matrice 3D ou les contraintes mécaniques ne paraissent pas suffisantes à elles seules, pour activer la fonction ostéogénique de ces cellules. Nos résultats (article 1) montrent que la matrice macroporeuse de polysaccharides, stimule la différenciation ostéoblastique des ADSCs grâce à la conformation et la distribution que les cellules adoptent dans cette structure 3D. Néanmoins, les résultats ont montré

que l'addition d'un milieu de culture supplémenté en sérum de veau fœtal et en facteurs inducteurs (dexaméthasone, β -glycérophosphate, acide ascorbique) renforce le potentiel ostéogénique de ces ADSCs cultivées en 3D. Dans ce même sens, l'apport de contraintes mécaniques active d'autant plus cette cinétique de différenciation ostéoblastique des ADSCs.

L'élaboration d'un milieu défini, élaboré en conditions GMP, ne peut être qu'une valeur ajoutée dans ce contexte d'ingénierie osseuse, pour activer la cinétique de régénération osseuse, et la formation d'un tissu minéralisé fonctionnel.

Le but de ce troisième article, en collaboration avec l'industriel ABCell-Bio, a été de développer un milieu défini pour favoriser la différenciation ostéoblastique des ADSCs, répondant aux conditions GMP et permettant un transfert clinique de ces cellules associées à une matrice tridimensionnelle pour la reconstruction osseuse.

Ce milieu doit être aussi efficace que les milieux « standards » contenant des séra animaux classiquement utilisés en recherche. Dans cette étude l'effet du milieu défini sur la différenciation ostéoblastique des ADSCs sera donc comparé à celui du milieu standard composé d'IMDM, 10% de SVF, dexaméthasone, β -glycérophosphate et d'acide ascorbique.

Quels que soient les résultats obtenus *in vitro*, en 2 ou 3 dimensions, en statique ou en dynamique, seules les études expérimentales chez l'animal permettront de valider ces nouveaux produits, élaborés ou non dans un milieu défini, avec ou sans contraintes mécaniques.

B. Article 3: Développement d'un milieu défini pour la différenciation ostéoblastique des ADSCs

Abstract

Mesenchymal stem cells extracted from adipose tissue are of increasing interest in cell-based bone tissue engineering. Animal serum is widely used for their culture, but its use in clinical applications is associated with too many risks. In this study we tried to develop a defined serum free medium (SFM) devoid of xenogenic components for osteogenic differentiation of ADSCs in order to use them in clinical applications. SFM is elaborated with a precise concentration of growth factors and cytokines. Cells are cultured during 15 days in basal medium (BM, negative control), standard osteogenic medium (OM, positive control) and in SFM. Data show that SFM induces a better cell vitality and metabolic activity than OM. Furthermore, SFM increases osteogenic differentiation of ADSCs relative to OM, as evidenced by cbfa/runx 2 expression which is a specific bone marker, ALP cytochemical coloration, enzymatic quantification and Von Kossa staining. In conclusion, defined serum free medium is suitable for replacement of medium containing animal serum for the osteogenic differentiation of ADSCs, providing a feasible alternative for tissue engineering with GMP-compatible protocols.

Keywords: adipose-derived stem cells, bone tissue engineering, animal serum, defined serum free medium, osteogenic differentiation

Introduction

There is an increasing interest of using stem cells in bone tissue engineering strategies [Seong et al., 2010]. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) represent a particularly attractive source for cellular therapy because of their high proliferation rate, their self renew and multipotent differentiation capability (adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, myocytes...) in presence of specific culture conditions [Jones and Yang, 2011] [Slater et al., 2008]. Mesenchymal stem cells can be extracted from several tissues including bone marrow, adipose tissue (Adipose-derived Stromal Cells) where there are present in large quantities [Utsunomiya et al.] [Zhu et al., 2008] [Zuk et al., 2002]. Their isolation, their expansion and their differentiation to a lineage required specific culture conditions associating biochemical and /or mechanical stimuli [Kim and Ma, 2011] [Vater et al., 2011].

However, for their clinical use, it is important to develop protocols in agree with good manufacturing practice (GMP) regulations, ensuring safety of medicinal products [Sensebe and Bourin, 2011] [Sensebe and Bourin, 2008].

Fetal calf serum (FCS) and fetal bovine serum (FBS) contain high levels of growth stimulating factors so they are widely used as supplements in cell culture. However, animal serum containing potentially xenogenic compounds and polypeptides which could induce potential risks of immunologic reaction and viral or prions disease transmission making it unsuitable for clinical applications [Tekkatte et al., 2011] [Heiskanen et al., 2007] [Tuschong et al., 2002]. To overcome these drawbacks, various human alternative products for hMSCs cultures have been considered [Sankaranarayanan et al., 2011] including human cord blood serum [Jung et al., 2009] and serum substitutes based on platelet derivatives [Bernardo et al., 2011] [Salvade et al., 2010] [Schallmoser et al., 2009]. A serum alternative should sufficiently mimic the properties of the serum in culture. However, few studies demonstrated that cell proliferation rate of the hMSCs is reduced in these alternative culture

conditions [Shahdadfar et al., 2005]. The composition and content of growth factors vary quite considerably in plasma and platelet concentrates, depending on the donor and preparation techniques used [Weibrich et al., 2002] and the exact chemical composition of these substitutes can't be known making them undesirable for clinical applications and also hampers analysis of the cell biological mechanisms that control cell behavior.

To date, there are a lot of defined media for hMSCs expansion [Bernardo et al., 2011] [Hudson et al., 2011] [Jung et al., 2011] [Brunner et al., 2010] which unlike serum, contain growth factors and various protein components at specific concentrations. These commercially available media claim to be able to maintain the basic characteristics of MSCs while sustaining differentiation potentials and colony formation potentials and also exhibiting superior proliferation potentials [Agata et al., 2009]. In the bone tissue engineering context, cells associated with a three dimensional (3D) scaffold could be either, osteogenically induced prior to their reimplantation [Schubert et al., 2011], or induced *in situ* in the 3D scaffold.

However, literature suggest that the nature, the composition of the scaffold, its 3D architecture could induce osteogenic differentiation of hMSCs, without osteoinductive and adhesive factors. However, according to the cell carriers, the use of specific growth factors as well as adhesive factors could be required for maintaining their cell viability, their adhesion and their function inside the scaffold. Then, with aiming to establish a cell bank, and to drive their phenotype in 2D or 3D cultures using GMP culture conditions, there is a real need to extend these investigations to the development of a serum free medium for osteogenic differentiation. As described in literature, only medium with human substitutes are developed for osteogenic differentiation to replace FBS and chemical composition is also unknown in this case [Felka et al., 2010] [Sun et al., 2008] while chemically defined medium are only used for expansion and just preserve cell osteogenic potential [Mimura et al., 2011] [Jung et al., 2011].

The aim of this study is to develop a new defined medium for osteogenic differentiation of human ADSCs, as a cell source for osteoprogenitor cells. The main advantages of using these adipose-derived stem cells include a reduced morbidity, an easy harvest and a greater abundance of mesenchymal cells compared to those from bone marrow. Their ability to differentiate towards osteoprogenitor and/or vascular endothelial cells has already been proved [Fischer et al., 2009] [Liu et al., 2011] [Neofytou et al., 2011]. The development of a new specific serum-free medium used for driving osteoblastic differentiation of these human ADSCs could offer important advances for bone tissue engineering and clinical applications.

In this work we have compared standard osteoinductive medium (OM), containing FBS and additive osteogenic factors with a new defined serum free medium for culturing and driving human ADSCs in conventional 2D cultures. Data obtained here shows that this new defined serum- free medium is more efficient than OM one for driving osteogenic differentiation of hADSCs and thereafter suitable for the clinical use of ADSCs in a bone tissue engineering context.

Material and methods

Isolation and culture of hADSCs

Human ADSCs were isolated and cultured as previously described [Bunnell et al., 2008] with minor modifications. Briefly, human adipose tissue was obtained from patients undergoing liposuction. Tissue samples were minced and digested in a solution of 0.1% (w/v) collagenase type I (Worthington, Lakewood, NJ, USA) for 1.5 h at 37 °C with vigorous shaking. After filtration and

centrifugation, the top lipid layer was removed and the remaining Stromal Vascular Fraction (SVF) was treated for 10 min with ELB (Erythrocyte Lysis Buffer; 155 mM NH₄Cl (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5.7 mM K₂HPO₄, 7.4 mM K₂HPO₄-3H₂O, 0.1 mM EDTA (all Sigma-Aldrich)) and then centrifuged. The pellet was resuspended in basal medium (BM): DMEM F12 medium (Invitrogen/Life Technologies, Serigny Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, Basel, Switzerland) and sequentially filtered through 100, 70 and 40 µm cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). Culture medium was replaced every three days. hADSCs are selected by their adhesion properties on culture dishes plastic.

Cell culture conditions for osteoblastic differentiation of hADSCs

A defined serum free medium (SFM) was developed for inducing hADSCs osteoblastic differentiation. Its exact composition cannot be revealed, but it contains human albumin, antioxidant, minerals, nucleosides, recombinant insulin, αMEM and osteogenic factors: TGF-β1 (Transforming Growth Factor β1) 5ng/ml, IGF1 (Insulin Growth Factor 1) 50ng/ml, dexamethasone 10⁻⁷M, β-glycerophosphate 1 mM, Vitamin C-2 phosphate 50 mg/L.

After expansion in basal medium in presence of serum, hADSCs were plated at a cell density of 2 x 10⁴ cells/ cm² on culture dishes coated with 2.5 µg/ml fibronectine (from human placenta, Millipore) and 2.5 µg/ml type I/III collagen (from human placenta, ABCell-Bio) and osteogenically induced with this serum free medium during 15 days. Culture medium was replaced every three days.

In parallel, ADSCs were osteogenically induced with the conventional osteogenic medium (OM) containing IMDM (Invitrogen) supplemented with 10 % (v/v) FBS, 10 mM β-glycerophosphate, 10⁻⁸M dexamethasone, and 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich). This medium was used as positive reference for hADSCs osteoblastic differentiation.

Cell viability assessment and metabolic activity in the serum free medium

Cell viability

The viability of cells cultured within the serum free medium was investigated at different times of culture (1, 4, 7, 10 and 15 days) using neutral red which easily penetrates the cell membranes and accumulates in lysosomes of viable cells but excluded from dead cells. Briefly, cells were rinsed with Hank's buffer 0.1 M pH 7.4 and incubated with diluted neutral red solution (1/80° in DMEM+10% FBS) for 3 hours at 37°C. Supernatant was removed and cells were rinsed in Hank's buffer. Cells were lysed with acetic acid solution (acetic acid 1% (v/v) and ethanol 50% (v/v)) and absorbance was measured spectrophotometrically at 540 nm.

Metabolic activity

Metabolic activity of cells cultured in SFM was quantified using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2 yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) assay (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) at different times of culture (1, 4, 7, 10 and 15 days). Culture medium was removed and cells were rinsed with PBS 0.1 M pH 7.4. MTT was added (1mg/ml) at 37 °C for 3 h. Cells were washed with PBS and the insoluble formazan salt accumulated inside the cells was solubilized with DMSO and quantified spectrophotometrically at 540 nm.

Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

hADSCs were harvested with trypsin-EDTA (0.125 % (w/v) – 0.0625 % (v/w), Sigma-Aldrich) after 7 days of culture. Total RNA were extracted using the Nucleospin[®] RNA kit (Macherey- Nagel, Düren, Germany). One µg was used as template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco, Paisley, UK) in a 20 µl final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 µg oligo(dT), and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42 °C for 50 min, the reaction was stopped at 70 °C for 15 min. Five µL of cDNA diluted at a 1:80 ratio were mixed to MESA-green (2X, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and 10 µM each of forward and reverse primers of *cbfa/runx2* (forward 5' TCA CCT TGA CCA TAA CCG TCT 3' reverse 5' CGG GAC ACC TAC TCT CAT ACT 3', TM 58°C) in a 25 µL final volume and loaded in a 96-well plate. Amplification was performed using the thermocycler (iCycler, Biorad, Hercules, CA, USA). Data were analyzed with the iCycler IQ[™] software and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each Q-PCR was performed in triplicate. Briefly, the mean C_t value of target gene was normalized to its averaged C_t values of the housekeeping gene P0 to give a ΔC_t value, which was further normalized to control samples to obtain a $\Delta\Delta C_t$ value.

Alkaline phosphatase (ALP) assay

Intracellular ALP activity was detected in hADSCs according to the technical support of the SIGMA diagnostic kit (85L-2) using the conversion of a colorless *p*-nitrophenyl phosphate to a colored *p*-nitrophenol (Sigma, Aldrich). After 15 days of culture in BM, OM or SFM, cells were fixed with paraformaldehyde 4% (v/w) and stained with alkaline dye (Fast blue RR salt supplemented with Naphtol AS-MX phosphate alkaline solution 0.25%, Sigma, Aldrich) for 30 min. Samples were observed with optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

Intracellular ALP activity was quantified on cell lysate as described by [Ackerman, 1962]. After 1, 7 or 15 days of culture in BM, OM or SFM, cells were harvested with trypsin-EDTA (0.125 % (w/v) – 0.0625 % (v/w), Sigma-Aldrich) and lysed by sonication. Alkaline buffer (Alkaline buffer solution 1.5M, (Sigma-Aldrich) and Triton X100 and *p*-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma-Aldrich)) was added to the sample and incubated at 37 °C for 30 min. Then, after addition of NaOH 0.1 M to stop the enzymatic reaction, the absorption at 410 nm is measured spectrophotometrically. ALP activity levels were normalized to the amount of protein in each sample. The protein quantification was performed according to the BCA (BicinChonic Acid) protein assay protocol (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) described by Smith *et al.* [Smith et al., 1985]. Absorbance was read at 550 nm. ALP activity was expressed as nanomoles of inorganic phosphate (Pi) cleaved in 30 min per microgram of proteins.

Von Kossa staining

Von Kossa staining was performed to assess the level of calcium deposition by the hADSCs cultured in different medium. After 15 days of culture in BM, OM or SFM, cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde and incubated with silver nitrate 2.5% (w/v) for 30 min at room temperature in the dark. Silver nitrate was removed then cells were rinsed with distilled water. Carbonate sodium/formalin solution (25 mL formalin, 5 g Na₂CO₃, 100 mL distilled water) was added to the cells for 1 min and cells were rinsed with tap water. Extracellular matrix coloration was observed with an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

Statistical analysis

Data are represented as the mean $\pm$ standard deviation resulting from independent experiments. Statistical significance of differences between data from experimental groups was tested using a non-parametric Mann Whitney test. A $p < 0.05$ (*) was considered to be statistically significant.

Results

Cell morphology

After 15 days of culture, hADSCs cultured in SFM appear in a more cuboidal shape (Figure 1C) than cells cultured in BM (Figure 1A) or OM (Figure 1B) exhibiting a fibroblastic shape. Furthermore, cells cultured in SFM seem to produce more extracellular matrix than in the other condition (Figure 1C).

Cell viability and metabolic activity

Neutral red assay (Figure 2A) reveals that SFM culture contains significantly more viable cells than cultures in BM and OM from day 4 to 10. At day 15, the number of viable cells increases in OM relative to BM but there is no significant difference between the number of viable cells in OM than in SFM culture conditions.

Quantification of the metabolic activity of hADSCs (Figure 2B) revealed that, from day 4 to 15, cells exhibit a higher metabolic activity in SFM culture conditions than in BM and OM ones. Until day 10, there is no significant difference between metabolic activity of cells cultured in BM and those cultured in OM. After 15 days of culture, OM increases the metabolic activity of hADSCs compared to BM conditions but the cell activity remains lower than in SFM culture conditions.

Osteogenic marker expression

The mRNA level of *cbfa/runx2* was quantified after 7 days of culture in BM, OM and SFM. Figure 5 revealed that SFM culture conditions induce a higher expression of the early bone specific osteoblastic differentiation marker, *cbfa/runx2*, considered as the master gene of osteoblastic differentiation. The mRNA level of *cbfa/runx2* at day 7 relative to BM conditions at day 1, is about 1.75 ± 0.25 , 2.22 ± 0.1 and 8.04 ± 1.17 fold higher in BM, OM and SFM conditions, respectively.

Alkaline phosphatase cytochemistry

ALP cytochemistry analysis of hADSCs after 15 days of culture demonstrated an elevated ALP activity in SFM conditions with more positive cells, organized in cell clusters (Figure 3C) compared to BM (Figure 3A) and to OM culture conditions (Figure 3B).

ALP enzymatic activity quantification reveals that cells cultured in SFM conditions exhibit a higher ALP activity than cells cultured in the two others conditions at each time of culture. The ALP activity reaches the maximal of activity after 7 days of cultures in SFM (Figure 3D). In contrast, from day 1 to 7, there is no significant difference between ALP activity of cells in BM and in OM, the positive effect of the OM appears only at day 15 (Figure 3D).

Mineralisation assay

Von Kossa staining (Figure 4) reveals that cells cultured in SFM conditions during 15 days exhibit higher presence of black calcium deposits in the extracellular matrices, in comparison with BM and OM culture conditions.

Discussion

Human Mesenchymal stem cells are cell material of choice for bone tissue engineering. In this context, cells have to be osteogenically induced in GMP conditions for their use in clinical applications [Sensebe et al., 2011] [Sensebe, 2008].

In this study, we have developed a chemically defined serum-free medium for the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human adipose tissue. The ideal serum-free chemically defined must be able to promote adhesion, proliferation and expansion without altering their inherent cellular characteristics or permitting the cells to enter an early replicative senescence [Tekkatte et al., 2011]. In general, chemically defined medium for culturing adherent cell lines such as hMSCs are made with a basal medium such as DMEM α -MEM supplemented with albumin, FDA approved growth factors, attachment factors, hormones, lipoproteins, and trace elements. These components are essential for proliferation, maintenance of phenotype and cellular functions and for differentiation. The selection of the additives and their concentrations, especially the growth factors, is crucial since they can considerably modify the cellular functions. For example, bFGF can enhance proliferation and osteogenic differentiation [Sotiropoulou et al., 2006], although TGF- β does not play a significant role in cell proliferation, only the synergistic effect with PDGF and bFGF results in better growth and survival of hMSCs [Ng et al., 2008] [Chase et al., 2010]. So it will be necessary to develop a medium for each cell type considered and for each application. In this study, the serum free medium contains a specific cocktail of growth factors known to induce osteogenic differentiation.

Serum naturally contains proteins allowing cell adhesion on plastic flasks, but with serum free medium, a specific coating of culture dishes is needed. Its most often fibronectin or collagen type I or III mimicking MEC promoting cell attachment, expansion and differentiation [Tekkatte et al., 2011]. Other cost-effective solution consists in gelatin coating [Yang et al., 2009] [Mimura et al., 2011]. But solutions have to be found to avoid the use of these animal proteins, like use of recombinant protein or peptidic sequence like RGD known to promote cell adhesion. Among others factors, serum albumin is the most commonly added protein in chemically defined medium, which transports lipoproteins into cells. Hormones such as hydrocortisone are also added since they are also essential for cell growth. Mineral and others molecules involved in cellular pathways are also required as additives in chemically defined media for the *in vitro* culture of cells, there are present in trace but can regulate cell division and differentiation [Hill and Treisman, 1995].

When being differentiated into osteoblasts, MSCs evolve in a fibroblastic to a cuboidal morphology, produce extracellular matrix (ECM), mainly composed of type I collagen, cells exhibit ALP activity, an enzyme involved in the ECM mineralization, and in a later stage of osteogenic differentiation, cells form aggregates or clusters that can be stained positively by Von Kossa techniques [Vater et al., 2011].

In this study it appears that cells cultured in SFM have a cuboidal morphology and produce more ECM than in OM condition. Human ADSCs cultures in SFM conditions contain higher number of viable cells than in BM and OM conditions and the cell number significantly increases over culture time, suggesting a proliferation activity. Furthermore, cells in SFM conditions present an increase of their metabolic activity over time and relative to OM conditions. Here, the metabolic activity reflects the activation of osteogenic differentiation.

At the molecular level, the osteogenic differentiation is controlled by transcription factors. Cbfa1/runx 2 is an osteoblastic transcriptional activator, identified as a key regulator of osteoblastic differentiation. By binding to specific promoters, it stimulates activation of mostly osteoblastic genes

(type I collagen, osteopontin, osteocalcin) [Nakashima et al., 2002]. In the present study, we found that *cbfa1/ runx 2* is upregulated in SFM cultures after only 7 days of culture. In the same context, ALP activity, an enzyme considered as an early bone marker, detected here by cytochemical staining and quantified by colorimetric assay, is higher in hADSCs cultured in SFM culture conditions than in OM ones. Furthermore, the higher deposition of calcium in the SFM culture conditions, confirmed the mineralization of the ECM. Shortening the time required to initiate osteogenic differentiation in SFM is a major asset for clinical transfer.

Taking together, both metabolically activity, and phenotype analysis demonstrated that this new defined serum-free medium induces both early and late osteoblastic marker expression, better than an osteoinductive does.

In conclusion, this defined culture serum-free medium provides safe and therapeutic-quality for hADSCs cultures, increasing their biological properties, their proliferation and osteogenic differentiation capabilities. We have clearly demonstrated that SFM can fully replace OM as osteogenic culture medium for clinical-scale human ADSCs differentiation in a bone tissue engineering context.

In this study, ADSCs expansion is made in basal medium containing serum so further studies will be need to develop serum free medium for isolation and expansion and animal protein-free products for passaging cells before clinical use [Carvalho et al., 2011] [Mimura et al., 2011]. Moreover, in case of cells cryopreservation, serum free congelation medium must be also developed.

To date, this study has been conducted only in 2 dimensional configuration and to our knowledge no studies tried to assess the osteogenic differentiation of ADSCs in three dimensional scaffolds adapted for bone tissue engineering in serum free conditions. In previous studies we have shown that 3D culture of ADSCs associated with a macroporous polysaccharide-based scaffold under dynamic conditions enhance their osteogenic differentiation without any osteogenic additives, thanks to the cell aggregate conformation in the matrix favoring cell to cell interactions. Preliminary results demonstrate that this cell conformation is not altered by their culture in presence of this chemically defined medium even in absence of scaffold coating with adhesion molecules. Further studies are needed to highlight a benefice on cell osteogenic differentiation in this serum free culture conditions. However, Hee et al. [Hee et al., 2006] succeed in osteogenically differentiate dermal fibroblast in aggregate conformation within a three dimensional scaffold which encourages us for the development of a bone tissue engineering product composed of ADSCs associated with a polysaccharide based scaffold and cultured in GMP conditions for clinical application. But a major drawback of these chemically defined serum free medium is their elevated price which could be overcome by synthesizing the cytokines as clinical-grade recombinant proteins on a large scale, while at the same time optimizing the economy of production of these therapeutic-quality reagents.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, University Bordeaux Segalen, Universities Paris 7 and 13, “Délégation Générale de l’Armement” (DGA), and by grants from the French National Research Agency (ANR-07-TecSan-011-01 ITOV; ANR-09-EBIO-001 3D Cell). Thanks to ICELTIS (Toulouse, France) for providing human adipose-derived stromal cells.

References

- Ackerman GA. 1962. Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leukocyte alkaline phosphatase activity. *Lab Invest* 11:563-7.
- Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H. 2009. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 382:353-8.
- Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, Cristantielli R, Palumbo G, Locatelli F. 2011. Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:73-81.
- Brunner D, Frank J, Appl H, Schoffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex* 27:53-62.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45:115-20.
- Carvalho PP, Wu X, Yu G, Dietrich M, Dias IR, Gomes ME, Reis RL, Gimble JM. 2011. Use of animal protein-free products for passaging adherent human adipose-derived stromal/stem cells. *Cytotherapy* 13:594-7.
- Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. 2010. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1:8.
- Felka T, Schafer R, De Zwart P, Aicher WK. 2010. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 12:143-53.
- Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I, DiMuzio PJ. 2009. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 152:157-66.
- Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB. 2006. Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 27:875-84.
- Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. 2007. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202.
- Hill CS, Treisman R. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
- Hudson JE, Mills RJ, Frith JE, Brooke G, Jaramillo-Ferrada P, Wolvetang EJ, Cooper-White JJ. 2011. A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells Dev* 20:77-87.
- Jones E, Yang X. 2011. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 42:562-8.
- Jung J, Moon N, Ahn JY, Oh EJ, Kim M, Cho CS, Shin JC, Oh IH. 2009. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells Dev* 18:559-71.
- Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA. 2011. Human mesenchymal stem cell culture: rapid and efficient isolation and expansion in a defined serum-free medium. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Kim J, Ma T. 2011. Perfusion regulation of hMSC microenvironment and osteogenic differentiation in 3D scaffold. *Biotechnol Bioeng*.

- Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng Z, Jin Y. 2011. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A* 17:725-39.
- Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. 2011. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 55:181-7.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29.
- Neofytou EA, Chang E, Patlola B, Joubert LM, Rajadas J, Gambhir SS, Cheng Z, Robbins RC, Beygui RE. 2011. Adipose tissue-derived stem cells display a proangiogenic phenotype on 3D scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 98:383-93.
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112:295-307.
- Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, Perseghin P, Serafini M, Zatti G, Biondi A, Biagi E. 2010. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods* 16:201-14.
- Sankaranarayanan K, T C, G GP, V M, U P, Renny CM, Raghavan U, R SB, Guhathakurta S, M CK. 2011. Humanised substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation. *Cell Biol Int*.
- Schallmoser K, Rohde E, Bartmann C, Obenauf AC, Reinisch A, Strunk D. 2009. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed Mater Eng* 19:271-6.
- Schubert T, Xhema D, Veriter S, Schubert M, Behets C, Delloye C, Gianello P, Dufrane D. 2011. The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*.
- Sensebe L. 2008. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 18:S3-10.
- Sensebe L, Bourin P. 2008. Producing MSC according GMP: process and controls. *Biomed Mater Eng* 18:173-7.
- Sensebe L, Bourin P. 2011. Cellules souches mésenchymateuses: production à usage clinique et contraintes sécuritaires. *médecine/sciences*:297-302.
- Sensebe L, Bourin P, Tarte K. 2011. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 22:19-26.
- Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 5:062001.
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinckmann JE. 2005. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357-66.
- Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT. 2008. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 8:885-93.

- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:462-71.
- Sun X, Gan Y, Tang T, Zhang X, Dai K. 2008. *In vitro* proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous plasma derived from bone marrow. *Tissue Eng Part A* 14:391-400.
- Tekkotte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. 2011. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int* 2011:504723.
- Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. 2002. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 13:1605-10.
- Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y, Iwaguro H. Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. *Surg Today* 41:18-23.
- Vater C, Kasten P, Stiehler M. 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7:463-77.
- Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. 2002. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30:97-102.
- Yang C, Frei H, Rossi FM, Burt HM. 2009. The differential *in vitro* and *in vivo* responses of bone marrow stromal cells on novel porous gelatin-alginate scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 3:601-14.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. 2008. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 26:664-75.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-95.

Figures and legends

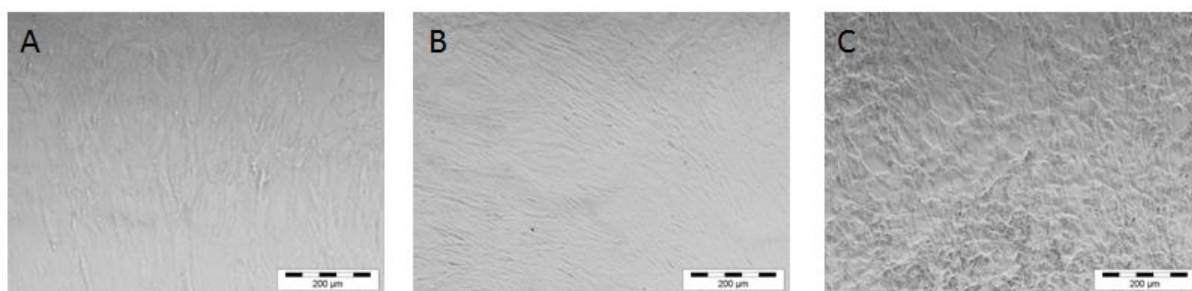


Figure 1: ADSCs morphology. Optical microscopy observations of primary ADSCs after 15 days of culture in A) BM, B) OM and C) SFM (objective x10). Scale bar = 200µm.

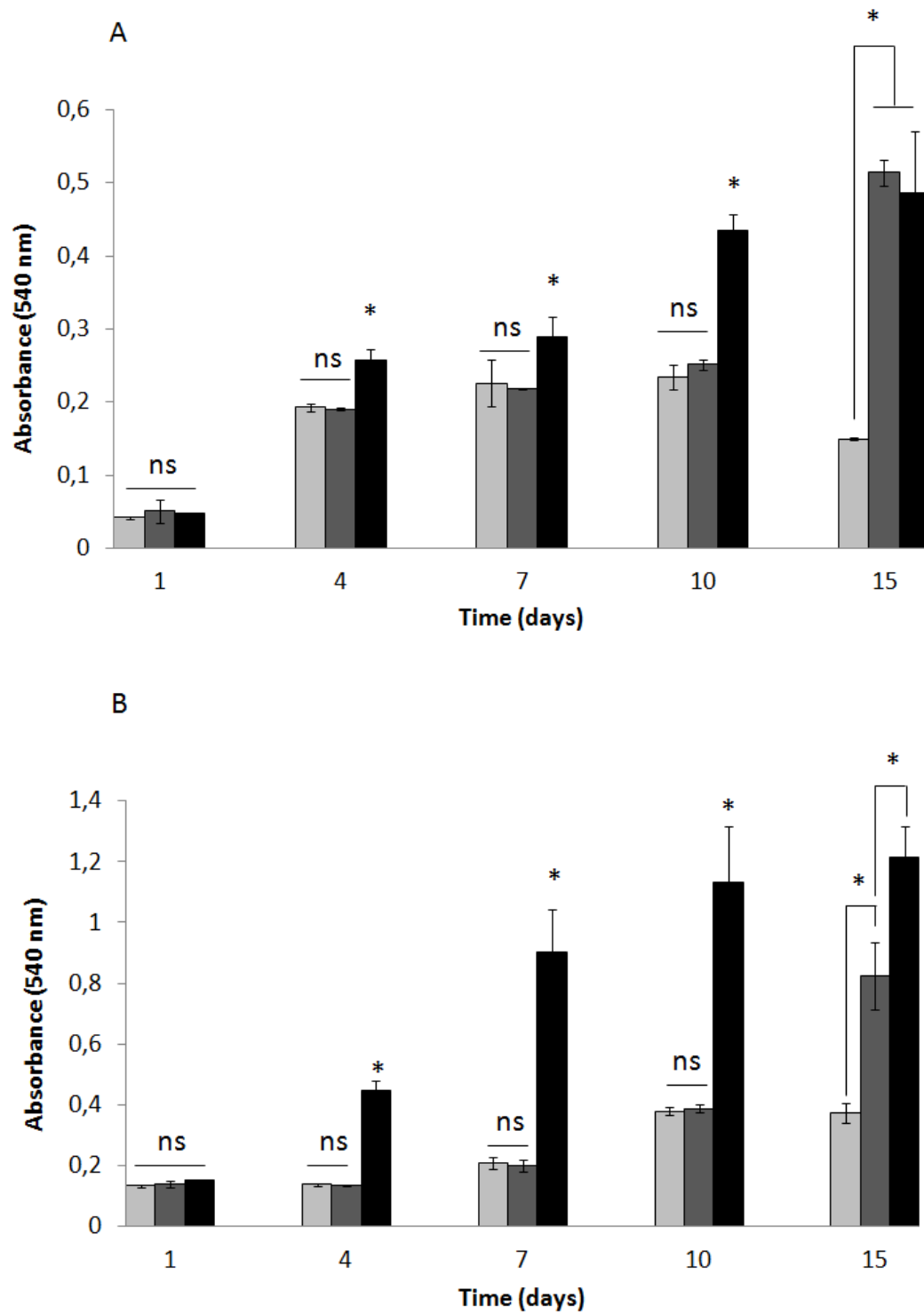


Figure 2: Cell viability and metabolic activity. After different time of culture (1, 4, 7 and 15 days) in BM (grey), OM (grey grey) and SFM (black), ADSCs viability was revealed by neutral red staining (A), (n=5) and metabolic activity was assessed by MTT assay (B), (n=5).

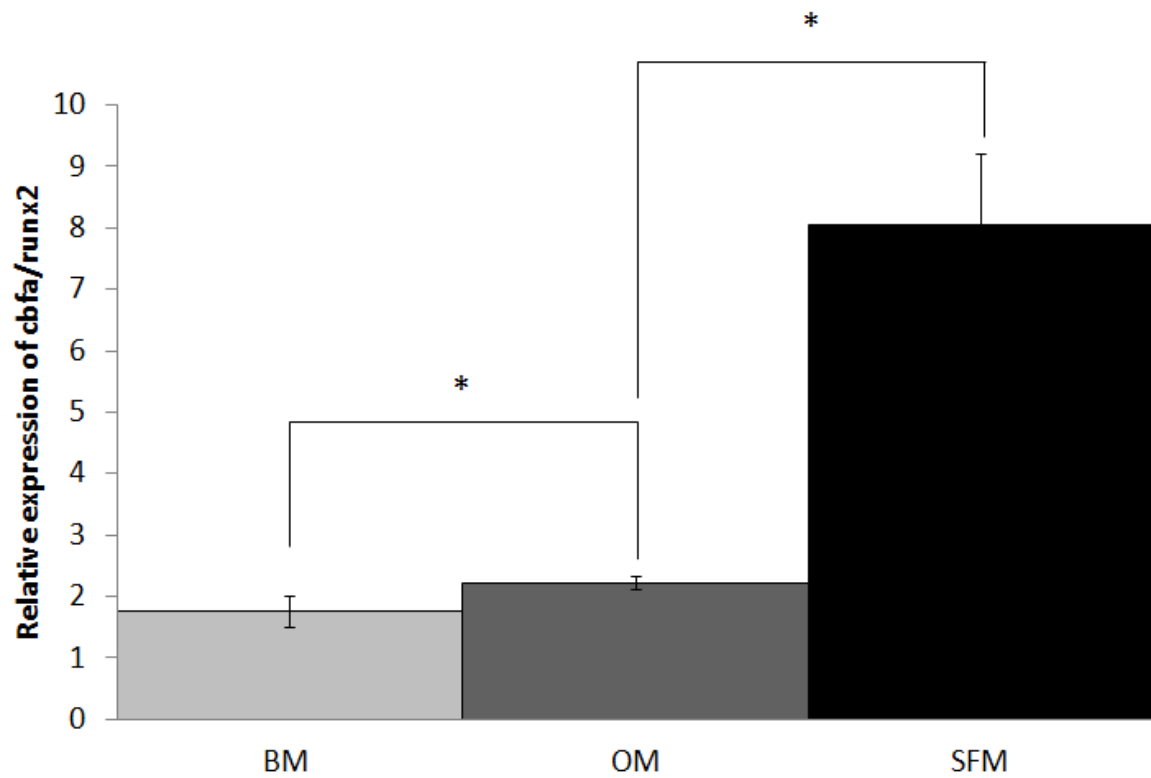


Figure 3: Osteogenic marker expression. Relative expression of mRNA levels of bone specific marker, cbfa/runx2 in ADSCs after 7 days of culture in BM (grey), OM (grey grey) and SFM (black). Data was quantified relative to cbfa/runx2 gene expression of hADSCs cultured in BM at day 1 standardized to 1, (n=2 or 3).

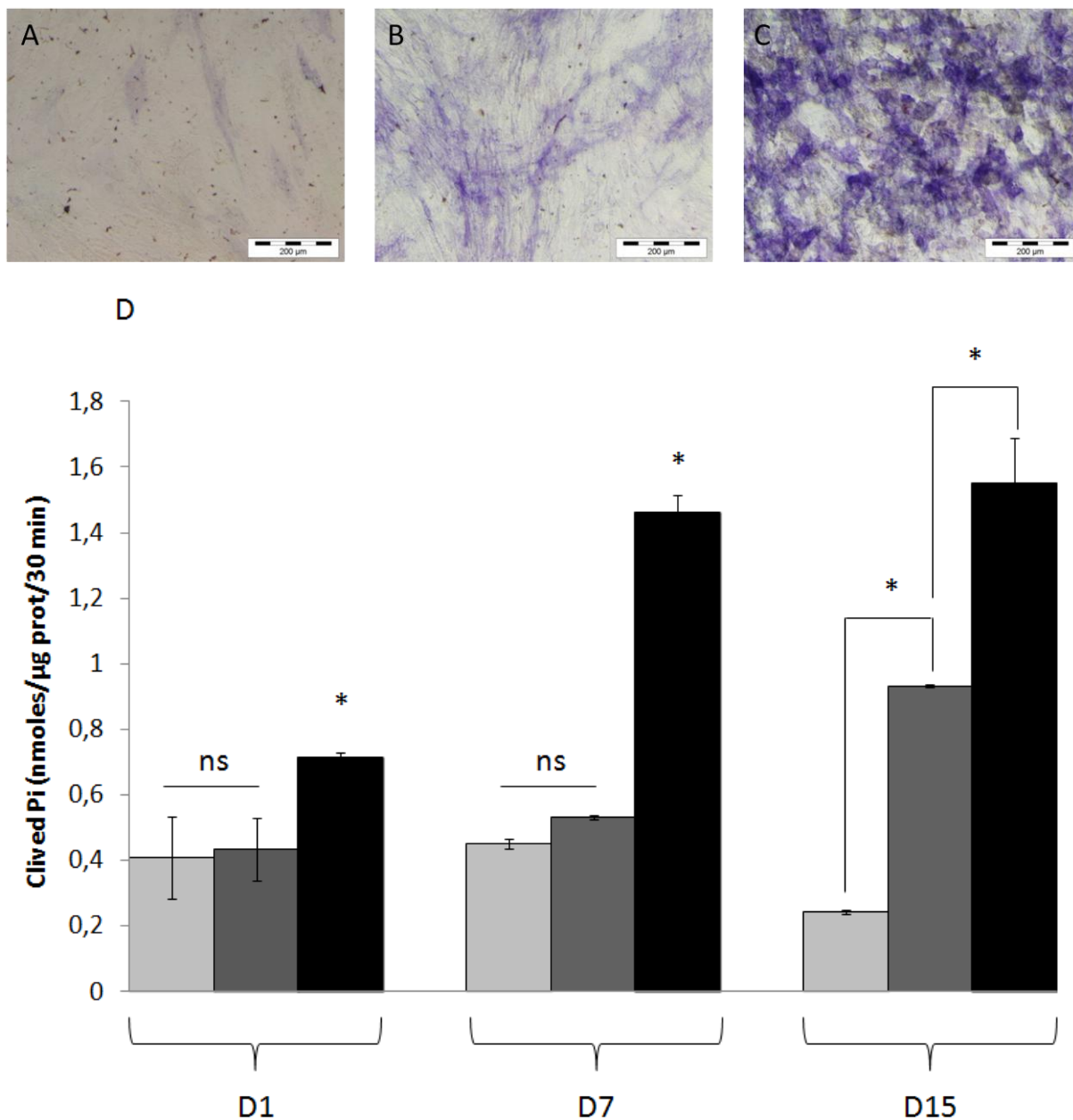


Figure 4: Alkaline phosphatase assay. ALP cytochemical staining of ADSCs after 15 days of culture in BM (A), OM (B), and SFM (C) (objective x 10). Scale bar = 200 μm). (D) ALP enzymatic activity was quantified in ADSCs after 1, 7 and 15 days of culture in BM (grey), OM (grey grey) and SFM (black), (n=4).

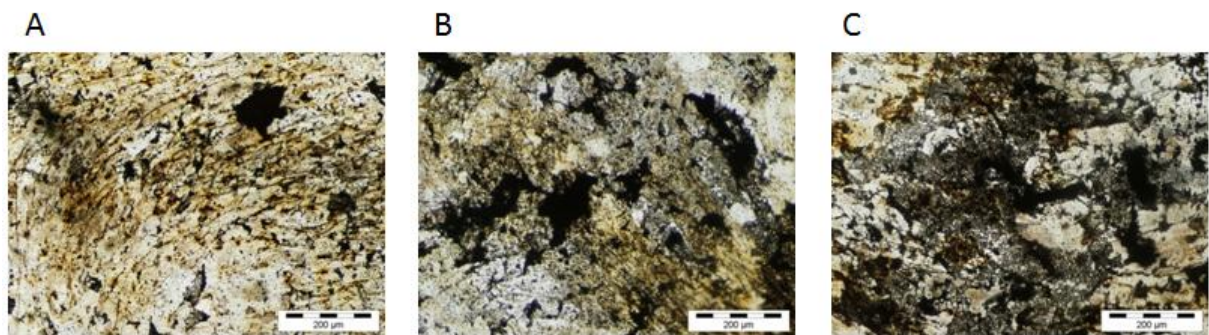


Figure 5: Extracellular matrix mineralization assay. Von Kossa staining of ADSCs culture after 15 days in BM (A), OM (B) and SFM (C) (objective x10). Scale bar = 200 μm .

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons validé, en collaboration avec l'industriel ABCell-Bio, un milieu défini pour la différenciation ostéoblastique des ADSCs en condition GMP.

Ce milieu contient un cocktail de facteurs de croissance spécifiques à la différenciation ostéoblastique. Le choix de ces facteurs et leur concentration sont des paramètres essentiels pour assurer la fonction et la spécificité cellulaire.

Cependant, l'inconvénient majeur d'un milieu dépourvu de sérum est l'absence de protéines permettant l'adhérence cellulaire. Il est donc indispensable d'utiliser un revêtement spécifique sur les plastiques de culture afin de promouvoir l'adhérence cellulaire. Il s'agit en général de revêtements composés de protéines, telles que la fibronectine ou le collagène de type I et/ou III recréant les propriétés structurales et fonctionnelles de la matrice extracellulaire. Dans notre étude, les concentrations des protéines utilisées ont été optimisées.

Les résultats de cette étude montrent que les ADSCs sont capables de s'orienter vers la voie ostéoblastique en présence de ce milieu défini, de façon plus importante et plus rapide qu'en présence d'un milieu de différenciation contenant du sérum animal, et des facteurs ostéogéniques tels que la dexaméthasone, l'acide ascorbique et le β -glycérophosphate.

Ces résultats devraient donner lieu à la création d'une fiche technique par la société ABCell-Bio.

Cependant, afin de permettre une utilisation clinique, l'extraction des cellules à partir du tissu, ainsi que leur expansion, doivent également se faire dans des conditions de culture dépourvues de sérum. Il sera donc nécessaire de développer un milieu défini adapté à ces deux étapes.

En ce qui concerne les perspectives de ce travail, l'efficacité et l'influence de ce milieu défini sur la différenciation ostéoblastique des ADSCs devra être démontré dans un système tridimensionnel. Des résultats préliminaires (Figure 49) montrent qu'en présence de ce milieu défini, les ADSCs adoptent le même comportement au sein du biomatériau, à savoir l'organisation en agrégats dans les pores de la matrice. Dans ce cas, aucun revêtement préalable n'est à réaliser sur la matrice. La différenciation ostéogénique en 3D des ADSCs dans ce milieu défini devra être confirmée.

Enfin, l'implantation de ce produit d'ingénierie tissulaire, cultivé dans des conditions de culture GMP, sera une étape essentielle pour valoriser sa capacité de néoformation osseuse en site orthotopique.

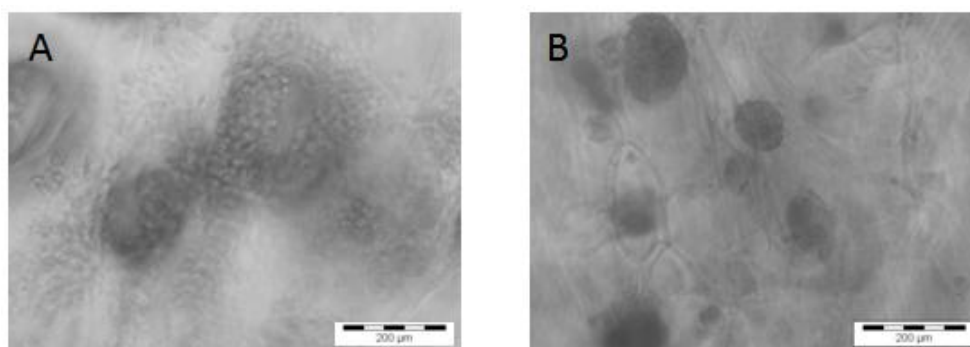


Figure 49. Observations microscopiques de cellules ADSCs au sein de la matrice polysaccharidique en présence de milieu défini à J0 (A) et à J1 (B).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons développé un nouveau produit d'ingénierie tissulaire (PIT) destiné à la régénération osseuse, composé de cellules souches adultes issues du tissu adipeux humain associées à une matrice macroporeuse de polysaccharides.

Les principaux résultats de ce travail sont les suivants :

Dans un premier temps, l'interface entre les cellules souches humaines mésenchymateuses issues du tissu adipeux avec la matrice de polymère a été caractérisée. Les résultats de l'article 1 montrent que la structure et la composition de cette structure 3D macroporeuse, permettent aux cellules de s'organiser en agrégats au sein des pores du matériau et activent la différenciation ostéoblastique des ADSCs. Dans cette conformation, les échanges entre les cellules semblent favorisés grâce à des jonctions intercellulaires, faisant intervenir des protéines, telles que la connexine 43 connue pour réguler la différenciation ostéoblastique. Cette conformation en agrégats multicellulaires pourrait être à l'origine d'une activation de la différenciation ostéoblastique (collagène de type 1, phosphatase alcaline, ostéocalcine, minéralisation de la matrice extracellulaire), observée en absence de tout facteur ostéogénique et tout facteur inducteur de la minéralisation. Le rôle de ces jonctions intercellulaires sur l'induction des marqueurs ostéoblastiques dans les cultures 3D au sein de ces matrices de pullulane et de dextrane, devra être démontré par des essais d'inhibitions de ces protéines de jonctions. Ceci nous permettra d'établir une relation entre la formation de ces sphéroïdes et un phénomène de différenciation ostéoblastique.

De plus, lorsque ces biomatériaux cellularisés sont placés dans l'enceinte d'un bioréacteur à perfusion, nous avons pu observer une très forte augmentation de l'expression des marqueurs ostéoblastiques, par rapport à la culture statique de ces mêmes matrices. La perfusion à travers les matrices cellularisées permettrait en particulier une meilleure circulation des nutriments, une oxygénation, une élimination des déchets et pourrait ainsi renforcer les interactions cellule-cellule, comme le prouve l'expression augmentée de la connexine 43 dans ces conditions dynamiques de culture.

Ainsi, nous avons créé un environnement structurel et dynamique propice à la culture et à la différenciation ostéoblastique des ADSCs, en absence de facteurs ostéogéniques. Cette matrice peut ainsi servir de vecteur cellulaire pour l'ingénierie osseuse ou comme système de délivrance de cellules.

Afin de suivre *in vivo* le devenir des ADSCs implantées, nous avons mis au point un marquage cellulaire à l'aide de nanoparticules superparamagnétiques permettant un suivi non invasif par IRM. Les résultats de l'article 2 montrent que l'IRM permet de suivre les cellules au sein du produit d'ingénierie tissulaire pendant un mois après implantation en site ectopique. Par ailleurs, cette même technique d'imagerie permet de montrer que la matrice est capable de délivrer les cellules au niveau du site implantatoire. Ces mêmes techniques d'imagerie devront être utilisées après implantation de ce produit d'ingénierie tissulaire en site osseux. Il faudra également utiliser d'autres approches méthodologiques, telles que l'immunohistochimie ou l'hybridation *in situ* pour visualiser les cellules humaines implantées, les cellules du tissu hôte et leur réelle participation à un processus de régénération osseuse.

Des études *in vivo* devront être réalisées afin d'évaluer la capacité de régénération osseuse de ce produit d'ingénierie tissulaire, après implantation chez le petit animal :

- en site non osseux pour évaluer leur potentiel ostéoinducteur,
- en site osseux afin de mettre en évidence un processus d'ostéoconduction.

Ces essais sont actuellement en cours chez la souris nude. Une première série d'expérimentations a été réalisée à partir des produits d'ingénierie tissulaire générés en conditions statiques de culture. Ces résultats devront être comparés à une deuxième série d'implantation des produits d'ingénierie tissulaire générés en conditions dynamiques, compte tenu des différences d'induction ostéoblastique observées in vitro.

Enfin, avant d'envisager une utilisation clinique des ADSCs en ingénierie du tissu osseux, qu'elles soient ou non véhiculées par une structure 3D, il était nécessaire de développer un milieu défini, élaboré en condition GMP, permettant de stimuler la différenciation ostéoblastique de ces cellules souches mésenchymateuses.

Ce milieu défini, sans sérum, a été développé par la société ABCell-Bio. Nous avons au cours de ce travail de thèse, étudié la capacité de différents lots de milieux à induire la différenciation ostéoblastique des ADSCs. Nous avons validé l'efficacité d'un de ces lots, les résultats sont présentés dans le troisième article. Ce milieu défini, sans sérum, appelé SPE- IV, semble tout aussi efficace pour activer la différenciation des ADSCs humaines, que des milieux de culture contenant du sérum de veau fœtal, des facteurs ostéogéniques ou ceux favorisant la minéralisation osseuse. La prochaine commercialisation de ce milieu de culture SPE-IV constitue un premier pas vers l'utilisation clinique de ces ADSCs pour des applications en ingénierie osseuse.

Ainsi, dans ce travail, nous avons essayé de réunir les différents paramètres qui contribuent au développement d'un produit d'ingénierie tissulaire. Cette matrice macroporeuse de polymères permet la culture d'ADSCs, leur orientation vers le lignage ostéoblastique grâce à l'action synergique de contraintes :

- structurales (matrice 3D),
- mécaniques (bioréacteur à perfusion),
- et biochimiques (milieux de différenciation).

Cependant, un des paramètres n'a pas été étudié dans ce travail : il concerne l'apport vasculaire, essentiel à toute activité ostéogénique et à tout phénomène de régénération osseuse.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les échecs rencontrés lors de la régénération osseuse guidée par les biomatériaux sont en partie liés à un défaut de vascularisation de ces implants. Une des stratégies pouvant être mise en place afin de pallier à ce problème est la pré-vascularisation des biomatériaux *in vitro*, avant implantation. Cette technique consiste à associer des cellules endothéliales progénitrices ou matures avec des ostéoprogéniteurs. Des études *in vitro* ont montré que ces matrices utilisées dans ce travail permettraient la culture de cellules endothéliales [Thébaud et al., 2007]. Enfin, des études *in vivo* chez le petit animal ont démontré que ces matrices permettaient la formation d'un néo-tissu vasculaire [Chaouat et al., 2006]. Cette structure 3D semble donc adaptée à cette application.

Dans ce contexte, plusieurs voies sont actuellement explorées au laboratoire.

Des progéniteurs endothéliaux issus de sang de cordon humain (EPCs) ont été associés à des CSMs de moelle osseuse au sein des matrices de polysaccharides. Ce travail a fait l'objet du stage de Master 2 de Biologie Cellulaire et Physiologie de J. Guerrero. Des cellules exprimant la TdTomato (EPCs-TdTomato) ou encore la Green Fluorescent Protein (GFP) (HBMSCs-GFP) ont été préparées par infection lentivirale afin de distinguer ces deux types cellulaires en 3D, dans des modèles de coculture. Comme dans le cas des monocultures, ces deux types cellulaires forment des agrégats dans les pores de la matrice de pullulane et de dextrane (Figure 50). De façon surprenante, les EPCs s'organisent dans ces agrégats, autour des cellules mésenchymateuses (HBMSCs) (Figure 50B). Le rôle de cette distribution cellulaire devra être clarifié, en particulier par les interactions cellule-cellule qu'elle peut susciter. Un immunomarquage de la Cx43 entre ces EPCs et ces HBMSCs laisse présager de ces interactions en 3D (Figure 51). Ces résultats devront être confirmés et poursuivis à la fois dans des conditions statiques de culture et surtout dynamiques.

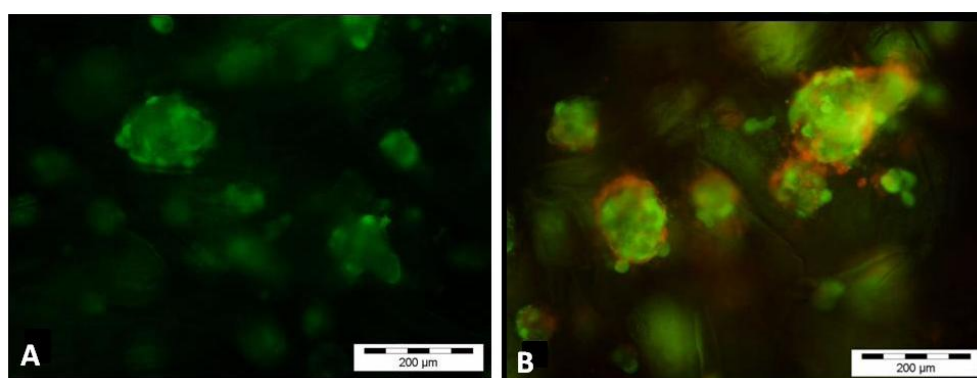


Figure 50. Observation microscopique de la distribution des cellules souches mésenchymateuses issues du stroma de la moelle osseuse humaine (HBMSCs) en monoculture (A) et en coculture avec des progéniteurs endothéliaux issus du sang de cordon humain (EPCs) (B) au sein de la matrice, 24h après l'ensemencement. Dans ce travail, Les EPCs-TdTomato apparaissent en rouge et les HBMSCs-GFP apparaissent en vert.

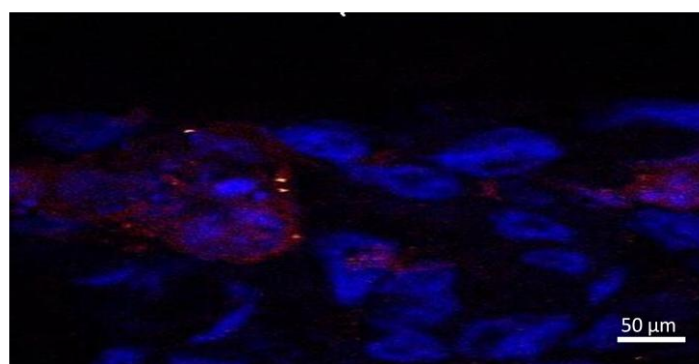


Figure 51. Observation au microscope confocal de l'immunomarquage de la Cx43 sur une cryocoupe de matériau cellularisé par les deux types cellulaires (HBMSCs et EPCs). Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu. Les EPCs -TdTomato apparaissent en rouge, et quelques points de marquage alignés, spécifiques du marquage de la Cx43 apparaissent en blanc.

De plus, les premiers résultats d'étude de la différenciation cellulaire démontrent que l'addition des progéniteurs endothéliaux dans ce produit d'ingénierie tissulaire stimule d'autant plus, la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses humaines (synthèse accrue de collagène, activité de la PAL stimulée, cinétique de minéralisation de la MEC plus rapide) par rapport à la monoculture en 3D des HBMSCs.

Néanmoins, dans un contexte d'application clinique en ingénierie osseuse, l'idéal serait d'associer des progéniteurs endothéliaux et ostéoblastiques issus de la même source tissulaire, capables de se différencier *in situ* dans la matrice 3D, sous l'action de facteurs biochimiques et/ou dynamiques.

Il a été montré que la population de cellules CD34+/CD31- issues du tissu adipeux, était capable de se différencier en cellules endothéliales en 2D (expression de CD31 et de vWf) [Miranville et al., 2004]. Ce travail a été confirmé par M. Lavergne au cours de son doctorat réalisé dans le cadre du partenariat ITOV, à l'interface entre les unités Inserm U691 et U972.

In vivo, Miranville et ses collaborateurs ont démontré que ces cellules CD34+/CD31- issues de la SVF du tissu adipeux, participaient à la revascularisation d'un membre inférieur ischémié, dans un modèle de souris, par simple injection intraveineuse [Miranville et al., 2004].

Ainsi, ces données *in vitro* et *in vivo* présagent de l'intérêt de la fraction vasculaire stromale (SVF) en ingénierie osseuse, cette fraction contenant à la fois des progéniteurs CD34+ /CD31- mais également des cellules endothéliales matures.

Des résultats très préliminaires obtenus au laboratoire ont mis en évidence la présence d'un réseau vasculaire CD31 positif, après 10 jours de culture de la fraction vasculaire stromale en 2D (Figure 52).

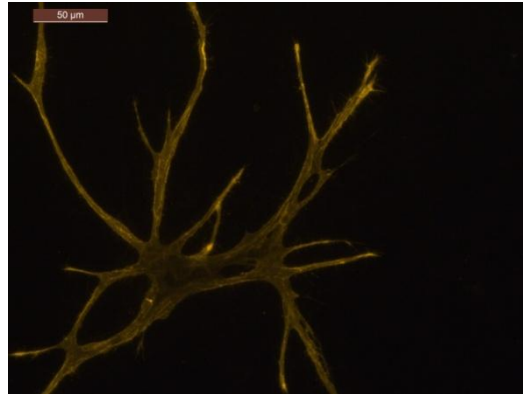


Figure 52. Immunomarquage du CD31 de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux après 10 jours de culture en 2D.

Ces premiers résultats semblent donc très prometteurs pour l'établissement d'un réseau vasculaire *in vitro* avant implantation. L'association de ces deux types cellulaires et leur communication devraient être accrues par l'application de contraintes dynamiques.

En conclusion, le développement d'un nouveau produit d'ingénierie tissulaire, doit tenir compte de plusieurs paramètres :

- **matriciels** (nature et structure du vecteur cellulaire),
- **cellulaires** (source et composantes cellulaires, interface avec la structure 3D),
- **biochimiques** (milieux de culture défini, élaboré en conditions GMP),
- **mécaniques** (intérêt de la perfusion pour la survie et fonction cellulaire).

Seule la validation chez le petit animal, puis chez le gros animal dans des modèles de régénération osseuse pertinents (modèles de lésion osseuse de taille critique ou non) adaptées à une problématique clinique, permettront de valider ces nouveaux produits, à base de pullulane et de dextrane.

En fonction de ces données expérimentales, cette nouvelle matrice pourra ainsi évoluer vers de nouvelles formulations, permettant d'améliorer la cinétique de reconstruction osseuse pour des applications cliniques bien définies.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications:

ENHANCED OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS SEEDED IN A MACROPOROUS POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLD CULTURED IN DYNAMIC CONDITIONS

C. Lalande, S.M. Derkaoui, Y. Knapp, E. Bertrand, R. Bareille, C. Bourget, C. Le Visage, V. Deplano, D. Letourneur, J. Amédée (2011)

Soumis à ECM (European Cells and Materials)

MAGNETIC RESONANCE IMAGING TRACKING OF HUMAN ADIPOSE DERIVED STROMAL CELLS WITHIN THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

C. Lalande, S. Miraux, S.M. Derkaoui, S. Mornet, R. Bareille, J.C. Fricain, J.M. Franconi, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée and A.K. Bouzier-Sore (2010)

Accepté pour publication dans ECM (European Cells and Materials)

DEVELOPMENT OF A DEFINED MEDIUM FOR OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS (ADSCs)

C. Lalande, L. Caillot, C. Conway, R. Bareille, G. Uzan, J. Amédée (2011)

Article en préparation

Congrès nationaux et internationaux:

OSTEOGENIC POTENTIAL OF ADIPOSE DERIVED STEM CELLS (ADSCs) IN POROUS POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING

*C. Lalande, S.M. Derkaoui, R. Bareille, C. Bourget, V. Santran, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée. *Communication affichée, IFATS (International Federation of Adipose Tissue Science) 2009, Daegu (Corée du sud)*

BONE TISSUE ENGINEERING USING ADIPOSE DERIVED STEM CELLS (ADSCs) ASSOCIATED WITH A POROUS POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLD: HOW TO TRACK THE CELLS *IN VIVO*?

*C. Lalande, A.K. Bouzier-Sores, S.M. Derkaoui, R. Bareille, C. Bourget, J.C. Fricain, S. Miraux, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée.

Communication orale et affichée, Congrès "Autour de la cellule souche" Bordeaux 2010

INGENIERIE DU TISSU OSSEUX ASSOCIANT DES CELLULES STROMALES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN (ADSCs) A UNE MATRICE POREUSE DE POLYSACCHARIDES : COMMENT LES SUIVRE *IN VIVO* ?

*C. Lalande, A.K. Bouzier-Sores, S.M. Derkaoui, R. Bareille, J.C. Fricain, S. Miraux, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée.

JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Saint-étienne 2010, obtention d'un prix pour la communication orale

SUIVI PAR IRM D'ADSCs (ADIPOSE DERIVED STEM CELLS) ASSOCIEES A UNE MATRICE 3D POUR L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX

*C. Lalande, S. Miraux, S.M. Derkaoui, S. Mornet, R. Bareille, J.C. Fricain, J.M. Franconi, C. Le Visage, D. Letourneur J. Amédée, A.K. Bouzier-Sore.

Communication orale, séminaire imagerie cellulaire in vivo Bordeaux 2010

BONE TISSUE ENGINEERING USING STEM CELLS: HOW TO TRACK THE CELLS?

*C. Lalande, M. Derkaoui, S. Miraux, J.C. Fricain, R. Bareille, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée, A.K. Bouzier-Sores.

Communication orale, TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) Galway (Irlande) 2010, obtention d'un prix

ETUDE DE L'INTERACTION DE PROGENITEURS ENDOTHELIAUX ET DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES AU SEIN D'UNE STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

*J. Guerrero, C. Lalande, R. Bareille, N. Thébaud, S. Ziane, M. Derkaoui, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée

JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Saint-étienne 2010, obtention d'un prix pour la communication orale

BIBLIOGRAPHIE

- Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, Shi YY, Song HM, Sahar DE, Longaker MT. 2004. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 114:713-20.
- Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H. 2009. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 382:353-8.
- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. 2008. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 14:199-215.
- Aitken CJ, Hodge JM, Nicholson GC. 2004. Adenoviral down-regulation of osteopontin inhibits human osteoclast differentiation *in vitro*. *J Cell Biochem* 93:896-903.
- Akman AC, Seda Tigli R, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. 2010a. Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells. *Artif Organs* 34:65-74.
- Akman AC, Tigli RS, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. 2010b. bFGF-loaded HA-chitosan: a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 92:953-62.
- Alford AI, Hankenson KD. 2006. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 38:749-57.
- Allen MR, Hock JM, Burr DB. 2004. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 35:1003-12.
- Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2002. Cell differentiation by mechanical stress. *Faseb J* 16:270-2.
- Aro HT, Aho AJ. 1993. Clinical use of bone allografts. *Ann Med* 25:403-12.
- Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. 2009. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 218:237-45.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-7.
- Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J Biol Chem* 282:26746-53.
- Augello A, De Bari C. 2010. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther* 21:1226-38.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 6:623-33.
- Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. 2007. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A* 82:336-42.
- Autissier A, Visage CL, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. 2010. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater* 6:3640-8.

- Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bendorowicz-Pikula J, Buchet R. 2003. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 50:1019-38.
- Ball MD, Bonzani IC, Bovis MJ, Williams A, Stevens MM. 2011. Human Periosteum Is a Source of Cells for Orthopaedic Tissue Engineering: A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res*.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46:219-28.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12600-5.
- Baquey C, Dupuy B, Janvier G, Bordenave L, Caix J, Basse-Cathalinat B. 1991. Rationale for the design of biomaterials and the evaluation of their biocompatibility. *Biorheology* 28:463-72.
- Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. 2011. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 12:12.
- Basle MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delecrist J, Daculsi G, Rebel A. 1993. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif Tissue Int* 53:348-56.
- Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. 2004. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 42:121-31.
- Becker AJ, Mc CE, Till JE. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-4.
- Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, Fisher LW, Castronovo V. 2000. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 86:885-91.
- Beloti MM, Rosa AL. 2005. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J* 16:156-61.
- Berger MG, Veyrat-Masson R, Rapatel C, Descamps S, Chassagne J, Boiret-Dupre N. 2006. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 24:2888-90.
- Beris AE, Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Malizos KN, Soucacos PN. 2011. Vascularized fibula transfer for lower limb reconstruction. *Microsurgery* 31:205-11.
- Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, Cristantielli R, Palumbo G, Locatelli F. *Ex vivo* expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:73-81.
- Bernhardt A, Thieme S, Domaschke H, Springer A, Rosen-Wolff A, Gelinsky M. 2010. Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen-towards an *in vitro* model for bone remodeling. *J Biomed Mater Res A* 95:848-56.
- Betz VM, Betz OB, Harris MB, Vrahas MS, Evans CH. 2008. Bone tissue engineering and repair by gene therapy. *Front Biosci* 13:833-41.
- Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, Soares R, Granja PL. 2010. Immobilization of human mesenchymal stem cells within RGD-grafted alginate microspheres and assessment of their angiogenic potential. *Biomacromolecules* 11:1956-64.

- Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Kluter H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27:2331-41.
- Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D. 2008. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother* 35:286-294.
- Bilezikian J, Raisz L, Rodan GA. 1996. Principles of Bone Biology. San Diego: academic press.
- Birk DE. 2001. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32:223-37.
- Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ. 2003. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 66:526-31.
- Bolander ME. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:165-70.
- Boos AM, Loew JS, Deschler G, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, Dragu A, Kneser U, Horch RE, Beier JP. 2011. Directly auto-transplanted mesenchymal stem cells induce bone formation in a ceramic bone substitute in an ectopic sheep model. *J Cell Mol Med* 15:1364-78.
- Bornstein P, Sage EH. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-16.
- Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, Dubus I, Ivanovic Z, Rosenbaum J, Charbord P, Combe C, Bulte JW, Moonen CT, Ripoche J, Grenier N. 2004. *In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* 233:781-9.
- Boskey AL. 1996. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 35:357-63.
- Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 23:187-96.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT. 2002. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110:139-48.
- Braccini A, Wendt D, Jaquiere C, Jakob M, Heberer M, Kenins L, Wodnar-Filipowicz A, Quarto R, Martin I. 2005. Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells* 23:1066-72.
- Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, Vermette P. 2010. Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Curr Med Chem* 17:3944-67.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56:283-94.
- Brunner D, Frank J, Appl H, Schoffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex* 27:53-62.
- Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. 2005. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330:142-50.
- Bulte JW, Arbab AS, Douglas T, Frank JA. 2004. Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Methods Enzymol* 386:275-99.
- Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. 2002. *In vivo* magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:899-907.

- Buma P, Schreurs W, Verdonschot N. 2004. Skeletal tissue engineering-from *in vitro* studies to large animal models. *Biomaterials* 25:1487-95.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45:115-20.
- Burger EH, Klein-Nulend J. 1999. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* 13 Suppl:S101-12.
- Burns JS, Rasmussen PL, Larsen KH, Schroder HD, Kassem M. 2010. Parameters in three-dimensional osteospheroids of telomerized human mesenchymal (stromal) stem cells grown on osteoconductive scaffolds that predict *in vivo* bone-forming potential. *Tissue Eng Part A* 16:2331-42.
- Buschmann J, Welte M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, Rudin M, Calcagni M. Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in DegraPol foam: histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts. *Tissue Eng Part A* 17:291-9.
- Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramirez-Fernandez MP, Mate-Sanchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus A. 2011. Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram((R)) : a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res*.
- Canady JW, Zeitler DP, Thompson SA, Nicholas CD. 1993. Suitability of the iliac crest as a site for harvest of autogenous bone grafts. *Cleft Palate Craniofac J* 30:579-81.
- Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980-9.
- Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. 2008. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res* 63:492-6.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. 1987. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262:2869-74.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-49.
- Chang YL, Stanford CM, Keller JC. 2000. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res* 52:270-8.
- Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. 2006. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 27:5546-53.
- Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Basle MF, Rebel A. 1993. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials* 14:507-12.
- Chase LG, Lakshminpathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. 2010. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1:8.
- Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. 2010. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2010:215625.
- Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA. 2003. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 14:173-89.

- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1544-52.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-20.
- Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ. 2002. Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci* 17:435-47.
- Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. 1998. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 13:1760-7.
- Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. 2007. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28:459-67.
- Chua CC, Chua BH, Chen Z, Landy C, Hamdy RC. 2002. TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:1-8.
- Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. 1992. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51:305-11.
- Civitelli R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473:188-92.
- Claes LE, Heigele CA. 1999. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 32:255-66.
- Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. 2008. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 214:537-44.
- Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD, Jr., Fox JW, Chirgwin JM, Guise TA. 2007. Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 21:486-98.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. 2000. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both *in vitro* and *in vivo* on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res* 15:474-88.
- Colnot C. 2009. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 24:274-82.
- Colnot C, Huang S, Helms J. 2006. Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 350:557-61.
- Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. 2005. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clin Orthop Relat Res*:69-78.
- Contractor T, Babiarz B, Kowalski AJ, Rittling SR, Sorensen ES, Denhardt DT. 2005. Osteoclasts resorb protein-free mineral (Osteologic discs) efficiently in the absence of osteopontin. *In vivo* 19:335-41.
- Cordonnier T. 2010. Associations cellules souches mésenchymateuses et céramiques pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Université François Rabelais. Tours.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-94.

- Cullinane DM, Fredrick A, Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, Salisbury K, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2002. Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res* 20:579-86.
- Daculsi G, Uzel AP, Weiss P, Goyenvallé E, Aguado E. 2010. Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 21:855-61.
- De Bruyn PP, Kabisch WT. 1955. Bone formation by fresh and frozen, autogenous and homogenous transplants of bone, bone marrow and periosteum. *Am J Anat* 96:375-417.
- De Laporte L, Shea LD. 2007. Matrices and scaffolds for DNA delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:292-307.
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143:1545-53.
- Degano IR, Vilalta M, Bago JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitriou H, Bianco P, Rubio N, Blanco J. 2008. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 29:427-37.
- Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. 2002. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng* 12:15-35.
- Di Maggio N, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. 2011. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* 32:321-9.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392-404.
- Discher DE, Janmey P, Wang YL. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310:1139-43.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47:149-61.
- Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, Hofmann A, Schmidt H, Kirkpatrick CJ. 2010. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 16:1235-7.
- Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, Pompe W, Rosen-Wolff A. 2006. *In vitro* ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. *Tissue Eng* 12:949-58.
- Dong F, Ha XQ. 2010. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy. *Chin Med J (Engl)* 123:2454-60.
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 205:228-36.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-52.
- Dufour C, Holy X, Marie PJ. 2008. Transforming growth factor-beta prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phospho-Bad signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E794-801.

- Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM. 2006. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)* 1:157-68.
- Dupont KM, Boerckel JD, Stevens HY, Diab T, Kolambkar YM, Takahata M, Schwarz EM, Guldberg RE. 2011. Synthetic scaffold coating with adeno-associated virus encoding BMP2 to promote endogenous bone repair. *Cell Tissue Res*.
- Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Guldberg RE. 2007. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 22:286-97.
- Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K, Stachowicz W, Michalik J, Grzesik W. 1991. Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. *Clin Orthop Relat Res*:30-7.
- Eastlund T. 1995. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant* 4:455-77.
- Edgar AJ, Dover SL, Lodrick MN, McKay IJ, Hughes FJ, Turner W. 2005. Bone morphogenetic protein-2 induces expression of murine zinc finger transcription factor ZNF450. *J Cell Biochem* 94:202-15.
- Einhorn TA. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:S7-21.
- Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275:8695-702.
- Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. 2011. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J* 22:91-8.
- Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, Salema R, Barbosa MA, Mooney DJ, Granja PL. 2007. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials* 28:3644-55.
- Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. 2009. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 15:75-86.
- Fang B, Song Y, Zhao RC, Han Q, Lin Q. 2007. Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. *Transplant Proc* 39:1710-3.
- Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6:745-57.
- Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. 2010. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 10:1441-51.
- Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. 1999. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87:57-66.
- Fernandes H, Mentink A, Bank R, Stoop R, van Blitterswijk C, de Boer J. 2010. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A* 16:1693-702.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-76.
- Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. 2002. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:305-12.

- Field JR, McGee M, Stanley R, Ruthenbeck G, Papadimitrakis T, Zannettino A, Gronthos S, Itescu S. 2011. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol* 24:113-21.
- Finkemeier CG. 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:454-64.
- Fischer L, Carret, JP., Gonon, GP., de Mourgues, G., Clermont, A. 1977. Technique d'étude de la vascularisation artérielle de l'os. *International Orthopaedics* 1:171-178.
- Fleischmajer R, Perlish JS, Olsen BR. 1987. Amino and carboxyl propeptides in bone collagen fibrils during embryogenesis. *Cell Tissue Res* 247:105-9.
- Foty R. 2011. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*.
- Frame JW. 1980. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 38:176-80.
- Framson PE, Sage EH. 2004. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 92:679-90.
- Frank JA, Zywicke H, Jordan EK, Mitchell J, Lewis BK, Miller B, Bryant LH, Jr., Bulte JW. 2002. Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents. *Acad Radiol* 9 Suppl 2:S484-7.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-4.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. 1974a. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation* 17:331-40.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA. 1974b. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 2:83-92.
- Friedenstein AY, Lalykina KS. 1970. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res:Suppl*:105-6.
- Friedlaender GE. 1987. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res*:17-21.
- Friedlaender GE, Horowitz MC. 1992. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 15:1171-5.
- Frohlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble JM, Kregar-Velikonja N, Vunjak-Novakovic G. 2010. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Eng Part A* 16:179-89.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. 2008. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:254-64.
- Fuchs S, Jiang X, Gotman I, Makarov C, Schmidt H, Gutmanas EY, Kirkpatrick CJ. 2010. Influence of polymer content in Ca-deficient hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposites on the formation of microvessel-like structures. *Acta Biomater* 6:3169-77.
- Fujimura J, Ogawa R, Mizuno H, Fukunaga Y, Suzuki H. 2005. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 333:116-21.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. 1999. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:79-98.

- Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. 2008. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 8:1417-23.
- Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48:1416-23.
- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. 2009a. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52:79-86.
- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, Garcia-Arranz M. 2009b. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis* 24:27-30.
- Gatti AM, Simonetti LA, Monari E, Guidi S, Greenspan D. 2006. Bone augmentation with bioactive glass in three cases of dental implant placement. *J Biomater Appl* 20:325-39.
- Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W. 2005. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20:2028-35.
- Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W. 2007. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* 41:516-22.
- Gerber HP, Ferrara N. 2000. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223-8.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623-8.
- Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. 2003a. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 18:1584-92.
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. 2003b. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873-84.
- Geuze RE, Prins HJ, Oner FC, van der Helm YJ, Schuijff LS, Martens AC, Kruijt MC, Alblas J, Dhert WJ. 2010. Luciferase labeling for multipotent stromal cell tracking in spinal fusion versus ectopic bone tissue engineering in mice and rats. *Tissue Eng Part A* 16:3343-51.
- Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. 2005. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 96:717-22.
- Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. 2011. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury* 42:591-8.
- Gimble JM. 2003. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 3:705-13.
- Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:69-81.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249-60.

- Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. 2011. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1585-90.
- Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. 2010. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 20:218-30.
- Glowacki J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S82-9.
- Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. *Bone* 41:462-73.
- Gothard D, Roberts SJ, Shakesheff KM, Buttery LD. 2010. Engineering embryonic stem-cell aggregation allows an enhanced osteogenic differentiation *in vitro*. *Tissue Eng Part C Methods* 16:583-95.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. 2003. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 13:301-7.
- Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. 2008. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 8:255-68.
- Granja PL, De Jeso B, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Barbosa MA. 2005. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels induced by human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater* 10:31-7; discussion 37-9.
- Grano M, Galimi F, Zamboni G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ, Comoglio PM. 1996. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7644-8.
- Grassel S, Ahmed N. 2007. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci* 12:4946-56.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:948-53.
- Grellier M. 2008. La communication ostéo-endothéliale : application en ingénierie du tissu osseux Bordeaux. Université Bordeaux 2. Bordeaux.
- Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amedee J, Barbosa MA. 2009. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 30:3271-8.
- Griffin M, Iqbal SA, Bayat A. 2011. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br* 93:427-34.
- Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164-73.
- Grunert M, Dombrowski C, Sadasivam M, Manton K, Cool SM, Nurcombe V. 2007. Isolation of a native osteoblast matrix with a specific affinity for BMP2. *J Mol Histol* 38:393-404.
- Guarino V, Ambrosio L. 2010. Temperature-driven processing techniques for manufacturing fully interconnected porous scaffolds in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 224:1389-400.

- Guarino V, Causa F, Netti PA, Ciapetti G, Pagani S, Martini D, Baldini N, Ambrosio L. 2008. The role of hydroxyapatite as solid signal on performance of PCL porous scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86B:548-57.
- Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amedee-Vilamitjana J. 2004. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 14:325-32.
- Guo-ping W, Xiao-chuan H, Zhi-hui Y, Li G. 2010. Influence on the osteogenic activity of the human bone marrow mesenchymal stem cells transfected by liposome-mediated recombinant plasmid pIRES-hBMP2-hVEGF165 *in vitro*. *Ann Plast Surg* 65:80-4.
- Guyen S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, Scherberich A. 2011. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials* 32:5801-9.
- Habibovic P, de Groot K. 2007. Osteoinductive biomaterials-properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1:25-32.
- Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. 2006a. Osteoinduction by biomaterials-physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 77:747-62.
- Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. 2006b. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 24:867-76.
- Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 2005. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-75.
- Hamidouche Z, Fromigie O, Ringe J, Haupl T, Vaudin P, Pages JC, Srouji S, Livne E, Marie PJ. 2009. Priming integrin $\alpha 5$ promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18587-91.
- Hamidouche Z, Hay E, Vaudin P, Charbord P, Schule R, Marie PJ, Fromigie O. 2008. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ β -catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb J* 22:3813-22.
- Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. 1997. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12:1606-14.
- Handscheil J, Berr K, Depprich RA, Kubler NR, Naujoks C, Wiesmann HP, Ommerborn MA, Meyer U. 2008. Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Med* 4:10.
- Handscheil J, Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich RA, Ommerborn MA, Kubler NR, Brinkmann M, Kogler G, Meyer U. 2010. Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells *in vivo*. *Tissue Eng Part A* 16:2475-83.
- Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. 2011. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42:556-61.
- Harris AL. 2002. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
- Harry LE, Sandison A, Paleolog EM, Hansen U, Pearse MF, Nanchahal J. 2008. Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *J Orthop Res* 26:1238-44.
- He J, Genetos DC, Yellowley CE, Leach JK. 2010. Oxygen tension differentially influences osteogenic differentiation of human adipose stem cells in 2D and 3D cultures. *J Cell Biochem* 110:87-96.

- Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. 2007. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202.
- Henderson JH, Carter DR. 2002. Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures. *Bone* 31:645-53.
- Henle P, Zimmermann G, Weiss S. 2005. Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* 37:791-8.
- Herbertson A, Aubin JE. 1995. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Miner Res* 10:285-94.
- Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H. 2009. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 191:23-32.
- Hill CS, Treisman R. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
- Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. 1993. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res*:23-7.
- Hiraoka Y, Kimura Y, Ueda H, Tabata Y. 2003. Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly(glycolic acid) fiber. *Tissue Eng* 9:1101-12.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. 1990. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1:60-8.
- Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Muller I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* 11:11.
- Hong D, Chen HX, Xue Y, Li DM, Wan XC, Ge R, Li JC. 2009. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116:86-92.
- Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, Yang XB. 2010. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev* 16:263-71.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner MK. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5:309-13.
- Hossain M, Irwin R, Baumann MJ, McCabe LR. 2005. Hepatocyte growth factor (HGF) adsorption kinetics and enhancement of osteoblast differentiation on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 26:2595-602.
- Hosseinkhani H, Inatsugu Y, Hiraoka Y, Inoue S, Tabata Y. 2005. Perfusion culture enhances osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in collagen sponge reinforced with poly(glycolic Acid) fiber. *Tissue Eng* 11:1476-88.
- Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat* 213:66-72.
- Huang W, Carlsen B, Rudkin G, Berry M, Ishida K, Yamaguchi DT, Miller TA. 2004. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone* 34:799-808.

- Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. 2005. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 20:848-57.
- Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. 1995. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. *Endocrinology* 136:2671-7.
- Hunter GK, Goldberg HA. 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 (Pt 1):175-9.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. 1996. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317 (Pt 1):59-64.
- Hunter WL, Arsenault AL, Hodsman AB. 1991. Rearrangement of the metaphyseal vasculature of the rat growth plate in rickets and rachitic reversal: a model of vascular arrest and angiogenesis renewed. *Anat Rec* 229:453-61.
- Hyafil F, Laissy JP, Mazighi M, Tchetché D, Louedec L, Adle-Biasette H, Chillon S, Henin D, Jacob MP, Letourneur D, Feldman LJ. 2006. Ferumoxtran-10-enhanced MRI of the hypercholesterolemic rabbit aorta: relationship between signal loss and macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:176-81.
- Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. 2001. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem* 276:13065-71.
- Isaksson H, Wilson W, van Donkelaar CC, Huiskes R, Ito K. 2006. Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing. *J Biomech* 39:1507-16.
- Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, Tsuruo T. 2002. Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem* 277:26217-24.
- Ishijima M, Ezura Y, Tsuji K, Rittling SR, Kurosawa H, Denhardt DT, Emi M, Nifuji A, Noda M. 2006. Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail-suspension-induced bone loss. *Exp Cell Res* 312:3075-83.
- Iwasaki M, Le AX, Helms JA. 1997. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev* 69:197-202.
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-93.
- Jang JH, Houchin TL, Shea LD. 2004. Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 1:127-38.
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. 2002. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 9:642-7.
- Janssen FW, Oostra J, Oorschot A, van Blitterswijk CA. 2006. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: *in vivo* bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27:315-23.
- Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH. 2008. *In vivo* bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A* 14:1285-94.
- Jin QM, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. 2000. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 52:491-9.
- Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. 1992. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res* 7:1045-55.

- Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 30:219-27.
- Johansson L, Klinth J, Holmqvist O, Ohlson S. 2003. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? *Cytotechnology* 42:67-74.
- Jono S, Peinado C, Giachelli CM. 2000. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 275:20197-203.
- Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Civitelli R. 2004. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an *in vitro* model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids* 69:219-26.
- Jukes JM, Both SK, van Blitterswijk CA, de Boer J. 2008. Potential of embryonic stem cells for *in vivo* bone regeneration. *Regen Med* 3:783-5.
- Jukes JM, van Blitterswijk CA, de Boer J. 2010. Skeletal tissue engineering using embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 4:165-80.
- Jung J, Moon N, Ahn JY, Oh EJ, Kim M, Cho CS, Shin JC, Oh IH. 2009. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells Dev* 18:559-71.
- Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A. 2004. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone* 34:993-1003.
- Kahle M, Wiesmann HP, Berr K, Deprich RA, Kubler NR, Naujoks C, Cohnen M, Ommerborn MA, Meyer U, Handschel J. 2010. Embryonic stem cells induce ectopic bone formation in rats. *Biomed Mater Eng* 20:371-80.
- Kaigler D, Krebsbach PH, Wang Z, West ER, Horger K, Mooney DJ. 2006. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration. *J Dent Res* 85:633-7.
- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. 2005. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *Faseb J* 19:665-7.
- Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. 2010. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31:1242-50.
- Kanczler JM, Oreffo RO. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15:100-14.
- Kang SW, Kim JS, Park KS, Cha BH, Shim JH, Kim JY, Cho DW, Rhie JW, Lee SH. 2011. Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration. *Bone* 48:298-306.
- Karadag A, Fisher LW. 2006. Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin. *J Bone Miner Res* 21:1627-36.
- Karageorgiou V, Kaplan D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-91.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456-69.

- Kawai M, Bessho K, Maruyama H, Miyazaki J, Yamamoto T. 2006. Simultaneous gene transfer of bone morphogenetic protein (BMP) -2 and BMP-7 by *in vivo* electroporation induces rapid bone formation and BMP-4 expression. *BMC Musculoskelet Disord* 7:62.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. 2001. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-7.
- Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, Tomita Y, Kobata Y, Shigematsu K, Takakura Y. 2006. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 117:1471-9.
- Keogh MB, FJ OB, Daly JS. 2010a. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis-applications for bone tissue engineering. *Cell Tissue Res* 340:169-77.
- Keogh MB, O'Brien FJ, Daly JS. 2010b. Substrate stiffness and contractile behaviour modulate the functional maturation of osteoblasts on a collagen-GAG scaffold. *Acta Biomater* 6:4305-13.
- Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amedee J, Fricain JC, Catros S. 2010. *In vivo* bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* 2:014101.
- Khatriwala CB, Kim PD, Peyton SR, Putnam AJ. 2009. ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res* 24:886-98.
- Khatriwala CB, Peyton SR, Metzke M, Putnam AJ. 2007. The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *J Cell Physiol* 211:661-72.
- Kilian O, Wensch S, Alt V, Lauer M, Fuhrmann R, Dingeldein E, Jonuleit T, Schnettler R, Franke RP. 2007. Effects of platelet factors on biodegradation and osteogenesis in metaphyseal defects filled with nanoparticulate hydroxyapatite-an experimental study in minipigs. *Growth Factors* 25:191-201.
- Kim K, Dean D, Wallace J, Breithaupt R, Mikos AG, Fisher JP. 2011. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 32:3750-63.
- Kim SS, Gwak SJ, Kim BS. 2008. Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A* 87:245-53.
- Kitahara K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. 2003. Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* 144:2132-40.
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. 2005. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)* 53:576-80.
- Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J. 2006. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342:902-8.
- Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. 2000. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 273:630-6.
- Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, Higuchi H, Takagishi K. 2005. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br* 87:1426-33.
- Kojima H, Uede T, Uemura T. 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector. *J Biochem* 136:377-86.

- Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z, Finkenzeller G. 2011. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 17:311-21.
- Koyama Y, Rittling SR, Tsuji K, Hino K, Salincarnboriboon R, Yano T, Taketani Y, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. 2006. Osteopontin deficiency suppresses high phosphate load-induced bone loss via specific modulation of osteoclasts. *Endocrinology* 147:3040-9.
- Kretlow JD, Spicer PP, Jansen JA, Vacanti CA, Kasper FK, Mikos AG. 2010. Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects. *Tissue Eng Part A* 16:3555-68.
- Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, Young MF, Simon CG, Jr. 2011. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials*.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139:1338-45.
- Lacroix D, Prendergast PJ. 2002. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech* 35:1163-71.
- Laflamme C, Rouabhia M. 2008. Effect of BMP-2 and BMP-7 homodimers and a mixture of BMP-2/BMP-7 homodimers on osteoblast adhesion and growth following culture on a collagen scaffold. *Biomed Mater* 3:015008.
- Lagumdzija A, Ou G, Petersson M, Bucht E, Gonon A, Pernow Y. 2004. Inhibited anabolic effect of insulin-like growth factor-I on stromal bone marrow cells in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice. *Acta Physiol Scand* 182:29-35.
- Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY, Letourneur D. 2006. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J Biol Chem* 281:37844-52.
- Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, Franconi JM, Le Visage C, Letourneur D, Amedee J, Bouzier-Sore AK. 2011. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose-derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 21:341-54.
- Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. 2007. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:18-26.
- Lange C, Zander AR. 2008. Platelet lysate for rapid expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cellular Therapy and Transplantation*, 1:49-53.
- Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. 2011. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 22:1873-84.
- Laroche M. 2002. Intraosseous circulation from physiology to disease. *Joint Bone Spine* 69:262-9.
- Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P. 2005. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36:1086-93.

- Le Visage C, Letourneur D. 2009a. Method for preparing porous scaffold for tissue engineering, cell culture and cell delivery. International patent number 047346 A1.
- Le Visage C, Chaubet F, Autissier A, Letourneur D. 2009b. Method for preparing porous scaffold for tissue engineering. International patent number 047347 A1.
- Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. 2006. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 27:3249-55.
- Leal D, Matsuhiro B, Rossi M, Caruso F. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res* 343:308-16.
- Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME. 1991. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 146:370-8.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65:599-608.
- Lee GS, Park JH, Shin US, Kim HW. 2011. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. *Acta Biomater* 7:3178-86.
- Lee SH, Shin H. 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:339-59.
- LeGeros RZ. 1993. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 14:65-88.
- Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW, Woodruff MA. 2008. The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in a 3D scaffold/matrix environment. *Curr Drug Discov Technol* 5:319-27.
- Li B, Zeng Q, Wang H, Shao S, Mao X, Zhang F, Li S, Guo Z. 2007. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 18:221-7.
- Li F, Bronson S, Niyibizi C. 2010. Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J Cell Biochem* 109:643-52.
- Li H, Daculsi R, Grellier M, Bareille R, Bourget C, Remy M, Amedee J. 2011. The role of vascular actors in two dimensional dialogue of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PLoS One* 6:e16767.
- Li YJ, Batra NN, You L, Meier SC, Coe IA, Yellowley CE, Jacobs CR. 2004. Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Orthop Res* 22:1283-9.
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. 1996. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19:1S-12S.
- Liu Q, Cen L, Yin S, Chen L, Liu G, Chang J, Cui L. 2008. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials* 29:4792-9.
- Liu X, Ma PX. 2004. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 32:477-86.
- Lu Z, Roohani-Esfahani SI, Wang G, Zreiqat H. 2011. Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine*.
- Lubiatowski P, Kruczyński J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. 2006. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 38:320-2.
- Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. 2004. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58:197-208.

- Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81.
- Lutolf MP, Hubbell JA. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23:47-55.
- MacIntosh AC, Kearns VR, Crawford A, Hatton PV. 2008. Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *J Tissue Eng Regen Med* 2:71-80.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40:46-62.
- Madonna R, Geng YJ, De Caterina R. 2009. Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1723-9.
- Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Sato S, Kubota E, Hata R. 2006. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol* 25:47-58.
- Malaval L, Aubin JE, Vico L. 2009a. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling. *Osteoporos Int* 20:1077-80.
- Malaval L, De Vernejoul M-C, Marie, P. 2009. Matrice osseuse. *Traité des Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M.-S Flammarion. Paris : 30-42.
- Malaval L, Monfoulet L, Fabre T, Pothuau L, Bareille R, Miraux S, Thiaudiere E, Raffard G, Franconi JM, Lafage-Proust MH, Aubin JE, Vico L, Amedee J. 2009b. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone* 45:853-61.
- Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Amedee J, Vico L, Rossant J, Aubin JE. 2008. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205:1145-53.
- Malinvaud J. 2009. Bulletin de l'académie nationale de chirurgie dentaire.
- Malizos KN, Zalavras CG, Soucacos PN, Beris AE, Urbaniak JR. 2004. Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. *J Am Acad Orthop Surg* 12:360-9.
- Marie P. 2000. Bone morphogenic proteins (BMPs) and bone repair. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 86 Suppl 1:151-2.
- Marie P, de Vernejoul, MC. 1999. Biologie cellulaire de l'ostéoporose.
- Marie PJ. 2002. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 190:297-305.
- Marie PJ. 2003. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 316:23-32.
- Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, Barbarisi A. 2010. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: *in vitro* study. *J Mater Sci Mater Med* 21:353-63.
- Marolt D, Augst A, Freed LE, Vepari C, Fajardo R, Patel N, Gray M, Farley M, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. 2006. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials* 27:6138-49.
- Marshak DR, Holecck JJ. 1999. Chemically defined medium for human mesenchymal stem cells. International patent number 5908782.

- Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, Sweeney D, Moukayed M, Harris AL, Davies K, Watt SM. 2007. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 25:1003-12.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22:80-6.
- Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, Yamamoto M, Itoh H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. 2005. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg* 41:82-90.
- Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. 2000. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet* 45:346-53.
- Maurus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumie A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*.
- Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 95:827-39.
- Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30:472-7.
- Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prosper F. 2008. Transplantation of adipose-derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 10:454-62.
- Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R. 2006. Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment. *J Bone Miner Res* 21:1821-7.
- McCoy RJ, O'Brien FJ. 2010. Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review. *Tissue Eng Part B Rev* 16:587-601.
- Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J. 2010. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C355-64.
- Meury T, Verrier S, Alini M. 2006. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts *in vitro* by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 98:992-1006.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349-55.
- Moldovan NI. 2005. Angiogenesis, l'enfant terrible of vascular biology is coming of age. *J Cell Mol Med* 9:775-6.
- Monfoulet L. 2009. Rôle de deux protéines de la matrice extracellulaire osseuse, l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP), dans la réparation osseuse par génétique expérimentale chez la souris. Université Bordeaux 2. Bordeaux.

- Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, Chassande O. 2010. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 46:447-52.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI. 2001. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71:354-61.
- Mornet S, Portier J, Duguet E. 2005. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293:127-134.
- Müller AM, Mehrkens A, Schafer DJ, Jaquiere C, Guven S, Lehmicke M, Martinetti R, Farhadi I, Jakob M, Scherberich A, Martin I. 2010. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater* 19:127-35.
- Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. 2004. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83:204-10.
- Musgrave DS, Pruchnic R, Bosch P, Ziran BH, Whalen J, Huard J. 2002. Human skeletal muscle cells in *ex vivo* gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Br* 84:120-7.
- Musgrave DS, Pruchnic R, Wright V, Bosch P, Ghivizzani SC, Robbins PD, Huard J. 2001. The effect of bone morphogenetic protein-2 expression on the early fate of skeletal muscle-derived cells. *Bone* 28:499-506.
- Naito H, Dohi Y, Zimmermann WH, Tojo T, Takasawa S, Eschenhagen T, Taniguchi S. 2011. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on the Mechanical Properties of Engineered Bone-Like Tissue. *Tissue Eng Part A*.
- Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. 2005. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2542-7.
- Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. 1994. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651-9.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29.
- Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. 1994. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15:203-8.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13:9-22.
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112:295-307.
- Nguyen LT, Liao S, Ramakrishna S, Chan CK. 2011. The role of nanofibrous structure in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells with serial passage. *Nanomedicine (Lond)*.

- Niger C, Geneau G, Fiorini C, Defamie N, Pointis G, Mesnil M, Cronier L. 2008. Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation: influence of connexin-43 expression level. *J Cell Biochem* 103:110-22.
- Ogata Y, Yamauchi M, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J. 1995. Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression. Identification of a glucocorticoid response element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur J Biochem* 230:183-92.
- Okita K, Yamanaka S. 2011. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:2198-207.
- Olivier V, Hivart P, Descamps M, Hardouin P. 2007. *In vitro* culture of large bone substitutes in a new bioreactor: importance of the flow direction. *Biomed Mater* 2:174-80.
- Olivo C, Alblas J, Verweij V, Van Zonneveld AJ, Dhert WJ, Martens AC. 2008. *In vivo* bioluminescence imaging study to monitor ectopic bone formation by luciferase gene marked mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 26:901-9.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-71.
- Opolka A, Ratzinger S, Schubert T, Spiegel HU, Grifka J, Bruckner P, Probst A, Grassel S. 2007. Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice. *Matrix Biol* 26:85-95.
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. 2003. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995:109-16.
- Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. 2008. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 26:223-34.
- Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. 2000. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 5:64-70.
- Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2003. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 33:889-98.
- Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. 2004. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J* 378:1083-7.
- Papadimitropoulos A, Scherberich A, Guven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F, Scheffler K, Zallone A, Martin I. 2011. A 3D *in vitro* bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 21:445-58; discussion 458.
- Paprocka M, Krawczyński A, Dus D, Kantor A, Carreau A, Grillon C, Kieda C. 2011. CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood. *Cytometry A* 79:594-602.
- Parfitt AM. 2000. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* 26:319-23.
- Park JB. 2011. The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16:e115-8.
- Park SH, Tofighi A, Wang X, Strunk M, Ricketts T, Chang J, Kaplan DL. 2011. Calcium phosphate combination biomaterials as human mesenchymal stem cell delivery vehicles for bone repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 97:235-44.
- Parrilla C, Saulnier N, Bernardini C, Patti R, Tartaglione T, Fetoni AR, Pola E, Paludetti G, Michetti F, Lattanzi W. 2011. Undifferentiated human adipose tissue-derived stromal cells induce mandibular bone healing in rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 137:463-70.

- Pélissier P, Boireau P, Martin D, Baudet J. 2003a. Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes. *Plast Reconstr Surg* 111:2223-9.
- Pélissier P, Villars F, Mathoulin-Pelissier S, Bareille R, Lafage-Proust MH, Vilamitjana-Amedee J. 2003b. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a macroporous ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg* 111:1932-41.
- Peters MC, Poverini PJ, Mooney DJ. 2002. Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J Biomed Mater Res* 60:668-78.
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18:959-63.
- Phillips AM. 2005. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3:S5-7.
- Phillips PG, Birnby LM, Narendran A. 1995. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol* 268:L789-800.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-63.
- Poirier-Quinot M, Frasca G, Wilhelm C, Luciani N, Ginefri JC, Darrasse L, Letourneur D, Le Visage C, Gazeau F. 2010. High-resolution 1.5-Tesla magnetic resonance imaging for tissue-engineered constructs: a noninvasive tool to assess three-dimensional scaffold architecture and cell seeding. *Tissue Eng Part C Methods* 16:185-200.
- Porte-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugere C, Brouillaud B, Bareille R, Amedee J, Barthe N, Dard M, Baquay C. 2004. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* 25:4837-46.
- Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H. 2007a. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 40:1078-87.
- Potier E, Ferreira E, Meunier A, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H. 2007b. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng* 13:1325-31.
- Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS. 2001. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 80:424-40.
- Prockop DJ, Kivirikko KI. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-34.
- Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, Casteilla L. 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res* 312:727-36.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbai M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118-29.

- Qin C, Baba O, Butler WT. 2004. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:126-36.
- Qu D, Li J, Li Y, Gao Y, Zuo Y, Hsu Y, Hu J. 2011. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF *ex vivo* gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J Biomed Mater Res A* 96:543-51.
- Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT. 2001. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* 16:1787-94.
- Ravindran S, Gao Q, Kotecha M, Magin R, Karol S, Bedran-Russo A, George A. 2011. Biomimetic ECM Incorporated Scaffold Induces Osteogenic Gene Expression in Human Marrow Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*.
- Rederstorff E, Weiss P, Sourice S, Pilet P, Xie F, Siquin C, Collic-Jouault S, Guicheux J, Laib S. 2011. An *in vitro* study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 7:2119-30.
- Reyes CD, Petrie TA, Burns KL, Schwartz Z, Garcia AJ. 2007. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 28:3228-35.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:3413-31.
- Rhee SC, Ji YH, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. 2011. *In vivo* evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev* 20:233-42.
- Rice HE, Hsu EW, Sheng H, Evenson DA, Freemerman AJ, Safford KM, Provenza JM, Warner DS, Johnson GA. 2007. Superparamagnetic iron oxide labeling and transplantation of adipose-derived stem cells in middle cerebral artery occlusion-injured mice. *AJR Am J Roentgenol* 188:1101-8.
- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. 2001. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19:1029-34.
- Rivière C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, Allaire E, Michel JB, Letourneur D, Deux JF. 2005. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology* 235:959-67.
- Robert D, Fayol D, Le Visage C, Frasca G, Brule S, Menager C, Gazeau F, Letourneur D, Wilhelm C. 2010. Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells. *Biomaterials* 31:1586-95.
- Robling AG, Bellido T, Turner CH. 2006a. Mechanical stimulation *in vivo* reduces osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:354.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006b. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 8:455-98.
- Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. 2006. Technology insight: *in vivo* cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:554-62.
- Roohani-Esfahani SI, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. 2010. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites. *Biomaterials* 31:5498-509.
- Rouwkema J. 2007. Prevascularized bone tissue engineering. University of Twente. Twente.

- Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. 2006. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12:2685-93.
- Royce PM. 2003. Collagen: the collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix.
- Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. 2006. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 367:1-16.
- Rustad KC, Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Major MR, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC. 2011. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*.
- Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 366:51-7.
- Ryu YM, Hah YS, Park BW, Kim DR, Roh GS, Kim JR, Kim UK, Rho GJ, Maeng GH, Byun JH. 2011. Osteogenic differentiation of human periosteal-derived cells in a three-dimensional collagen scaffold. *Mol Biol Rep* 38:2887-94.
- Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. 1999. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277:C628-37.
- Sakou T. 1998. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22:591-603.
- Saleh FA, Genever PG. 2011. Turning round: multipotent stromal cells, a three-dimensional revolution? *Cytotherapy* 13:903-12.
- Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. 1993. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res*:292-312.
- Saniger ML, Oya R, Macias D, Dominguez JN, Aranega A, Luque F. 2006. c-Jun kinase mediates expression of VEGF induced at transcriptional level by Rac1 and Cdc42Hs but not by RhoA. *J Cell Biochem* 98:650-60.
- Sankaranarayanan K, T C, G GP, V M, U P, Renny CM, Raghavan U, R SB, Guhathakurta S, M CK. 2011. Humanised substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation. *Cell Biol Int*.
- Sato M, Yasui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Ochi T. 1998. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13:1221-31.
- Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, Drexler C, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. 2007. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47:1436-46.
- Schallmoser K, Rohde E, Bartmann C, Obenaus AC, Reinisch A, Strunk D. 2009. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed Mater Eng* 19:271-6.
- Schallmoser K, Rohde E, Reinisch A, Bartmann C, Thaler D, Drexler C, Obenaus AC, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. 2008. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng Part C Methods* 14:185-96.
- Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN. 2005. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 23:1022-8.

- Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I. 2007. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells* 25:1823-9.
- Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone* 28:38-44.
- Schindeler A, Liu R, Little DG. 2009. The contribution of different cell lineages to bone repair: exploring a role for muscle stem cells. *Differentiation* 77:12-8.
- Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S. 2008. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid-an experimental study in rats. *Biomaterials* 29:103-10.
- Schmidt-Nielsen B. 1961. Choice of experimental animals for research. *Fed Proc* 20:902-6.
- Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. 1990. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)* 138:185-92.
- Sengenes C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumie A. 2007. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells* 25:2269-76.
- Sensebe L. 2008. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 18:S3-10.
- Sensebe L, Bourin P, Tarte K. 2011. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 22:19-26.
- Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 5:062001.
- Sever C, Uygur F, Kulahci Y, Torun Kose G, Urhan M, Kucukodaci Z, Uzun G, Ipcioglu O, Cayci T. 2010. Effect of hyperbaric oxygen therapy on bone prefabrication in rats. *Acta Orthop Traumatol Turc* 44:403-9.
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. 2005. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357-66.
- Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. 2001. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* 12:586-93; discussion 594-5.
- Shao X, Goh JC, Huttmacher DW, Lee EH, Zigang G. 2006a. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng* 12:1539-51.
- Shao XX, Huttmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. 2006b. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 27:1071-80.
- Shapiro F. 2008. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15:53-76.
- Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. 2005. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res* 23:1013-21.
- Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. 2005. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 26:137-46.
- Siegbahn A, Johnell M, Sorensen BB, Petersen LC, Heldin CH. 2005. Regulation of chemotaxis by the cytoplasmic domain of tissue factor. *Thromb Haemost* 93:27-34.

- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. 2005. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 33:63-70.
- Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. 2004. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance *in vivo* bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35:562-9.
- Sinclair SS, Burg KJ. 2011. Effect of osteoclast co-culture on the differentiation of human mesenchymal stem cells grown on bone graft granules. *J Biomater Sci Polym Ed* 22:789-808.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. 2000. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:279-303.
- Solheim E. 1998. Growth factors in bone. *Int Orthop* 22:410-6.
- Song HJ, Zhang P, Guo XJ, Liao LM, Zhou ZM, Sha JH, Cui YG, Ji H, Liu JY. 2009a. The proteomic analysis of human neonatal umbilical cord serum by mass spectrometry. *Acta Pharmacol Sin* 30:1550-8.
- Song IH, Caplan AI, Dennis JE. 2009b. *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells *in vivo*. *J Orthop Res* 27:916-21.
- Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML. 2004. "Culture shock" from the bone cell's perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1527-36.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:462-71.
- Soucacos PN, Korompilias AV, Vekris MD, Zoubos A, Beris AE. 2011. The free vascularized fibular graft for bridging large skeletal defects of the upper extremity. *Microsurgery* 31:190-7.
- Speer MY, Chien YC, Quan M, Yang HY, Vali H, McKee MD, Giachelli CM. 2005. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification *in vitro*. *Cardiovasc Res* 66:324-33.
- Srouji S, Ben-David D, Kohler T, Muller R, Zussman E, Livne E. 2011. A model for tissue engineering applications: femoral critical size defect in immunodeficient mice. *Tissue Eng Part C Methods* 17:597-606.
- Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. 2009. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*.
- Stevenson S. 1998. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*:S239-46.
- Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. 1996. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res*:66-74.
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9656-61.
- Stroncek JD, Reichert WM. 2008. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types.
- Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 32:1212-25.
- Sundelacruz S, Kaplan DL. 2009. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol* 20:646-55.

- Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. 2010. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 47:1-4.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11:1553-8.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.
- Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R. 2004. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int* 28:255-65.
- Takazawa Y, Tsuji K, Nifuji A, Kurosawa H, Ito Y, Noda M. 2000. An osteogenesis-related transcription factor, core-binding factor A1, is constitutively expressed in the chondrocytic cell line TC6, and its expression is upregulated by bone morphogenetic protein-2. *J Endocrinol* 165:579-86.
- Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK. 2011. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem* 112:804-17.
- Tang L, Hu W. 2005. Molecular determinants of biocompatibility. *Expert Rev Med Devices* 2:493-500.
- Tarquini R, Perfetto F, Tarquini B. 1998. Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? *Calcif Tissue Int* 63:118-20.
- Tekkotte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. 2011. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int* 2011:504723.
- Thébaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. 2007. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 18:339-45.
- Thein-Han WW, Misra RD. 2009. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 5:1182-97.
- Thimm BW, Wust S, Hofmann S, Hagenmuller H, Muller R. 2011. Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds. *Acta Biomater* 7:2218-28.
- Thomas T, Martin, A., Lafage-Proust, MH. 2008. *Physiologie du tissu osseux*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Appareil Locomoteur.
- Tian XF, Heng BC, Ge Z, Lu K, Rufaihah AJ, Fan VT, Yeo JF, Cao T. 2008. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scand J Clin Lab Invest* 68:58-67.
- Tigli RS, Akman AC, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. 2009. *In vitro* release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 20:1899-914.
- Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B, Zulewski H. 2006. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341:1135-40.
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 102:77-85.

- Tredan O, Grantab R, Dumontet C. 2008. Can tumor hypoxia be turned into a chemotherapeutic advantage? *Bull Cancer* 95:528-34.
- Tremoleda JL, Forsyth NR, Khan NS, Wojtacha D, Christodoulou I, Tye BJ, Racey SN, Collishaw S, Sottile V, Thomson AJ, Simpson AH, Noble BS, McWhir J. 2008. Bone tissue formation from human embryonic stem cells *in vivo*. *Cloning Stem Cells* 10:119-32.
- Troen BR. 2003. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 38:605-14.
- Trueta J, Harrison MH. 1953. The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J Bone Joint Surg Br* 35-B:442-61.
- Tse JR, Engler AJ. 2011. Stiffness gradients mimicking *in vivo* tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One* 6:e15978.
- Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. 2007. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 38 Suppl 1:S11-25.
- Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. 2002. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 13:1605-10.
- Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ. 2007. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28:3965-76.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P. 2002. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106:2263-70.
- Valverde P, Zhang J, Fix A, Zhu J, Ma W, Tu Q, Chen J. 2008. Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *J Bone Miner Res* 23:1775-88.
- Van Blitterswijk C. 2008. Tissue engineering. Academic press series in biomedical engineering.
- Venkatesan J, Kim SK. 2010. Chitosan composites for bone tissue engineering-an overview. *Mar Drugs* 8:2252-66.
- Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. 1998. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* 142:57-65.
- Viateau V, Hannouche D. 2010. B2OA-Tissus osseux-Reconstruction osseuse.
- Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. 2000. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* 79:672-85.
- Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. 2002. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C775-85.
- Vinatier C, Bordenave L, Guicheux J, Amedee J. 2011. Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering. *Med Sci (Paris)* 27:289-96.
- Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Muller-Mai CM. 2004. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 70:370-9.

- Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. 1998. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 71:65-76.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-22.
- Wahl DA, Czernuszka JT. 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* 11:43-56.
- Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. 2006. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* 16:55-9.
- Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. 1997. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138:2953-62.
- Wang J, Ye Y, Tian H, Yang S, Jin X, Tong W, Zhang Y. 2011a. *In vitro* osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. 2011b. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Regen Med* 6:95-109.
- Wang QM, Jones JB, Studzinski GP. 1996. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res* 56:264-7.
- Wang X, Liu L, Zhang Q. 2007a. A study on nano-hydroxyapatite-chitosan scaffold for bone tissue engineering. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 21:120-4.
- Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Bouxsein ML, Faugere MC, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL. 2007b. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117:1616-26.
- Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. 2003. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* 84:205-14.
- Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. 2006. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 43:481-8.
- Wernike E, Montjovent MO, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W, Klenke FM. 2010. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation *in vivo*. *Eur Cell Mater* 19:30-40.
- Williams D. 2008. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials* 29:1737-8.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-3.
- Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. 2005. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 36:840-53.

- Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, Hou H, Tang T, Fan X. 2011. Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater* 6:015013.
- Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, Tang T, Dai K, Lu J. 2006. Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. *Tissue Eng* 12:3535-43.
- Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. 2007. *In vitro* expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Eng* 13:2981-93.
- Yamanouchi K, Satomura K, Gotoh Y, Kitaoka E, Tobiume S, Kume K, Nagayama M. 2001. Bone formation by transplanted human osteoblasts cultured within collagen sponge with dexamethasone *in vitro*. *J Bone Miner Res* 16:857-67.
- Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. 2006. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78:1-11.
- Yamate T, Mocharla H, Taguchi Y, Igietseme JU, Manolagas SC, Abe E. 1997. Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology* 138:3047-55.
- Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24:2582-91.
- Yang XB, Whitaker MJ, Sebald W, Clarke N, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. 2004. Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Eng* 10:1037-45.
- Yeatts AB, Fisher JP. 2011. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48:171-81.
- Yin T, Li L. 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116:1195-201.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115:281-92.
- Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. 1999. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8156-60.
- Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AM, de Ruiter A, Walsh WR, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD. 2010. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13614-9.
- Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL. 2002. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 277:44005-12.
- Zhang P, Wu H, Wu H, Lu Z, Deng C, Hong Z, Jing X, Chen X. 2011. RGD-Conjugated Copolymer Incorporated into Composite of Poly(lactide-co-glycolide) and Poly(l-lactide)-Grafted Nanohydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 12:2667-2680.
- Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. 2008. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res* 466:1777-87.

- Zhao J, Zhang Z, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, Kaplan DL, Jiang X. 2009. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 45:517-27.
- Zhou H, Xu HH. 2011. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 32:7503-13.
- Zou D, Han W, You S, Ye D, Wang L, Wang S, Zhao J, Zhang W, Jiang X, Zhang X, Huang Y. 2011. *In vitro* study of enhanced osteogenesis induced by HIF-1 α -transduced bone marrow stem cells. *Cell Prolif* 44:234-43.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-95.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28.
- Zur Nieden NI. 2011. Embryonic stem cells for osteo-degenerative diseases. *Methods Mol Biol* 690:1-30.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Joëlle Amédée, la directrice du laboratoire et ma directrice de thèse durant ces trois années. Merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir fait confiance. Merci pour ta disponibilité, tu as toujours été présente et tu as toujours su trouver le bon équilibre entre liberté et encadrement, je te remercie pour tout.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury, merci d'avoir été présents et d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Didier Letourneur de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Arnaud, je voudrais te remercier pour ta sympathie et ton humour. Ce fut très agréable et enrichissant d'avoir, ne serait ce qu'un petit peu, travaillé à tes côtés.

Monsieur Drouet, je vous remercie de votre soutien et de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Jérôme Guicheux, merci d'avoir accepté de rapporter ce travail (même si le manuscrit était rempli de fautes d'orthographe !), merci pour tes questions et tes remarques quelques fois aiguisées mais toujours justes et pertinentes, merci de m'avoir déstabilisée.

Monsieur Hardouin, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, votre regard de clinicien a été indispensable.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet regroupant plusieurs laboratoires. Ce projet ITOV a été coordonné par Joëlle Amédée et a donné lieu à de nombreuses réunions à travers toute la France. A chaque fois c'était un réel plaisir de se retrouver (surtout lors de la dernière à Lacanau !). Merci à tous les membres d'ITOV qui ont su joindre l'utile à l'agréable et qui ont fait de ce projet une réelle aventure humaine et scientifique au sein de laquelle je me suis épanouie et j'ai beaucoup appris. Je tiens à remercier en particulier Didier et Catherine pour vos remarques pertinentes qui m'ont fait avancer. Merci à Mohammed pour toutes tes matrices!!! Merci à Valérie, Yannick et Eric pour « l'aventure bioréacteur » ! C'était un vrai plaisir de travailler à vos côtés même si c'a n'a pas été toujours facile on a quand même passé de bons moments ! Merci à Véronique de m'avoir accueilli à Toulouse afin de me former à l'extraction des ADSCs ! Merci à toute l'équipe ABCell bio. Merci à Sylvain pour l'IRM, merci de ta disponibilité. Un grand merci à Silke et à Jean-Christophe pour les expérimentations animales.

Mélanie, ma copine d'ITOV ! Toutes ces réunions n'auraient pas été les mêmes sans toi, je te souhaite tout le bonheur du monde pour la suite de ta vie professionnelle et personnelle.

Je voudrais adresser des remerciements particuliers à Anne-Karine. Notre collaboration a été fructueuse et je suis très fière d'avoir travaillé avec toi. Tu as su me guider, me faire confiance et m'écouter, merci pour ta bonne humeur, ce fut un réel plaisir.

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire.

Je remercie chaleureusement Mumu et Noélie qui m'ont encadrée durant mon premier passage au labo en master 1. J'ai découvert la culture cellulaire à vos côtés, merci pour votre gentillesse et votre esprit pédagogique.

Chantal, merci de toute ton aide et de ton investissement, notamment en biologie moléculaire, merci de m'avoir écoutée. J'ai beaucoup aimé travailler à tes côtés. Merci d'avoir été là, merci pour ta bonne (et ta mauvaise !) humeur, tu vas me manquer !

Reine, ma maman du labo, merci pour toute ton aide et ton soutien, merci de m'avoir accompagnée au bout du monde, j'ai apprécié passer du temps à tes côtés. Tu as toujours été là pour moi merci pour tout et bien plus encore.

Patou, merci pour tout, du fond du cœur.

Merci à tous mes camarades et en particulier Robinou. Partager ton bureau a été un vrai calvaire mais ça me manque déjà ! J'espère qu'on restera amis encore longtemps, merci pour tous ces bons moments passés au labo et en dehors !! Céline, ma deuxième coloc', merci pour tout, merci d'avoir été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans vous ! Sans oublier ma néphrologue préférée, Claire, merci de m'avoir écoutée et soutenue je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse et plein de bonheur dans ta vie familiale !

Merci à tous les autres membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à ce travail et qui ont rendu très agréables ces trois années.

Mon chéri, merci de ton amour et de ton soutien sans faille, je n'y serais jamais arrivé sans toi.

Merci aux deux meilleures amies qu'on peut espérer avoir, Marlou et Rhiannon merci de votre immense soutien et merci d'être là tout simplement.

Bibou, merci d'avoir cru en moi.

Merci à toute ma famille, papi, mamie, j'espère que vous auriez été fiers de moi.

Papa, maman, merci de m'avoir permis d'en arriver là aujourd'hui.

Papa, merci d'avoir été là, merci pour tes encouragements et pour la motivation que tu m'as toujours insufflée.

Maman, merci de m'avoir donné la force, c'est grâce à toi si j'en suis là, je ne sais pas comment te remercier si ce n'est qu'en te dédiant cette thèse.