



# Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement tridimensionnel : application à l'ingénierie du tissu osseux

Julien Guerrero

## ► To cite this version:

Julien Guerrero. Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement tridimensionnel : application à l'ingénierie du tissu osseux. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0200 . tel-01247887

**HAL Id: tel-01247887**

**<https://theses.hal.science/tel-01247887>**

Submitted on 5 Jan 2016

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

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

**THESE PRESENTEE**  
**POUR OBTENIR LE GRADE DE**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

**Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**  
**Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie**

Soutenue publiquement le 13 Novembre 2014 par

**Julien GUERRERO**

Né le 27/11/1988 à Bordeaux

**DEVENIR DES CELLULES SOUCHES**  
**MESENCHYMATEUSES HUMAINES DANS UN**  
**ENVIRONNEMENT TRIDIMENSIONNEL : APPLICATION**  
**A L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX**

Sous la direction de : Joëlle AMEEDÉ

Membres du jury

Dr Didier LETOURNEUR, Paris, France

Dr Alain GUIGNANDON, Saint Etienne, France

Dr Laurent CRONIER, Poitiers, France

Dr Arnaud SCHERBERICH, Bâle, Suisse

Président

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

**Titre : Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement tridimensionnel : application à l'ingénierie du tissu osseux**

**Résumé :** L'ingénierie tissulaire osseuse a pour objectif de repousser les limites existantes de la régénération osseuse. Les stratégies proposées consistent à associer à une matrice tridimensionnelle (3D) des cellules autologues, capables de régénérer en 3D un tissu fonctionnel. Le but de ce travail a été d'étudier l'importance de la communication cellulaire entre les cellules du compartiment stromal et les cellules endothéliales au sein d'une matrice tridimensionnelle poreuse constituée de polysaccharides naturels biodégradables. Nos résultats montrent que l'architecture et la nature de cette matrice permettent de guider la différenciation ostéoblastique des cellules humaines mésenchymateuses issues de la moelle osseuse. L'organisation cellulaire en agrégats observée stimule les interactions cellulaires, et plus particulièrement la formation de jonctions communicantes de type GAP et l'activité des Connexines 43. Nous avons également étudié la fonction des Pannexines 1 et 3 dans la culture 3D. En conclusion, l'ensemble de nos travaux démontre que les interactions cellule-cellule constituent des événements majeurs dans ces mécanismes de régénération tissulaire. Les données cellulaires et expérimentales témoignent de l'intérêt d'utiliser la totalité de la suspension de moelle osseuse pour favoriser à la fois l'ostéoformation et la vascularisation du tissu.

**Mots clés :** ingénierie tissulaire osseuse, cellules souches mésenchymateuses humaine, culture tridimensionnelle, communication cellulaire.

---

**Title : Become of human mesenchymal stem cells in a three dimensional environment : application to bone tissue engineering**

**Abstract :** Bone tissue engineering aims to resolve the existing limitations of bone regeneration methods. One of the proposed strategies consists on the association, within a three-dimensional (3D) matrix, with autologous cells able to regenerate a functional 3D tissue. The purpose of this study was therefore to investigate the impact of cellular communication, between cells of the stromal compartment and endothelial cells, within the three-dimensional porous matrix made of biodegradable natural polysaccharides, focusing on bone repair. Our results show that the architecture and the nature of the 3D macroporous matrix promotes the guidance of mesenchymal stems cells, derived from human bone marrow, towards the osteoblastic lineage. Also, that the organization in aggregates, promoted by the 3D matrices, stimulated cell communication, evidenced by the formation of GAP junctions and activity of Connexins 43. We also focused on the function of Pannexines 1 and 3 for the 3D culture in these matrices of polysaccharides. In conclusion, this work shows that cell-cell interactions play a major role in order to improve bone tissue regeneration. Also, cellular and experimental data demonstrates the advantage of using a total fraction of bone marrow cells to promote both bone formation and vascularization.

**Keywords :** bone tissue engineering, human mesenchymal stem cells, three-dimensional culture, cell communication.

---

**THESE PRESENTEE**  
**POUR OBTENIR LE GRADE DE**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

**Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**  
**Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie**

Soutenue publiquement le 13 Novembre 2014 par

**Julien GUERRERO**

Né le 27/11/1988 à Bordeaux

**DEVENIR DES CELLULES SOUCHES**  
**MESENCHYMATEUSES HUMAINES DANS UN**  
**ENVIRONNEMENT TRIDIMENSIONNEL : APPLICATION**  
**A L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX**

Sous la direction de : Joëlle AMEEDÉ

Membres du jury

Dr Didier LETOURNEUR, Paris, France

Dr Alain GUIGNANDON, Saint Etienne, France

Dr Laurent CRONIER, Poitiers, France

Dr Arnaud SCHERBERICH, Bâle, Suisse

Dr Joëlle AMEEDÉ, Bordeaux, France

Président

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse



*« On ne souhaite pas des choses faciles, on souhaite de grandes choses, des choses ambitieuses, hors de portée. On fait des vœux parce qu'on a besoin d'aide et qu'on a peur. Et on sait qu'on en demande peut-être un peu trop. On continue à faire des vœux pourtant, parce que, parfois, ils se réalisent. »*

***Meredith Grey.***



## REMERCIEMENTS

---

*J'exprime ma gratitude au Docteur Joëlle Amédée pour m'avoir accueilli, encadré et formé au sein de l'Unité Inserm U1026 BioTis « Bioingénierie Tissulaire », et permis ainsi d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Je tiens également à souligner sa patience et sa compréhension (surtout de mes talents d'écrivain) ainsi que la confiance qu'elle m'a accordée.*

*Je remercie Olivier Chassande et Sophia Ziane de m'avoir encadré durant mon Master 1.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres de mon jury de thèse. Merci au Docteur Didier Letourneur d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je tiens également à remercier le Docteur Arnaud Scherberich et le Docteur Laurent Cronier d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que le Docteur Alain Guignandon pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Ma gratitude revient également aux membres de BioTis qui m'ont accueilli, conseillé et épaulé pendant ces nombreuses années :*

*Reine, Damien, Chantal, Murielle, Sylvain, Patrick, Richard, Noélie, Claire et Betty.*

*Mais aussi et plus particulièrement :*

*Hugo, Annabelle, Robin, Sophia, Agathe, Camille, Bruno, Lila, Audrey, Emeline, Charlotte et Roxane.*

*Un grand merci à mon Jedi Master de m'avoir enseigné, à moi petit Padawan, les secrets clairs et obscurs du Western Blot.*

*Je voudrai aussi remercier le Professeur Thierry Fabre et l'ensemble de son équipe de m'avoir fourni en prélèvements de moelle osseuse issues de personnes du 3<sup>ème</sup> âge, sans que j'aie eu besoin de savonner les escaliers des maisons de retraites avoisinantes.*

*Merci également au New Jersey Center for Biomaterials et plus particulièrement à Carmen Batista, Yong Mao ainsi que Joachim Kohn de m'avoir accueilli lors de mon séjour dans le New Jersey. Un excellent cadre de travail et une très bonne expérience multiculturelle avec notamment Helena, Ying-Chen et Edward.*

*Je tiens également à remercier Lorraine Cocquelin pour l'ensemble des corrections de mes interprétations de la langue de Molière.*

*Mes remerciements vont également à mes parents pour leur soutien lors de l'ensemble de mes études mais aussi à mon frère, qui ayant déjà essuyé les plâtres d'un doctorat (certes en géologie, mais un doctorat quand même...) comprenait le délicat parcours d'un thésard.*

*Un grand merci à ma moitié, Camille, pour sa compréhension et sa patience durant tout ce temps passé à mes côtés.*



## RESUME

---

L'ingénierie tissulaire osseuse a pour objectif de repousser les limites existantes des méthodes conventionnelles de régénération osseuse. Il s'agit d'une part de pallier les insuffisances liées aux autogreffes osseuses qui peuvent provoquer une morbidité importante du site donneur et d'autre part de répondre au problème de la vascularisation des greffons de grande taille sur un terrain fragilisé. Les stratégies proposées consistent à associer à une matrice tridimensionnelle (3D) des cellules autologues, capables de régénérer en 3D un tissu fonctionnel. Pendant de nombreuses années, seule la composante ostéoblastique était associée à ces matrices. Le développement et la régénération du tissu osseux fonctionnel dépendent d'une étroite coordination entre les cellules osseuses, les cellules vasculaires ou encore les cellules hématopoïétiques.

Le but de ce travail a été d'étudier l'importance de la communication cellulaire entre les cellules du compartiment stromal et les cellules endothéliales au sein d'une matrice tridimensionnelle poreuse constituée de polysaccharides naturels biodégradables.

Nos résultats montrent que l'architecture et la nature de cette matrice macroporeuse permettent de guider la différenciation ostéoblastique des cellules humaines mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, en l'absence de facteurs ostéogéniques. L'organisation cellulaire en agrégats observée dans ces matrices 3D stimule les interactions cellulaires, et plus particulièrement la formation de jonctions communicantes de type GAP et l'activité des Connexines 43. D'autres protéines de jonctions intercellulaires peuvent également jouer un rôle dans la communication cellulaire et moduler la formation d'un tissu osseux vascularisé. Nous avons en particulier étudié la fonction des Pannexines 1 et 3 dans la culture 3D au sein de ces matrices de polysaccharides. Ces deux protéines de jonction intercellulaire semblent jouer un rôle dans les mécanismes d'agrégation cellulaire et sont associées, du moins pour l'une d'elles, à la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses.

Nous avons pu montrer que la co-culture des HBMSCs et des progéniteurs endothéliaux issus du sang de cordons ombilicaux au sein des matrices stimulait la différenciation des HBMSCs vers le lignage ostéoblastique. L'implantation, en site sous-cutané chez la souris, de ces matériaux précellularisés *in vitro* avec la co-culture, permet d'améliorer la néoformation osseuse et sa vascularisation.

Enfin, afin de se placer au mieux dans un contexte clinique d'ingénierie tissulaire et de reconstruire un tissu osseux, la culture 3D de la fraction totale de moelle osseuse humaine, sans amplification préalable, a été développée au cours de ce travail de thèse.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux démontre que les techniques de prévascularisation en culture 3D, au sein de la matrice de polysaccharides, permettent de favoriser la formation d'un tissu osseux vascularisé. Les interactions cellule-cellule, qu'elles soient homotypiques et/ou hétérotypiques, constituent des événements majeurs dans ces mécanismes de régénération tissulaire. Les données cellulaires et expérimentales témoignent de l'intérêt d'utiliser la totalité de la suspension de moelle osseuse pour favoriser à la fois l'ostéoformation et la vascularisation du tissu.

**Mots-clefs :** ingénierie tissulaire osseuse, cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse humaine, culture tridimensionnelle, matrice macroporeuse de polysaccharides, co-culture cellulaire, différenciation ostéoblastique, communication cellulaire.



## ABSTRACT

---

Bone tissue engineering aims to resolve the existing limitations of conventional bone regeneration methods. This is to overcome the drawbacks presented by bone autografts, including morbidity of the donor site and lack of vascularization in the case of large grafts. One of the proposed strategies consists on the association, within a three-dimensional (3D) matrix, with autologous cells able to regenerate a functional 3D tissue. However, for many years only the osteoblastic component was considered for this approach. Indeed, recent studies have shown that the development and regeneration of functional bone tissue depend on the close coordination between bone, vascular or hematopoietic cells.

The purpose of this study was therefore to investigate the impact of cellular communication, between cells of the stromal compartment and endothelial cells, within the three-dimensional porous matrix made of biodegradable natural polysaccharides, focusing on bone repair.

Our results show that the architecture and the nature of the 3D macroporous matrix promotes the guidance of mesenchymal stem cells, derived from human bone marrow, towards the osteoblastic lineage, without the need for osteogenic factors. Also, that the organization in aggregates, promoted by the 3D matrices, stimulated cell communication, evidenced by the formation of GAP junctions and activity of Connexins 43. Other proteins responsible for the formation of intercellular junctions, and shown to play key roles in cell communication and to modulate the formation of a vascularized bone, were also identified. In particular, we focused on the function of Pannexins 1 and 3 for the 3D culture in these matrices of polysaccharides. Indeed, these two Pannexins appear to play a role in the process of cellular aggregation, and Pannexin 3 could be associated with the differentiation of mesenchymal stem cells towards the osteoblastic lineage.

Here we show that the co-culture with endothelial progenitors, from cord blood, stimulated HBMSCs differentiation towards the osteoblastic lineage. Additionally, the co-culture cellularized matrices shown to sustain bone formation and vascularization in a subcutaneous site.

Finally, and aiming at a streamlined clinical approach, we explored the potential of a 3D culture of human bone marrow total fraction, without prior amplification, for bone tissue engineering applications.

In conclusion, this work shows that prevascularization techniques, within the 3D polysaccharide proposed matrices, promote the formation of a vascularized bone tissue. Homotypic and/or heterotypic cell-cell interactions play a major role in order to improve bone tissue regeneration. Also, cellular and experimental data demonstrates the advantage of using a total fraction of bone marrow cells to promote both bone formation and vascularization.

**Keywords :** bone tissue engineering, mesenchymal stem cells from human bone marrow, three-dimensional culture, macroporous matrix of polysaccharides, cell co-culture, osteoblastic differentiation, cell communication.



# TABLE DES MATIERES

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| SOUS LA DIRECTION DE : JOËLLE AMEEDÉ                               | 0  |
| LISTE DES ABBREVIATIONS                                            | 12 |
| LISTE DES FIGURES                                                  | 14 |
| INTRODUCTION                                                       | 16 |
| I. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX                         | 17 |
| A. Les structures osseuses                                         | 17 |
| i. L'os cortical                                                   | 19 |
| ii. L'os trabéculaire                                              | 20 |
| B. La vascularisation de l'os                                      | 21 |
| i. Le système artériel                                             | 21 |
| ii. Le système veineux                                             | 22 |
| iii. Le système capillaire                                         | 22 |
| C. L'os comme réservoir cellulaire                                 | 22 |
| i. La lignée ostéoblastique                                        | 23 |
| (1) Les ostéoblastes                                               | 23 |
| (2) Les cellules bordantes                                         | 25 |
| (3) Les ostéocytes                                                 | 25 |
| ii. La lignée ostéoclastique                                       | 25 |
| iii. La lignée hématopoïétique                                     | 26 |
| (1) L'érythropoïèse                                                | 26 |
| (2) La leucopoïèse                                                 | 27 |
| (3) La thrombocytopoïèse                                           | 28 |
| iv. La niche endothéliale « vasculaire »                           | 28 |
| D. La matrice extracellulaire du tissu osseux                      | 28 |
| i. La fraction minérale                                            | 29 |
| ii. La fraction organique                                          | 30 |
| E. Les fonctions du tissu osseux                                   | 30 |
| i. Fonction biomécanique et protectrice des organes                | 30 |
| ii. Fonction métabolique                                           | 32 |
| F. Le remodelage osseux                                            | 32 |
| i. La chronologie du remodelage osseux                             | 33 |
| (1) Phase d'activation                                             | 33 |
| (2) Phase de résorption                                            | 33 |
| (3) Phase d'inversion / Phase de réversion                         | 34 |
| (4) Phase de formation                                             | 34 |
| ii. La régulation du remodelage osseux                             | 35 |
| II. LA REPARATION DU TISSU OSSEUX                                  | 37 |
| A. La réparation naturelle                                         | 37 |
| i. L'ossification membranaire                                      | 38 |
| ii. L'ossification endochondrale                                   | 39 |
| B. La chronologie de la réparation osseuse après lésion tissulaire | 40 |
| i. La phase inflammatoire                                          | 41 |
| ii. La phase de réparation                                         | 41 |
| iii. La phase de remodelage                                        | 42 |
| C. Les acteurs de la réparation du tissu osseux                    | 43 |
| i. Acteurs cellulaires                                             | 43 |
| ii. Acteurs biochimiques                                           | 43 |
| iii. Acteurs mécaniques                                            | 43 |

|      |                                                                        |    |
|------|------------------------------------------------------------------------|----|
| D.   | Les limites de la réparation osseuse naturelle .....                   | 44 |
| i.   | Réparation tissulaire et physiopathologie osseuse .....                | 44 |
| ii.  | Les pertes de grand volume et l'importance de la vascularisation ..... | 45 |
| iii. | Les greffes osseuses comme comblement .....                            | 46 |
| (1)  | L'autogreffe .....                                                     | 46 |
| (2)  | L'allogreffe et la xélogreffe .....                                    | 47 |
| (3)  | La technique de Masquelet .....                                        | 47 |
| III. | L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE .....                                  | 48 |
| A.   | La composante matricielle .....                                        | 50 |
| i.   | Le cahier des charges des biomatériaux pour l'ingénierie osseuse ..... | 50 |
| (1)  | Biocompatibilité et ostéointégration .....                             | 50 |
| (2)  | Porosité .....                                                         | 51 |
| (3)  | Propriétés mécaniques .....                                            | 52 |
| (4)  | Biodégradabilité .....                                                 | 52 |
| (5)  | Injectabilité .....                                                    | 52 |
| ii.  | Les différents biomatériaux de substitution .....                      | 52 |
| (1)  | Les matériaux à base de phosphate de calcium .....                     | 53 |
| (2)  | Les polymères .....                                                    | 55 |
| (3)  | Les matériaux composites .....                                         | 57 |
| B.   | La composante cellulaire .....                                         | 57 |
| i.   | Les cellules souches embryonnaires .....                               | 57 |
| ii.  | Les cellules souches adultes .....                                     | 58 |
| (1)  | Les cellules souches mésenchymateuses .....                            | 58 |
| (2)  | Les cellules souches dérivées du tissu adipeux .....                   | 60 |
| (3)  | Les cellules souches dérivées du sang .....                            | 62 |
| (4)  | Les cellules souches dérivées du tissu dentaire .....                  | 62 |
| iii. | Les iPSCs .....                                                        | 63 |
| C.   | Les facteurs biochimiques et mécaniques .....                          | 64 |
| i.   | Facteurs ostéogéniques .....                                           | 64 |
| ii.  | La culture dynamique en bioréacteurs .....                             | 65 |
| (1)  | Bioréacteurs à agitation ou rotatif .....                              | 66 |
| (2)  | Bioréacteurs à perfusion .....                                         | 67 |
| D.   | La vascularisation des implants osseux .....                           | 68 |
| i.   | Les techniques <i>in vitro</i> .....                                   | 68 |
| ii.  | Les techniques <i>in vivo</i> .....                                    | 70 |
| iii. | Fonctionnalisation par des facteurs angiogéniques .....                | 71 |
| IV.  | LA COMMUNICATION CELLULAIRE DANS LE TISSU OSSEUX .....                 | 72 |
| A.   | Les modes de communication cellulaire .....                            | 72 |
| i.   | Jonctions cellulaires .....                                            | 73 |
| (1)  | Les jonctions adhérentes .....                                         | 73 |
| (2)  | Les jonctions communicantes .....                                      | 75 |
| (3)  | Les Pannexines .....                                                   | 76 |
| ii.  | Interactions récepteurs-ligands .....                                  | 77 |
| iii. | Facteurs diffusibles .....                                             | 78 |
| B.   | Les jonctions communicantes dans l'os .....                            | 78 |
| i.   | Fonction dans les cellules du tissu osseux .....                       | 79 |
| (1)  | Cellules mésenchymateuses et la lignée ostéoblastique .....            | 79 |
| (2)  | Ostéocytes .....                                                       | 80 |
| (3)  | Ostéoclastes .....                                                     | 80 |
| ii.  | Fonction dans la mécanotransduction de l'os .....                      | 81 |
| iii. | Connexines et développement du tissu osseux .....                      | 82 |
| C.   | Les différents rôles des Pannexines .....                              | 83 |
| i.   | Pannexines et tissu osseux .....                                       | 83 |
| ii.  | Pannexines et morphologie cellulaire .....                             | 84 |

|      |                                                                                                                                                                                        |            |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| V.   | L'INGENIERIE TISSULAIRE ET LES APPLICATIONS PRECLINIQUES ET CLINIQUES .....                                                                                                            | 84         |
| A.   | Les modèles animaux et leurs caractéristiques .....                                                                                                                                    | 85         |
| i.   | Considérations biologiques .....                                                                                                                                                       | 86         |
| (1)  | Anatomique.....                                                                                                                                                                        | 86         |
| (2)  | Physiologique .....                                                                                                                                                                    | 87         |
| (3)  | Biomécanique.....                                                                                                                                                                      | 87         |
| (4)  | Métabolique .....                                                                                                                                                                      | 88         |
| (5)  | Génétique.....                                                                                                                                                                         | 88         |
| ii.  | Considérations techniques.....                                                                                                                                                         | 88         |
| (1)  | Reproductibilité des modèles expérimentaux.....                                                                                                                                        | 88         |
| (2)  | Critères financiers .....                                                                                                                                                              | 88         |
| (3)  | Ethique et modèles animaux.....                                                                                                                                                        | 89         |
| (4)  | Manipulation des modèles animaux .....                                                                                                                                                 | 89         |
| B.   | Les sites d'implantation et leurs fonctions .....                                                                                                                                      | 89         |
| i.   | Ectopique .....                                                                                                                                                                        | 89         |
| ii.  | Orthotopique : Le modèle de la calvaria .....                                                                                                                                          | 90         |
| iii. | Orthotopique : Implantation au niveau des os longs .....                                                                                                                               | 91         |
| C.   | Les méthodes d'investigation du tissu osseux néoformé .....                                                                                                                            | 93         |
| i.   | Techniques non invasives.....                                                                                                                                                          | 93         |
| (1)  | Microtomographie aux rayons X .....                                                                                                                                                    | 93         |
| (2)  | Imagerie par résonance magnétique (IRM).....                                                                                                                                           | 94         |
| (3)  | Suivi des cellules humaines implantées .....                                                                                                                                           | 95         |
| (4)  | Tomographie d'émissions monophotonique (TEMP).....                                                                                                                                     | 96         |
| ii.  | Techniques invasives .....                                                                                                                                                             | 97         |
| (1)  | Histologie .....                                                                                                                                                                       | 97         |
| (2)  | Histomorphométrie.....                                                                                                                                                                 | 98         |
|      | <b>OBJECTIFS .....</b>                                                                                                                                                                 | <b>100</b> |
|      | <b>RESULTATS .....</b>                                                                                                                                                                 | <b>104</b> |
| I.   | IMPLICATION DE LA PANNEXINE 1 ET 3 DANS LA COMMUNICATION ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES<br>MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE .....                                     | 105        |
| A.   | Introduction .....                                                                                                                                                                     | 105        |
| B.   | Article 1 : .....                                                                                                                                                                      | 105        |
| C.   | Conclusions.....                                                                                                                                                                       | 124        |
| II.  | INTERACTIONS CELLULAIRES ENTRE LES CELLULES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE ET DES PROGENITEURS<br>ENDOTHELIAUX AU SEIN D'UNE MATRICE TRIDIMENSIONNELLE DE POLYSACCHARIDES ..... | 125        |
| A.   | Introduction .....                                                                                                                                                                     | 125        |
| B.   | Article 2 : .....                                                                                                                                                                      | 126        |
| C.   | Conclusions.....                                                                                                                                                                       | 153        |
| III. | LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE COMME UNIQUE SOURCE CELLULAIRE ENDOTHELIALE ET MESENCHYMATEUSE POUR<br>L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX .....                                                    | 155        |
| A.   | Introduction .....                                                                                                                                                                     | 155        |
| B.   | Article 3 : .....                                                                                                                                                                      | 155        |
| C.   | Conclusions.....                                                                                                                                                                       | 179        |
|      | <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>                                                                                                                                               | <b>180</b> |
|      | <b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>                                                                                                                                              | <b>186</b> |
|      | <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>                                                                                                                                                             | <b>190</b> |



## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

### Français :

**3D**: 3 Dimensions  
**AA**: Acide Ascorbique  
**ATP**: Adénosine Tri-Phosphate  
**Ang1**: Angiopoïétine 1  
**βGP**: Beta Glycéro Phosphate  
**BPF**: Bonnes Pratiques de Fabrication  
**Ca<sup>2+</sup>**: ion Calcium divalent  
**CD**: Cluster de Différenciation  
**Col1a1**: Collagène de type 1 alpha-1  
**CSM**: Cellule Souche Mésenchymateuse  
**CSH**: Cellules Souche Hématopoïétique  
**Cx**: Connexine  
**DAPI**: 4', 6'-diamidino-2-phenylindole  
**Dex**: Dexaméthasone  
**ET-1**: Endothéline de type 1  
**FSFL**: Fabrication de Solide sous Forme Libre  
**h**: humain(e)  
**H<sup>+</sup>**: ion Hydrogène monovalent  
**HA**: Hydroxyapatite  
**HS**: Héparane Sulfate  
**I-M**: Intra-Musculaire  
**IMC**: Indice de Masse Corporelle  
**IP<sub>3</sub>**: Inositol tri-Phosphate  
**IRM**: Imagerie par Résonance Magnétique  
**IT**: Ingénierie Tissulaire  
**MEC**: Matrice ExtraCellulaire  
**N-Cad**: N-Cadhérine  
**NTP**: Nucléotides Tri-Phosphate  
**OCN**: Ostéocalcine  
**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé  
**ON**: Ostéonectine  
**OPG**: Ostéoprotégérine  
**OPN**: Ostéopontine  
**PAL**: Phosphatase Alcaline  
**Panx**: Pannexine  
**PGE2**: Prostaglandine de type 2  
**pH**: potentiel Hydrogène  
**PIT**: Produit d'Ingénierie Tissulaire  
**rh**: recombinant(e)  
**RMN**: Résonance Magnétique Nucléaire  
**S-C**: Sous-Cutané

**Sema**: Semaphorine

**TEMP**: Tomographie par Emission MonoPhotonique

**TRAP**: Phosphatase Acide Tartrate Résistante

### Anglais :

**ADSCs**: Adipose Derived Stem Cells

**ALP**: Alkaline Phosphatase

**BMP**: Bone Morphogenetic Protein

**BMSCs**: Bone Marrow Stem Cells

**BSP**: Bone SialoProteine

**Cbfa/runx2**: Core-Binding Factor A1/Runt-related transcription Factor-2

**DEXA**: Dual-Energy X-ray Absorptiometry

**DMP**: Dentin Matrix Protein

**DPDSCs**: Dental Pulp Derived Stem Cells

**EGF**: Epidermal Growth Factor

**EPCs**: Endothelial Progenitor Cells

**ESCs**: Embryonic Stem Cells

**FDA**: Food and Drug Administration (USA)

**FGF**: Fibroblastic Growth Factor

**GFP**: Green Fluorescent Protein

**GJIC**: GAP Junction Intercellular Communication

**GMP**: Good Manufacturing Practice

**H&E**: Hematoxylin and Eosine coloration

**HLA**: Human Leukocyte Antigen

**HSCs**: Hematopoietic Stem Cells

**IGF**: Insulin Growth Factor

**IL**: Interleukin

**IPSCs**: Induced Pluripotent Stem cells

**KO**: Knock Out

**MAC**: Magnetic Activated Cell sorting

**M-CSF**: Macrophage Colony Stimulating Factor

**M-CSFR**: Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor

**Micro-CT**: Micro-Computed Tomography

**MMP**: Matrix MetalloProteinase

**MSCs**: Mesenchymal Stem Cells

**NASA**: National Aeronautic and Space Administration

**NFκB:** Nuclear Factor-kappa B  
**NK:** Natural Killer  
**NLM:** National Library of Medicine  
**ODDD:** Oculo Dento Digital Dysplasia  
**PDGF:** Platelet Derived Growth Factor  
**PGA:** Poly (Glycolic Acid)  
**PLA:** Polylactic Acid  
**PLGA:** Poly Lactic-co-Glycolic Acid  
**PTH:** ParaThyroid Hormone  
**RANK:** Receptor Activating NF-κB  
**RANKL:** Receptor Activating NF-κB Ligand  
**SVF:** Stromal Vascular Fraction  
**TCP:** Tricalcium Phosphate  
**TGF:** Transforming Growth Factor  
**TIMP:** Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**USA:** United States of America  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor

## LISTE DES FIGURES

---

|                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Le squelette humain de face et de dos ( <a href="http://www.cosmovisions.com/squelette.htm">www.cosmovisions.com/squelette.htm</a> ).....                                                                                                         | 18 |
| Figure 2. Organisation de l'os cortical. <i>D'après</i> (1). ....                                                                                                                                                                                           | 19 |
| Figure 3. Structure des os longs. <i>D'après</i> (1).....                                                                                                                                                                                                   | 20 |
| Figure 4. La vascularisation du tissu osseux ( <a href="http://www.aboutkidshealth.ca/BloodCirculationtotheBones.aspx">www.aboutkidshealth.ca/BloodCirculationtotheBones.aspx</a> ). ....                                                                   | 21 |
| Figure 5. Les niches stromale, hématopoïétique et vasculaire présentes dans le tissu osseux et dans la moelle osseuse. <i>D'après</i> (5). ....                                                                                                             | 22 |
| Figure 6. Principaux marqueurs protéiques exprimés lors de la différenciation ostéoblastique. <i>D'après</i> (11). ....                                                                                                                                     | 24 |
| Figure 7. Coupe histologique du tissu osseux après coloration Hématoxyline et Eosine ( <a href="http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab8/lab8.htm">http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab8/lab8.htm</a> )..... | 24 |
| Figure 8. Le lignage ostéoblastique et ostéoclastique dans le tissu osseux. <i>D'après</i> (17). ....                                                                                                                                                       | 26 |
| Figure 9. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques. <i>D'après</i> (5). ....                                                                                                                                                                | 27 |
| Figure 10. La phase minérale et la phase organique de la matrice osseuse. <i>D'après</i> (21). ....                                                                                                                                                         | 29 |
| Figure 11. Contraintes mécaniques et fonctions cellulaires dans les tissus. <i>D'après</i> (24). ....                                                                                                                                                       | 31 |
| Figure 12. Le cycle du remodelage osseux. <i>D'après</i> (27). ....                                                                                                                                                                                         | 34 |
| Figure 13. La différenciation ostéoclastique. <i>D'après</i> (28).....                                                                                                                                                                                      | 35 |
| Figure 14. L'inhibition des MMPs par le TIMP ( <a href="http://hydroclean.integration.client.rbs-fr.net/regulation-des-mmp,10448,fr.html">http://hydroclean.integration.client.rbs-fr.net/regulation-des-mmp,10448,fr.html</a> ).....                       | 37 |
| Figure 15. Les différents types cellulaires impliqués dans l'ossification membranaire et endochondrale. <i>D'après</i> (17).....                                                                                                                            | 38 |
| Figure 16. L'ossification membranaire. <i>D'après</i> (1).....                                                                                                                                                                                              | 39 |
| Figure 17. L'ossification endochondrale. <i>D'après</i> (1). ....                                                                                                                                                                                           | 40 |
| Figure 18. Chronologie de la cicatrisation d'une fracture osseuse. <i>D'après</i> (32).....                                                                                                                                                                 | 42 |
| Figure 19. Cicatrisation d'un défaut osseux métaphysaire de taille critique. <i>D'après</i> (38). ....                                                                                                                                                      | 45 |
| Figure 20. Principe de l'ingénierie tissulaire. <i>D'après</i> (51). ....                                                                                                                                                                                   | 49 |
| Figure 21. Cahier des charges d'un biomatériau de substitution osseuse. <i>D'après</i> ( <a href="http://www.inserm.fr">www.inserm.fr</a> ). ....                                                                                                           | 51 |
| Figure 22. Les différents matériaux de comblement/substituts osseux ( <a href="http://www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/knochenersatzmaterial">www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/knochenersatzmaterial</a> ).....                                   | 53 |
| Figure 23. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les verres bioactifs. <i>D'après</i> (65). ....                                                                                                                                       | 54 |
| Figure 24. Les différents types de cellules utilisés en l'ingénierie tissulaire osseuse : leur source et leur utilisation clinique. <i>D'après</i> (103).....                                                                                               | 59 |
| Figure 25. Procédure d'extraction des ADSCs à partir du tissu adipeux. <i>D'après</i> (111).....                                                                                                                                                            | 61 |
| Figure 26. Le processus d'obtention des iPSCs à partir de cellules somatiques. <i>D'après</i> (129). ....                                                                                                                                                   | 63 |
| Figure 27. La famille des BMPs et leur fonction au niveau tissulaire. <i>D'après</i> (135). ....                                                                                                                                                            | 65 |
| Figure 28. Les principaux bioréacteurs utilisés en ingénierie osseuse. <i>D'après</i> (138). ....                                                                                                                                                           | 66 |
| Figure 29. Un système de bioréacteur à perfusion commercial (© Celtec®). ....                                                                                                                                                                               | 67 |
| Figure 30. Les différentes méthodes de pré-vascularisation des biomatériaux. <i>D'après</i> (154). ....                                                                                                                                                     | 69 |
| Figure 31. Fonctions des Cadhérines dans les interactions cellule-cellule au sein du microenvironnement osseux. <i>D'après</i> (173). ....                                                                                                                  | 74 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 32. Jonctions communicantes de type GAP. <i>D'après</i> (1).....                                                                                                                                                  | 75 |
| Figure 33. Représentation schématique de l'assemblage des jonctions GAP et de leur perméabilité. <i>D'après</i> (177). ....                                                                                              | 76 |
| Figure 34. Structure des Connexines et des Pannexines. <i>D'après</i> (178). ....                                                                                                                                        | 77 |
| Figure 35. La Connexine 43 dans le microenvironnement osseux. <i>D'après</i> (185). ....                                                                                                                                 | 79 |
| Figure 36. Trois exemples de signalisation régulée par la Connexine 43 dans les cellules osseuses. <i>D'après</i> (192). ....                                                                                            | 80 |
| Figure 37. La méchanotransduction dans le tissu osseux. <i>D'après</i> (145). ....                                                                                                                                       | 81 |
| Figure 38. Phénotype osseux des souris sauvages et Cx43 <sup>-/-</sup> . <i>D'après</i> (197).....                                                                                                                       | 83 |
| Figure 39. Les différents modèles d'études utilisés en expérimentations animales ( <a href="http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire">http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire</a> ). ....           | 85 |
| Figure 40. Nombre de publications scientifiques citant un modèle animal entre 1950 et 2010 ( <a href="http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire">http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire</a> ). .... | 86 |
| Figure 41. Implantation d'un biomatériau en sous-cutané chez une souris Nude. <i>D'après</i> (208). ....                                                                                                                 | 90 |
| Figure 42. Implantation d'un biomatériau au sein d'une lésion osseuse de la calvaria de rat Wistar. <i>D'après</i> (213). ....                                                                                           | 91 |
| Figure 43. Suivi longitudinal par radiographie d'une lésion segmentaire réalisée chez un chien. <i>D'après</i> (218). ....                                                                                               | 92 |
| Figure 44. Analyse de la vascularisation au sein d'un biomatériau par microtomographie aux rayons X. <i>D'après</i> (221). ....                                                                                          | 94 |
| Figure 45. Imagerie par IRM d'une lésion osseuse réalisée au niveau du condyle fémorale chez le rat. <i>D'après</i> (224). ....                                                                                          | 95 |
| Figure 46. Visualisation de la bioluminescence de cellules exprimant la luciférase hébergées dans une matrice 3D, à différents temps d'implantation chez une souris Nude. <i>D'après</i> (225).....                      | 95 |
| Figure 47. Visualisation d'ADSCs-Tdtomato hébergées dans une matrice implantée en sous-cutané à différents temps d'implantation. <i>D'après</i> (226).....                                                               | 96 |
| Figure 48. Analyses postopératoires de la structure osseuse au TEMP. <i>D'après</i> (227). ....                                                                                                                          | 97 |
| Figure 49. Différentes colorations réalisées sur des coupes histologiques de tissus osseux. <i>D'après</i> (228). ....                                                                                                   | 97 |

## **INTRODUCTION**

Dans cette revue bibliographique, nous décrirons tout d'abord l'anatomie et la physiologie du tissu osseux en détaillant plus particulièrement l'environnement cellulaire et vasculaire de l'os, ainsi que les principales fonctions qui lui incombent au sein de l'organisme.

Les mécanismes de réparation du tissu osseux feront l'objet d'une deuxième partie, qu'il s'agisse de la réparation naturelle, de celle guidée par un biomatériau ou d'une greffe cellulaire.

Dans une troisième partie, nous présenterons les stratégies envisagées lorsque la réparation naturelle du tissu osseux s'avère insuffisante et nous décrirons des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse. Nous aborderons les différents composants, aussi bien matriciels, cellulaires, biochimiques ou mécaniques qui permettent la régénération d'un tissu osseux fonctionnel. Nous présenterons en particulier l'intérêt d'associer à ces approches différentes stratégies de vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire.

La quatrième partie de cette revue bibliographique sera consacrée à l'étude du rôle de la communication cellulaire qui existe au sein du tissu osseux, c'est-à-dire entre les cellules osseuses et les autres types cellulaires des tissus environnants. Nous présenterons plus particulièrement les interactions entre la niche stromale et la niche vasculaire et leurs fonctions dans l'ostéogénèse ou la réparation osseuse.

Sur la base de ces données biologiques et physiologiques, la cinquième partie sera consacrée aux études précliniques des produits d'ingénierie tissulaire pour la régénération osseuse, en décrivant les différents modèles expérimentaux et les sites d'implantations. Nous terminerons cette revue bibliographique par les différentes méthodes permettant d'étudier le tissu osseux néoformé au sein de ces produits d'ingénierie tissulaire.

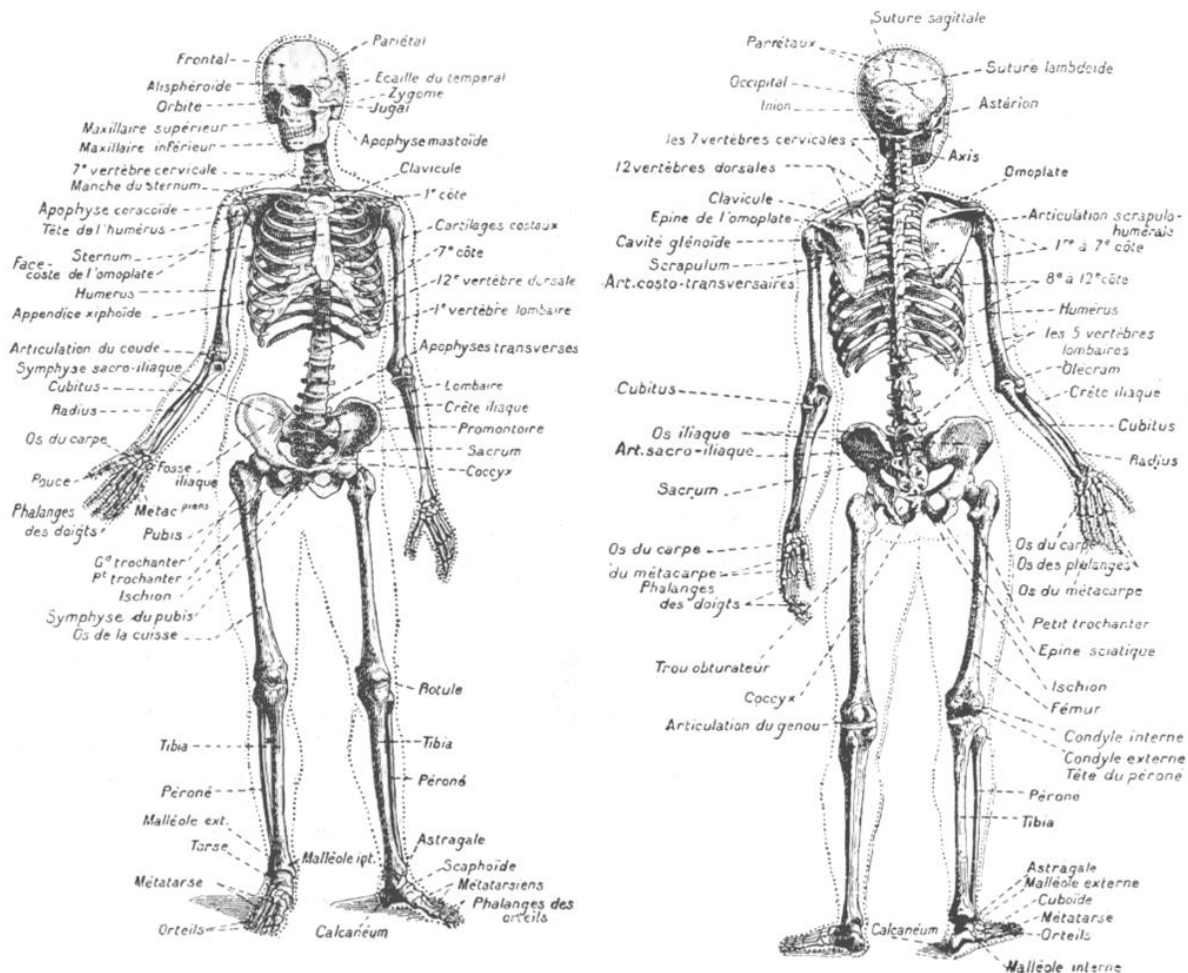
## **I. Anatomie et physiologie du tissu osseux**

### **A. Les structures osseuses**

L'os est un tissu constituant la partie porteuse de l'appareil locomoteur. Il est l'un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter des contraintes mécaniques. Il assure le soutien du corps et la protection de nombreux organes. C'est aussi un tissu dynamique, constamment remodelé sous l'effet des pressions mécaniques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux. Il assure ainsi dans une large mesure (conjointement avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

Le tissu osseux renferme environ 99% du calcium et 90% du phosphate présent dans l'organisme. Cela rend les os opaques aux rayons X et permet ainsi leur étude par radiographie. Les os renferment également, dans leurs espaces médullaires, la moelle osseuse hématopoïétique à l'origine des trois lignées des globules du sang.

Le tissu osseux est composé à 70% d'une phase minérale et à 30% environ d'une phase organique, majoritairement constituée de collagène. L'ensemble des os représente une part importante du corps humain : on recense en effet 206 os, de formes et de tailles variées (**Figure 1**), qui représentent 1/5<sup>ème</sup> du poids du corps humain.



**Figure 1. Le squelette humain de face et de dos (www.cosmovisions.com/squelette.htm).**

On distingue chez l'adulte trois variétés de pièces osseuses sur le plan anatomique: l'os long (tibia, fémur), l'os court (phalanges, tarses et carpes) et l'os plat (os de la voûte du crâne, omoplate, côtes). Sur le plan macroscopique, on distingue deux types d'os ; l'os trabéculaire spongieux et l'os cortical compact.

Les os longs comportent trois régions anatomiques : une partie moyenne ou diaphyse, des extrémités renflées ou épiphyses, et des zones de jonctions diaphyso-épiphysaires aussi appelées métaphyses. A l'observation microscopique, la diaphyse est un cylindre creux à paroi épaisse, composé de tissus conjonctifs (périoste et endoste) et de tissus osseux haversien, entourant une cavité médullaire qui contient la moelle osseuse. Les épiphyses sont essentiellement constituées d'un tissu osseux haversien, recouvert, à sa périphérie, d'une fine couche de cartilage articulaire. Les métaphyses sont des zones constituées de colonnes de tissu osseux spongieux, revêtues d'une mince couche de tissu périostique.

Les os courts présentent quant à eux une structure très voisine de celle des épiphyses des os longs. On retrouve en périphérie une mince corticale de périoste ainsi que du tissu osseux périostique présentant, à la surface, des lamelles parallèles qui entourent le tissu osseux haversien situé au centre de la pièce osseuse.

Les os plats sont formés d'une « table » interne et d'une « table » externe constituées également de périoste et de tissu osseux périostique, entourant une couche centrale de tissu osseux haversien.

### i. L'os cortical

L'os cortical ou « os compact » (**Figure 2**) est principalement constitué d'unités structurales, les ostéons. Ces derniers, composés de lamelles cylindriques disposées en cercles concentriques autour des canaux de Havers, sont constitués principalement de fibres de collagène. Les fibres de collagènes sont toutes orientées dans le même sens au sein d'un ostéon mais leur sens diffère entre chaque unité structurale. Cette organisation leur confère une résistance aux contraintes mécaniques. Entre les lamelles osseuses se situent les ostéoplastes contenant les ostéocytes. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux ou obliques, les canaux de Volkmann. Ces canaux permettent en particulier aux vaisseaux sanguins d'irriguer le tissu osseux et ainsi d'apporter nutriments et oxygène.

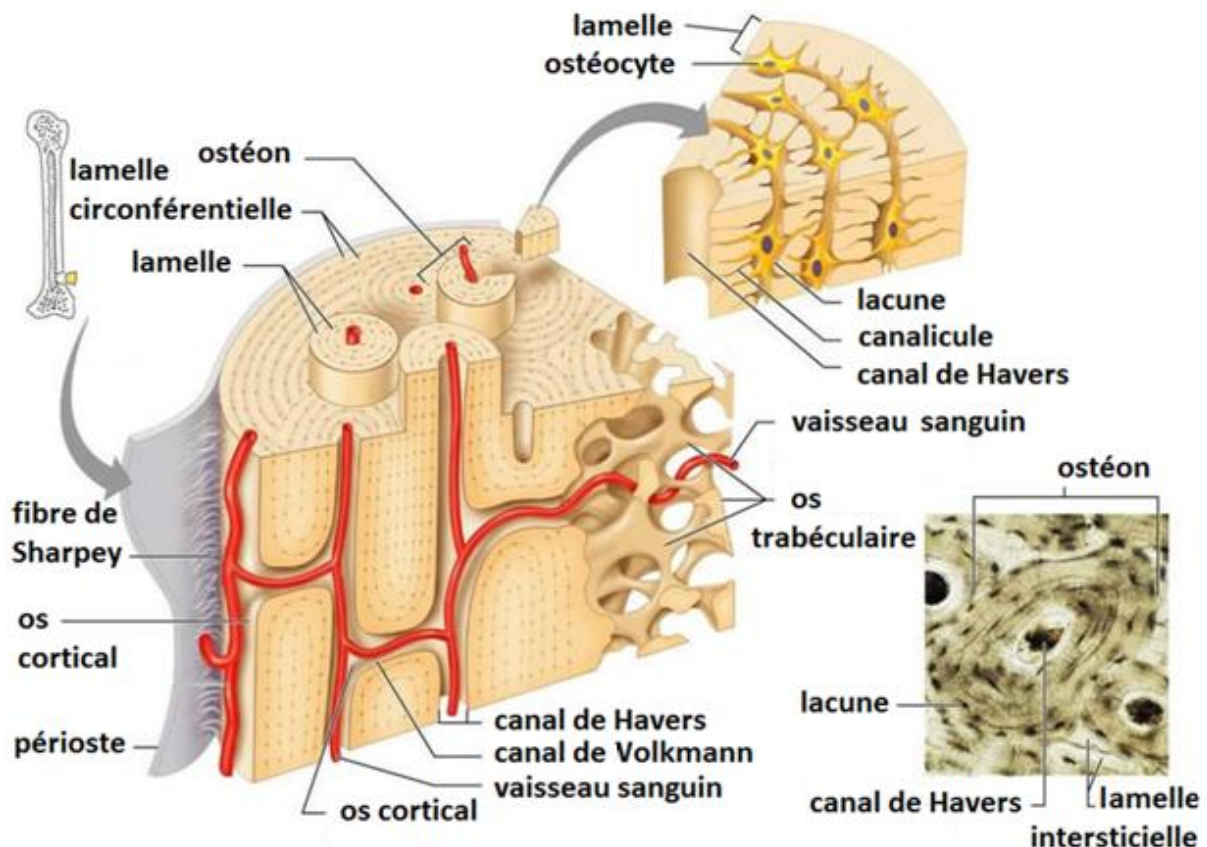


Figure 2. Organisation de l'os cortical. D'après (1).

L'os cortical est bordé, sur la partie externe de la diaphyse, par le périoste qui assure la croissance de l'os en épaisseur. Le périoste est relié à l'os cortical par les fibres de Sharpey qui sont un regroupement de fibres de collagène formant un tissu conjonctif. La partie interne de l'os cortical est bordée par l'endoste. Au niveau des surfaces articulaires ou épiphysaire, l'os cortical est recouvert par du cartilage articulaire.

## ii. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire ou « os spongieux » (**Figure 3**), est formé par un enchevêtrement tridimensionnel ramifié et anastomosé de spicules ou de trabécules de tissu osseux. Les trabécules sont composées de fibres de collagène. Les espaces (appelés alvéoles) intercommunicants de la matrice de ce tissu sont occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux sanguins. L'os trabéculaire dispose d'une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels. Il présente un renouvellement plus rapide que celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle important dans l'équilibre phosphocalcique, alors qu'il ne représente que 20% du squelette adulte.

Le tissu osseux trabéculaire se trouve essentiellement dans les os courts et les os plats (sternum, ailes iliaques), ainsi que dans les épiphyses des os longs. Enfin, il est le siège d'une activité cellulaire importante liée aux fonctions des cellules osseuses, des cellules de la niche vasculaires et de celles de la niche hématopoïétique.

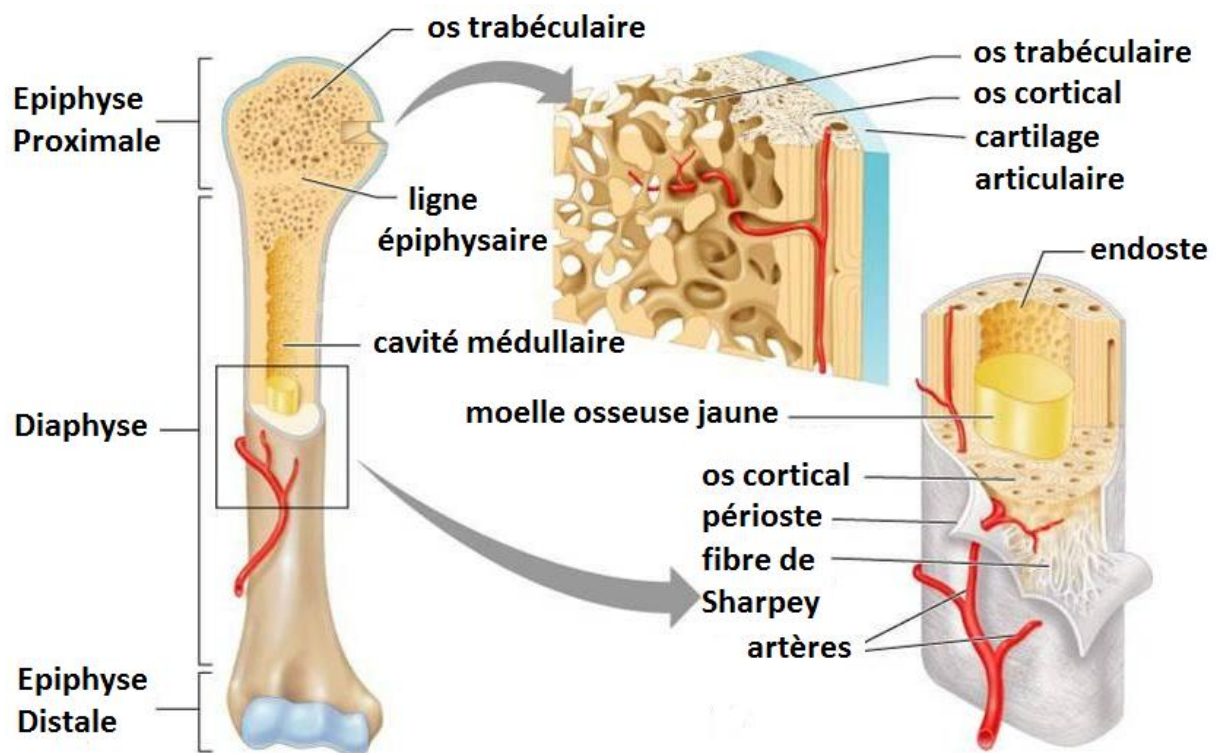


Figure 3. Structure des os longs. D'après (1).

## B. La vascularisation de l'os

L'os est un tissu conjonctif richement vascularisé. La vascularisation d'un os comprend un système artériel ou afférent, un système veineux ou efférent et un système capillaire. La vascularisation tient un rôle très important au sein de ce tissu pour de nombreux processus physiologiques (2-4) que nous décrirons plus loin (Paragraphe II, D, ii, Vascularisation).

### i. Le système artériel

Trois « types » de vaisseaux composent le système artériel qui assure la vascularisation d'un os long (**Figure 4**) :

- L'artère nourricière qui pénètre dans l'os par le trou nourricier, avant de se ramifier en une artère médullaire ascendante ou descendante au moment où elle atteint la cavité médullaire abritant la moelle. Celle-ci assure la quasi-totalité de la vascularisation de la diaphyse.

- Les artères épiphysio-métaphysaire qui sont multiples, pénètrent dans l'os métaphysaire (entre la diaphyse et la ligne épiphysaire) par les zones d'insertions ligamentaires, musculaires et tendineuses. On peut observer une anastomose au niveau capillaire entre ces dernières et l'artère nourricière.

- Les artères périostées dont le rôle principal est d'assurer la nutrition du cortex superficiel. Elles s'anastomosent également avec les terminaisons des artères médullaires de la partie corticale.

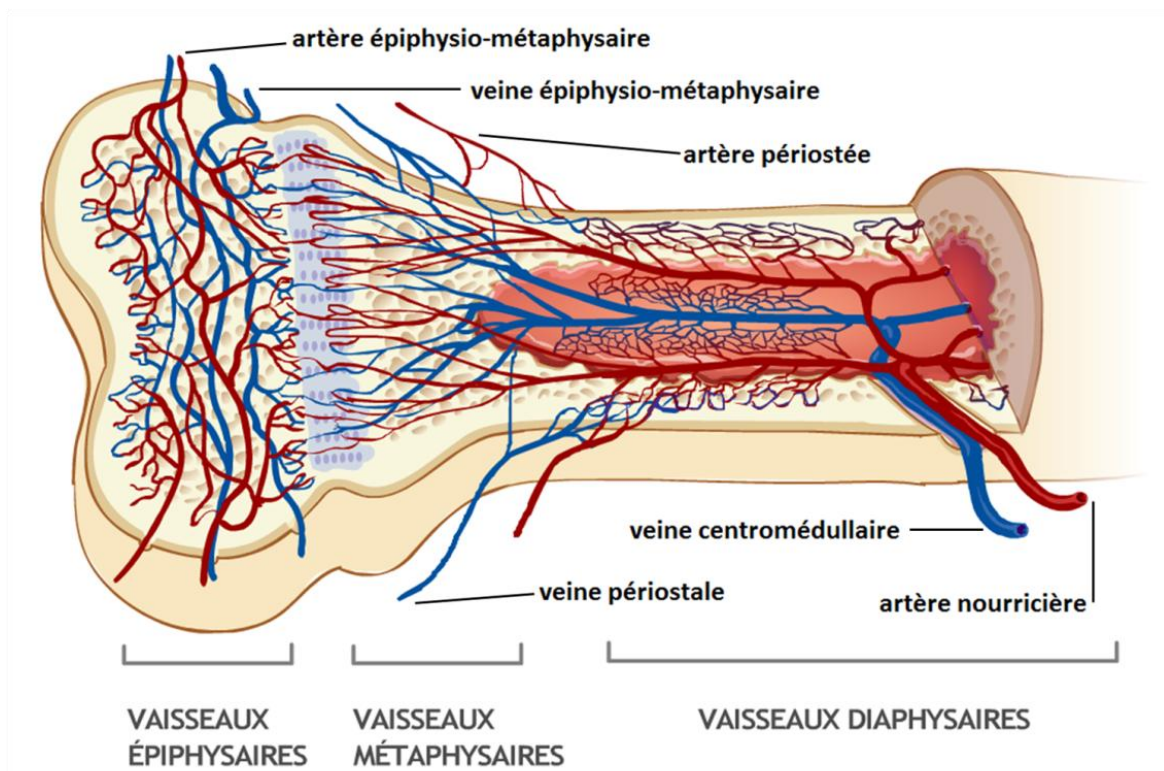


Figure 4. La vascularisation du tissu osseux ([www.aboutkidshealth.ca/BloodCirculationtotheBones.aspx](http://www.aboutkidshealth.ca/BloodCirculationtotheBones.aspx)).

La vascularisation des autres types d'os, en particulier les os plats et courts, est ramifiée et se rapproche plus des réseaux de type épiphysio-métaphysaire.

## ii. Le système veineux

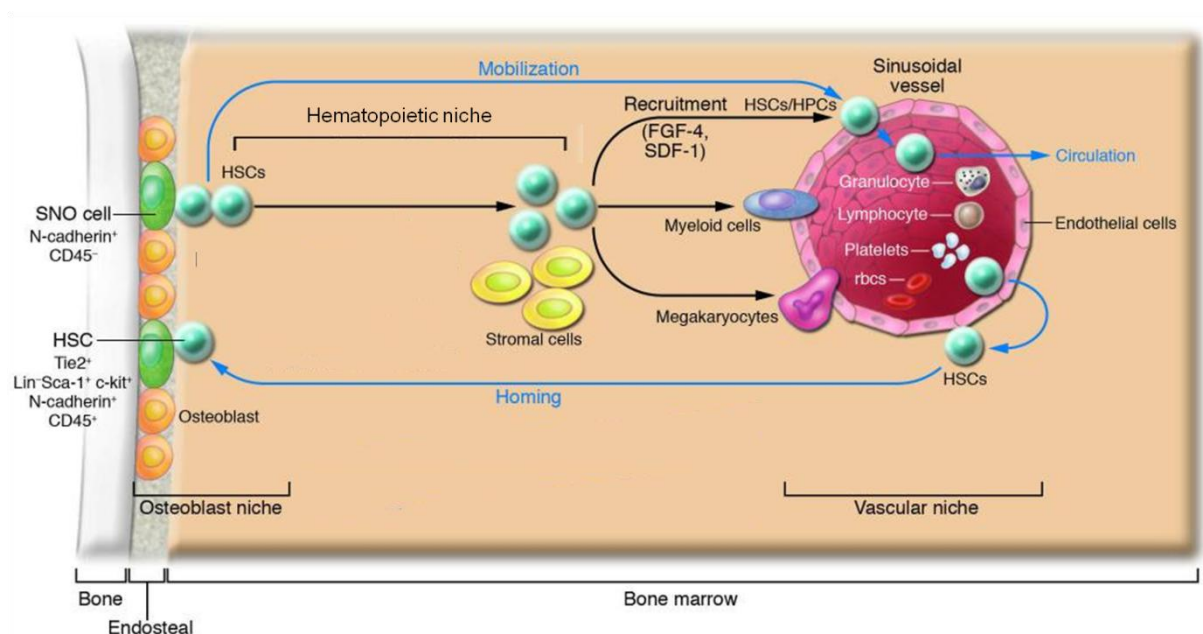
La vascularisation des épiphyses et des métaphyses est assurée par de nombreuses veines épiphysio-métaphysaires satellites des artères. Le tiers interne de l'os cortical est vascularisé par une veine centromédullaire. Par ailleurs, de nombreuses veines collectrices qui rejoignent les veines musculaires partent du périoste. Enfin, un système d'anastomose assure la réunion de ces différents compartiments.

## iii. Le système capillaire

Ce réseau capillaire se compose de petits vaisseaux intra-corticaux et emprunte le système haversien du tissu osseux cortical, il est non anastomosé et irrigue, à partir d'une même artériole, de petits segments de la partie corticale d'une hauteur maximale de 2 mm. Enfin, le périoste entourant l'os au niveau de la diaphyse contient de nombreux capillaires alimentés par les muscles adjacents.

## C. L'os comme réservoir cellulaire

Le tissu osseux héberge plusieurs types cellulaires (**Figure 5**) présentant des fonctions spécifiques organisées principalement en trois niches cellulaires.



**Figure 5. Les niches stromale, hématopoïétique et vasculaire présentes dans le tissu osseux et dans la moelle osseuse. D'après (5).**

Les cellules souches de la niche hématopoïétique (HSCs) résident entre la niche stromale et la niche vasculaire. Une partie des HSCs est mobilisée en réponse au facteur stromal de type cell-derived factor 1 (SDF-1) et des HSCs qui quittent la niche stromale pour passer dans la circulation sanguine.

Le processus inverse est le recrutement ou « homing » des HSCs. Les cellules souches retournent vers la niche hématopoïétique depuis la niche vasculaire.

Une niche cellulaire est un microenvironnement spécifique situé dans un tissu adulte. Des cellules souches y résident, lesquelles prolifèrent et se différencient en un grand nombre de progéniteurs selon les signaux envoyés par les cellules présentes dans ce microenvironnement.

Trois niches ont été mises en évidence ; la niche stromale où résident les cellules souches mésenchymateuses à l'origine des cellules du lignage ostéoblastique, la niche vasculaire où les cellules progénitrices peuvent être modulées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins avoisinants, et la niche hématopoïétique au sein de laquelle les cellules du lignage sanguin et immunitaire sont produites.

## i. La lignée ostéoblastique

La lignée ostéoblastique comprend 3 types cellulaires (6) : les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes.

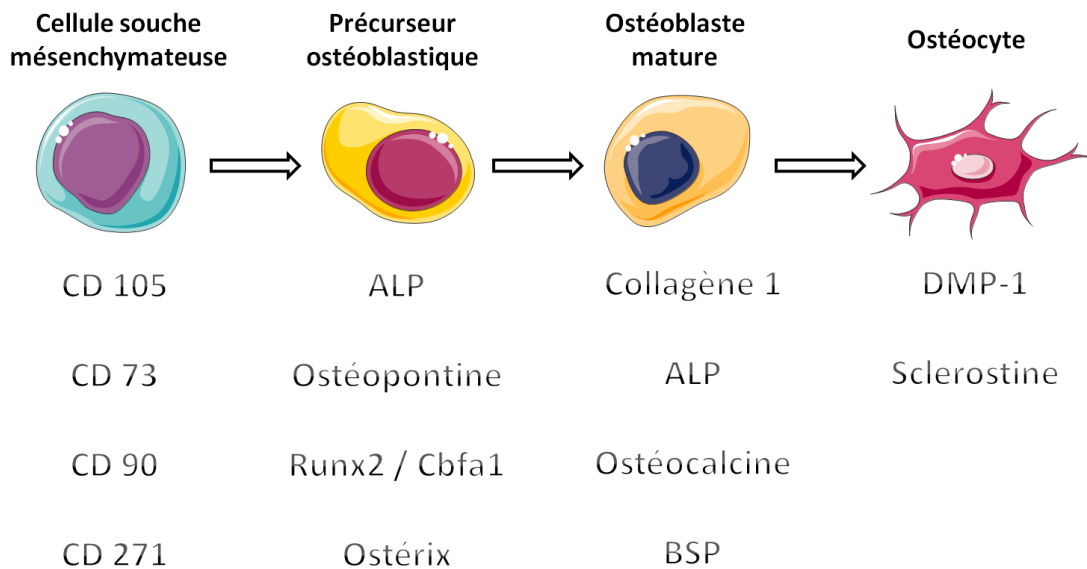
### (1) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la formation osseuse et dérivent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (**Figure 5** et **Figure 8**) (7, 8). Cette différenciation est sous la dépendance du gène maître de la différenciation ostéoblastique, le facteur Runt-related transcription factor 2 / Core-binding factor subunit alpha-1 (Runx2/Cbfa1) (9). Il s'agit d'un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes spécifiques du tissu osseux, comme le collagène de type 1 alpha-1 (Col1A1), l'ostéocalcine (OCN) ou encore la bone sialoprotein (BSP) (10).

La cinétique d'expression des marqueurs ostéoblastiques (11) est présentée dans la **Figure 6**. Les marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique sont le Runx2/Cbfa1, la phosphatase alcaline (PAL) (12), le Col1A1, le transforming growth factor-beta 1 (TGFβ-1), l'ostéonectine (ON) ou encore la bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). Les marqueurs plus tardifs sont l'OCN et l'ostéopontine (OPN). Parmi les facteurs de transcription essentiels à la différenciation ostéoblastique, l'absence totale d'expression de Runx2/Cbfa1 conduit à une inhibition de l'ossification, à une maturation chondrocytaire altérée et à une prolifération adipocytaire. Trois autres facteurs contrôlent également la différenciation des cellules ostéoblastiques vers l'ostéoblaste, à savoir les facteurs ostérix, Msx2 et Dlx5.

Ostérix est un autre facteur de transcription essentiel à la différenciation terminale des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures et interviendrait en aval du facteur Runx2/Cbfa1. Il a été montré qu'Osterix pourrait également être régulé par la BMP2. Quant au gène homéotique Msx2 il agit pour sa part indépendamment de l'activité de Cbfa1/Runx2 (13). Enfin, le gène homéotique Dlx5 stimulerait la différenciation des préostéoblastes en

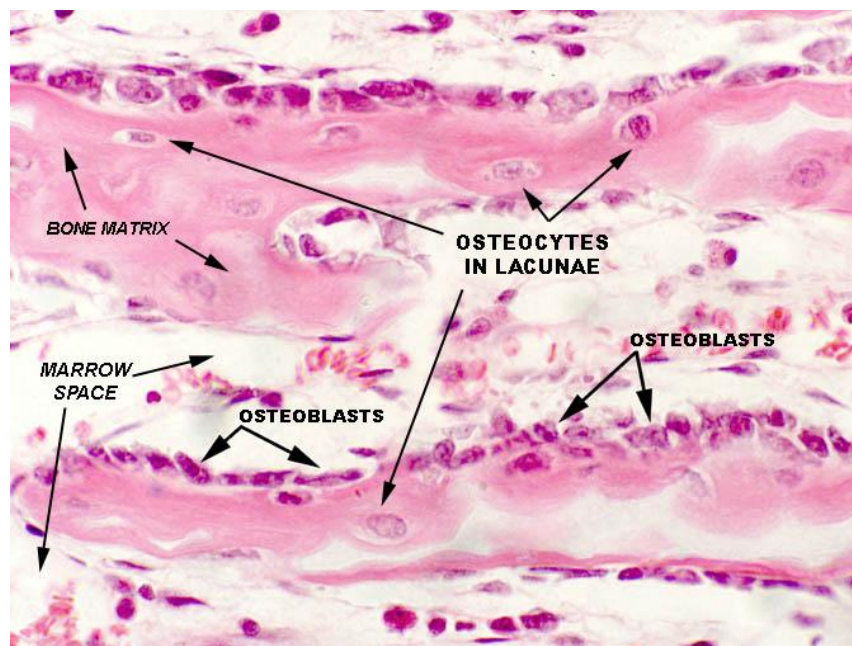
ostéoblastes et la production de protéines d'adhésion comme la fibronectine et le collagène de type I (14).



**Figure 6. Principaux marqueurs protéiques exprimés lors de la différenciation ostéoblastique. D'après (11).**

La différenciation progressive de la cellule souche mésenchymateuse est également caractérisée par l'expression des marqueurs membranaires suivants : CD 105, CD 73, CD 90 et CD 271 et par une cinétique d'expression de marqueurs précoces et tardifs de la différenciation ostéoblastique. La différenciation terminale des ostéoblastes en ostéocytes est caractérisée par l'expression de la sclérostine et de la dentine matrix acidic phosphoprotéine 1 (DMP-1).

D'un point de vue histologique, les ostéoblastes sont organisés en groupes cellulaires souvent agrégés (100 à 400 cellules) autour des sites de formation osseuse (**Figure 7**).



**Figure 7. Coupe histologique du tissu osseux après coloration Hématoxyline et Eosine (<http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab8/lab8.htm>).**

## (2) Les cellules bordantes

Les cellules bordantes dérivent des mêmes précurseurs que les ostéoblastes. Ces cellules peuvent s'allonger et former une couche cellulaire alignée le long des surfaces osseuses osteoïdes. Ces cellules sont disposées en couches à la surface des trabécules d'os matures et forment une barrière entre le milieu intra-osseux et le milieu extra-osseux des espaces médullaires.

Les cellules bordantes ont un rôle essentiel dans la résorption osseuse, car elles recouvrent la matrice osseuse. Elles empêchent ainsi son accès aux ostéoclastes impliqués dans la résorption osseuse. En se rétractant, les cellules bordantes permettent aux ostéoclastes d'accéder à la matrice et permettent sa résorption. Ces événements sont sous le contrôle de différents facteurs de croissance et de différents facteurs hormonaux tels que la vitamine D (principalement son métabolite actif, le  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) ou encore l'hormone parathyroïdienne (PTH). Enfin, les cellules bordantes constituent une réserve de cellules ostéoblastiques, qui sous l'action de différents stimuli, comme la PTH, sont capables d'exercer une fonction d'ostéoblastes actifs.

## (3) Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes matures, issus de la différenciation terminale des ostéoblastes (**Figure 6**). Ils sont emmurés dans la matrice minéralisée au sein de structures appelées ostéoplastes. De fins prolongements cellulaires permettent aux ostéocytes d'être reliés non seulement entre eux mais aussi aux cellules de la surface des travées osseuses par le biais de jonctions communicantes (15). Ce réseau leur permet de transmettre les variations des stimulations mécaniques et biochimiques qui influencent leur métabolisme. Les contraintes mécaniques sont transmises de la partie corticale vers la partie trabéculaire de l'os où résident les activités métaboliques. Ces cellules ont une activité métabolique très faible mais sont capables de synthétiser du collagène de type I qui sera minéralisé dans un deuxième temps.

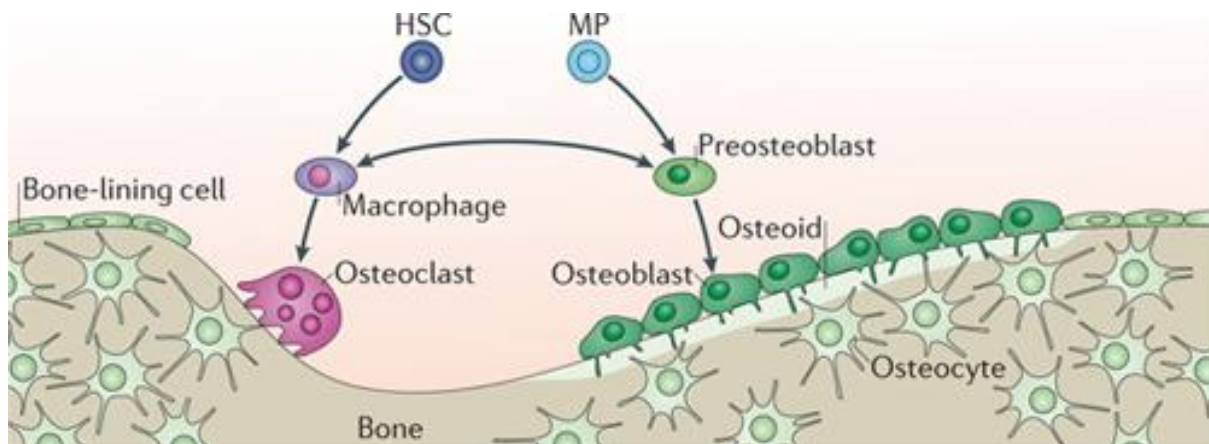
### ii. La lignée ostéoclastique

La lignée ostéoclastique (**Figure 8**) dérive de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocyttaire qui colonisent la moelle osseuse. Les pré-ostéoclastes mononucléés fusionnent pour former des ostéoclastes matures multinucléés. La différenciation des pro-monocytes en ostéoclastes est régulée par différents facteurs de croissance et facteurs de transcription, comme le facteur « macrophage colony stimulating factor » appelé aussi M-CSF, les facteurs TGF- $\beta$  et NF- $\kappa$ B, ou encore l'ostéoprotégérine (OPG).

Le M-CSF, qui se lie à son récepteur (M-CSFR), agit précocement dans la différenciation et entraîne l'engagement des cellules dans la lignée ostéoclastique. Le « receptor activating NF- $\kappa$ B ligand » (RANKL), porté par la membrane des ostéoblastes ou des cellules stromales, se

lie à son récepteur RANK sur les pré-ostéoclastes. Il stimule en outre leur différenciation en activant leur fusion ainsi que l'activité de résorption.

La différenciation et l'activité des ostéoclastes sont régulées par des facteurs sécrétés (OPG, OCIF « osteoclastogenesis inhibitory factor »). 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, et en inhibant ainsi la reconnaissance entre RANKL et RANK (16). Mais les ostéoblastes ne sont pas les seules cellules à influencer les ostéoclastes. Les cellules endothéliales vasculaires sont également capables de réguler l'activité ostéoclastique. Il a été démontré que le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) pourrait stimuler la survie, la différenciation mais aussi l'activité des ostéoclastes (4).



**Figure 8. Le lignage ostéoblastique et ostéoclastique dans le tissu osseux. D'après (17).**

L'homéostasie osseuse est obtenue grâce à l'activité des ostéoclastes (responsables de la résorption osseuse) et à celle des ostéoblastes (responsables de la formation osseuse). Les ostéoblastes proviennent de précurseurs mésenchymateux (MP). Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées dérivées de macrophages, eux-mêmes dérivés du lignage hématopoïétique et des HSCs présentes dans la moelle osseuse.

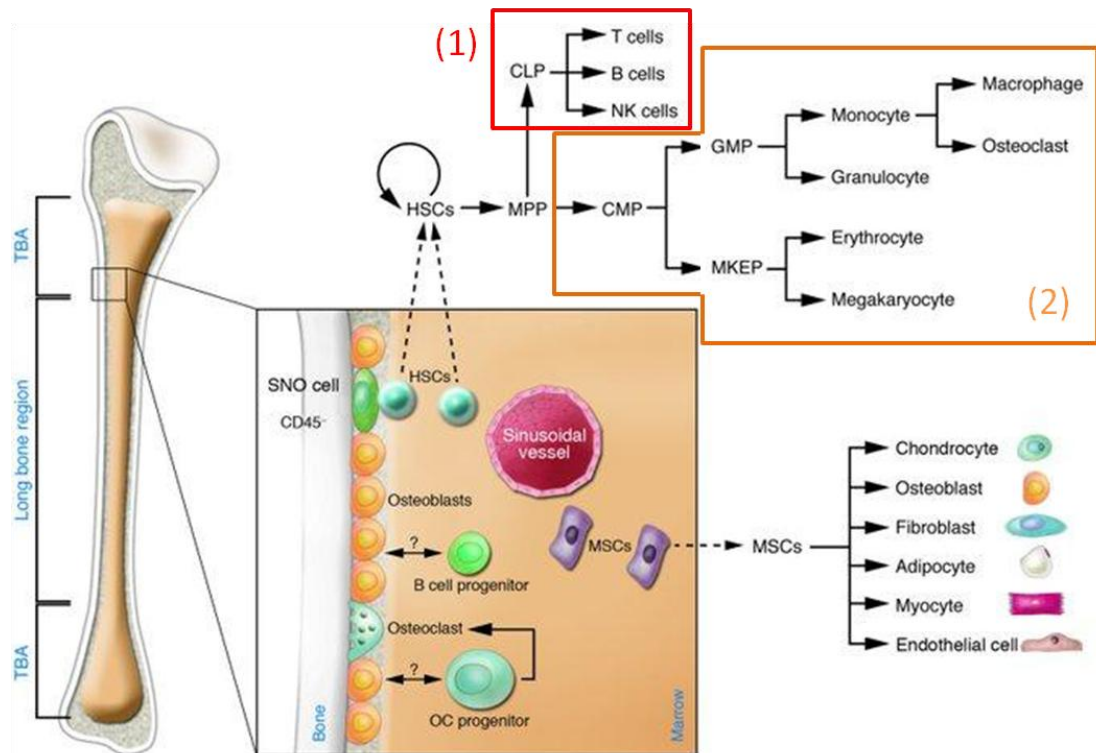
### iii. La lignée hématopoïétique

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse, processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines et immunitaires chez l'adulte. Les cellules souches hématopoïétiques produites lors de l'hématopoïèse sont à la fois capables d'auto-renouvellement mais aussi de différenciation en progéniteurs hématopoïétiques, en réponse à un signal physiologique. Ces progéniteurs peuvent s'orienter vers trois voies différentes : l'érythropoïèse, la leucopoïèse ou la thrombocytopoïèse (**Figure 9**).

#### (1) L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus permettant la fabrication des globules rouges. La cellule souche hématopoïétique entre dans ce processus et devient un pro-érythroblaste puis un érythroblaste d'abord basophile, puis polychromatophile et enfin acidophile. L'une des étapes de cette différenciation est l'éjection du noyau de l'érythroblaste acidophile. La

cellule devient alors anucléée mais contient encore quelques organites (mitochondries, ribosomes). Cette cellule nommée réticulocyte termine son processus de différenciation dans le compartiment sanguin et devient un érythrocyte.



**Figure 9. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques. D'après (5).**

Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation vers les trois lignées. Les cellules souches progénitrices (MPP) issues des cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en deux types de progéniteurs. (1) Les progéniteurs communs aux lymphocytes (CLP) qui se différencient lors de la leucopoïèse en lymphocytes et en cellules NK. (2) Les progéniteurs communs aux cellules myéloïdes (CMP) qui se différencient en granulocytes, en précurseurs des macrophages (GMP), et en mégacaryocytes (MKEP).

## (2) La leucopoïèse

La leucopoïèse est un processus ayant intégralement lieu dans la moelle osseuse et permettant la fabrication des leucocytes. On distingue trois grandes classes de leucocytes :

- Les polynucléaires (ou granulocytes), avec trois sous-catégories ; les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles. Les polynucléaires matures transitent de la moelle osseuse au sang et seront surtout actifs au niveau des tissus conjonctifs.

- Les monocytes dérivent des mêmes progéniteurs tardifs. La première cellule de la lignée monocytaire est le monoblaste qui donne par la suite le pro-monocyte. Les pro-monocytes peuvent se différencier vers de nombreux types cellulaires comme des pré-ostéoclastes au niveau tissu osseux (18).

- Les lymphocytes, comprennent les lymphocytes T, B et les Natural Killers (NK). Leur différenciation s'initie au niveau de la moelle osseuse mais leur maturation est différente selon qu'il s'agisse d'un lymphocyte T (maturation dans le thymus) ou d'un lymphocyte B (maturation dans la moelle osseuse).

### (3) La thrombocytopoïèse

La thrombocytopoïèse est le processus permettant la fabrication des plaquettes. Un mégacaryoblaste se différencie en mégacaryocyte basophile, puis en mégacaryocyte granuleux et pour finir, en ensemble de plaquettes suite à la fragmentation de leur cytoplasme.

L'agrégation et la dégranulation plaquettaire, qui interviennent lors d'une inflammation, entraînent la libération de PDGF qui induit une prolifération des cellules souches mésenchymateuses. Ces dernières données témoignent du rôle des extraits plaquettaires sur la régénération osseuse.

#### iv. La niche endothéliale « vasculaire »

Les cellules souches peuvent être en contact avec les capillaires sinusoidaux de la moelle osseuse (**Figure 9**) et ainsi communiquer avec les cellules endothéliales de ces vaisseaux qui créent la niche endothéliale « vasculaire ». Plusieurs études ont montré que les cellules endothéliales pourraient être responsables du recrutement des cellules souches stromales et hématopoïétiques, notamment par la sécrétion de facteurs comme la pléiotrophine (PTN) (19, 20).

Par ailleurs, l'endothélium sinusoidal fournit un microenvironnement riche en nutriments et en facteurs de croissance, ainsi qu'une forte concentration en oxygène qui est également un des éléments régulateurs des mécanismes de différenciation des cellules progénitrices. Dans ce contexte, la migration des cellules souches lors de leur mobilisation pourrait être orchestrée par les cellules endothéliales vasculaires. La niche vasculaire peut aussi avoir un rôle « d'assistance » des cellules progénitrices lors de leur migration trans-endothéliale, et de leur mobilisation vers la moelle osseuse (processus dit de « homing »).

## D. La matrice extracellulaire du tissu osseux

La matrice extracellulaire osseuse (MEC) est composée en partie de protéines sécrétées par les cellules osseuses et par les cellules environnantes. Cette matrice a la particularité d'être minéralisée et d'être constamment régénérée au cours de la vie pour un couplage étroitement régulé entre résorption et formation.

La matrice extracellulaire occupe environ 90% du volume tissulaire et elle est composée de deux fractions : une fraction minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite, liée à une

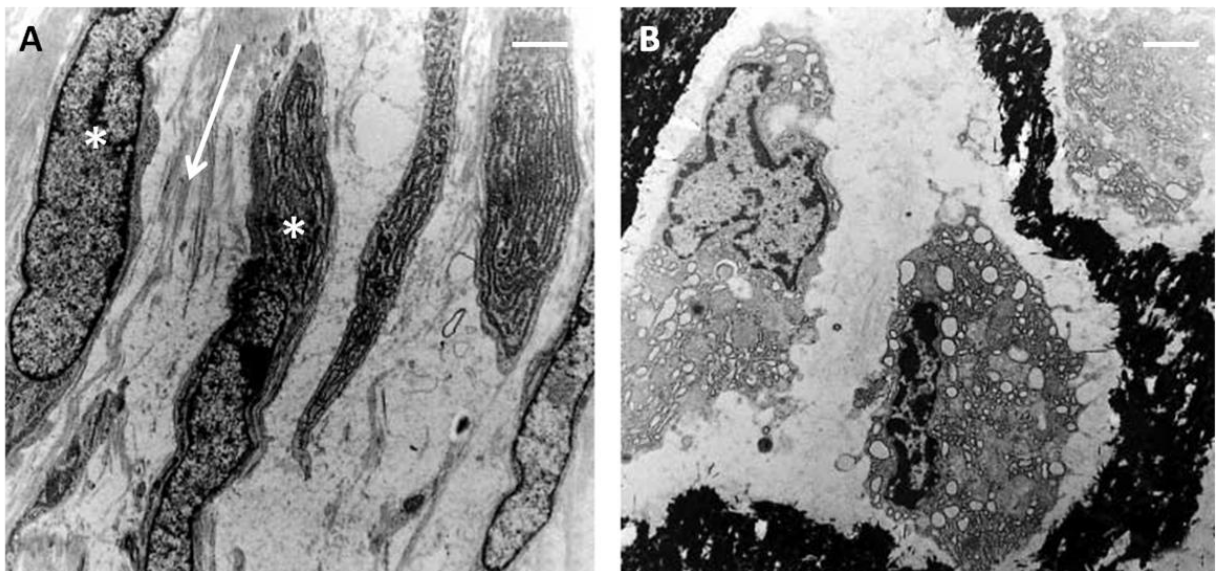
fraction organique constituée dans sa majorité de collagène de type I ainsi que d'autres protéines non-collagéniques (**Figure 10**).

### i. La fraction minérale

Elle est composée de sels minéraux complexes à base de phosphate de calcium et de cristaux d'hydroxyapatite (environ 80%), de carbonate de calcium (environ 14%), de phosphate de magnésium et du fluorure de calcium (environ 6%). On retrouve également d'autres éléments tels que le calcium, le sodium et le potassium ainsi que la présence de fluor.

La fraction minérale du tissu osseux est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite, (phosphate-tricalcique cristallisé) de formule générale  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , qui ont la forme de petites aiguilles de 600 Å de longueur et enfin de carbonate de calcium conférant à l'os sa solidité et ses propriétés mécaniques

Au cours du processus de minéralisation du tissu osseux, les noyaux de cristallisation d'hydroxyapatite sont dans un premier temps localisés au sein des fibrilles de collagène où environ 70% du minéral est déposé. Puis le cristal grossit (croissance cristalline) et comble l'espace disponible. Enfin la minéralisation s'étend à l'espace interfibrillaire. Cette dernière phase durant plus longtemps.



**Figure 10. La phase minérale et la phase organique de la matrice osseuse. D'après (21).**

(A) : Image en microscopie électronique à transmission de deux pré-ostéoblastes (\*) alignés entre les fibres de collagène allongées (flèche) ( $\times 6,900$  ; la barre représente 2  $\mu\text{m}$ ). (B) : Image en microscopie électronique à transmission de deux ostéoblastes entourés par du tissu ostéoïde minéralisé ( $\times 9,200$  ; la barre représente 2  $\mu\text{m}$ ).

De par sa composition chimique, l'os, qui contient environ 99% du calcium de l'organisme, représente ainsi un réservoir de calcium et assure un rôle primordial dans le métabolisme

phosphocalcique. Le calcium peut être très rapidement mobilisable grâce à l'activation des ostéoclastes par différents stimuli tels que ceux induits par les hormones calcitropes comme la parathormone (PTH) ou encore ceux induits par la vitamine D.

## ii. La fraction organique

La fraction organique est constituée d'un grand nombre d'éléments protéiques. Le composant principal est le collagène (environ 90% de la partie organique) que l'on trouve sous forme de fibrilles arrangées sous forme de treillis (**Figure 10**). Le collagène de type I est la forme prédominante mais on observe aussi d'autres types de collagène comme le collagène de type III, le collagène de type V ou encore le collagène de type XII.

Dans les premiers jours de synthèse, la matrice osseuse n'apparaît pas comme un composé organo-minéral. Les éléments protéiques de cette trame organique sont produits par les ostéoblastes, puis cette matrice extracellulaire est progressivement minéralisée. La fraction organique est également composée d'ostéopontine et d'ostéonectine. Ces dernières interviennent dans la minéralisation, de par leur affinité pour les molécules de tropocollagènes, ou avec le calcium. Les cytokines et les facteurs de croissance, produits par l'environnement cellulaire dont les ostéoblastes, assurent un rôle fondamental dans la régulation du remodelage osseux et la minéralisation du tissu osseux.

La fraction organique contient en outre des glycosaminoglycanes sulfatés tels que l'héparane, la kératane et la chondroïtine sulfate qui sont impliqués dans l'agencement des molécules de tropocollagène lors de leur organisation secondaire et tertiaire. Enfin, une faible quantité de lipides est également présente dans le tissu osseux.

## E. Les fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme, tant sur le plan biomécanique et protecteur que sur le plan métabolique. Il s'agit d'une structure dynamique en perpétuel remaniement, capable de s'auto-réparer, d'adapter sa densité, son contenu minéral, sa forme et ses propriétés intrinsèques au sein de l'environnement mécanique dans lequel il se situe.

### i. Fonction biomécanique et protectrice des organes

La biomécanique/mécanique du tissu osseux confère à l'organisme la capacité à supporter des contraintes de différents types et amplitudes et à résister aux forces des contractions musculaires. En effet, l'os forme une charpente qui soutient les parties molles de nos tissus et organes, et établit des systèmes de leviers sur lesquels s'exerce la force du muscle. Un déséquilibre des forces appliquées à l'os (pouvant être la conséquence d'un défaut anatomique) peut induire à long terme un remaniement ou remodelage osseux anormal et une densité osseuse altérée chez l'adulte.

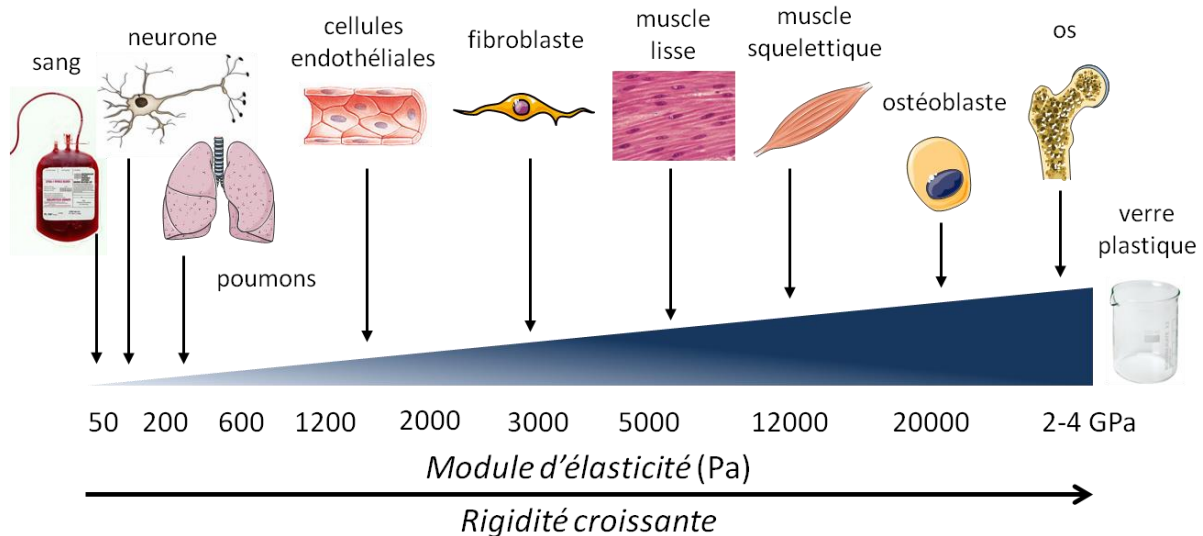
A titre d'exemple, dans le cas d'un *genu valgum*, l'axe mécanique inférieur de la jambe est déporté latéralement et la résultante des forces n'est plus dans le même axe que l'os. Ceci engendre une hyperpression du côté externe et favorise sa densification alors que le côté interne est en hypopression et induit le remodelage.

Dans le cas de l'implantation d'une prothèse orthopédique au niveau du fémur, on observe quelques mois plus tard une perte osseuse significative dans le tissu en contact direct avec l'implant, due au phénomène de « stress shielding ». Ce phénomène est la conséquence d'une contrainte mécanique osseuse, supportée par l'implant métallique massif, et qui entraîne une diminution de la contrainte au niveau du tissu osseux du fémur lui-même.

Dans un troisième cas, l'immobilisation ou l'absence de contrainte peut causer une perte osseuse et être à l'origine de pathologies osseuses comme l'ostéoporose. Ceci est plus particulièrement étudié dans les modèles expérimentaux d'impesanteur (22) et d'un point de vue clinique chez les astronautes qui ne subissent que très peu de contraintes mécaniques en apesanteur (23).

Les propriétés mécaniques de l'environnement matriciel peuvent ainsi modifier le devenir des cellules. Les interactions entre les cellules et leur support génèrent des forces contractiles qui sont transmises au substrat *via* des structures d'adhésions transcellulaires. La rigidité de la matrice sur laquelle les cellules adhèrent et se déplacent peut ainsi modifier ces interactions, induire une réorganisation interne de l'architecture cellulaire et activer une signalisation intracellulaire à l'origine de modifications phénotypiques. Les cellules s'adaptent à la rigidité de leur matrice d'adhésion ainsi qu'au changement d'élasticité.

De façon générale, la prolifération des cellules osseuses, leur différenciation et leur survie cellulaire sont favorisées par une matrice hautement mimétique du tissu osseux (**Figure 11**).



**Figure 11. Contraintes mécaniques et fonctions cellulaires dans les tissus. D'après (24).**

Les tissus de l'organisme peuvent avoir des modules d'élasticités allant de 100 Pa pour les tissus les moins rigides comme le cerveau ou les poumons à 2 à 4 GPa pour les tissus les plus rigides comme le tissu osseux.

## ii. Fonction métabolique

Le tissu osseux joue également un rôle extrêmement important dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. Le métabolisme phosphocalcique est étudié notamment par le dosage de la calcémie, qui correspond au taux plasmatique de calcium.

La calcémie est régulée par deux hormones majeures que sont la vitamine D et l'hormone parathyroïdienne (PTH) ainsi que par une autre hormone, la calcitonine (25). Ces hormones calcitropes agissent par l'intermédiaire de leur interaction avec leur récepteur, le récepteur de la PTH, de la vitamine D ou encore le récepteur au  $\text{Ca}^{2+}$  qui ont pour point commun la présence de 7 domaines transmembranaires.

La vitamine D stimule la résorption osseuse ostéoclastique, mais elle favorise également la minéralisation osseuse en stimulant, par l'augmentation de la phosphatémie, la différenciation des ostéoblastes. La PTH contrôle le métabolisme phosphocalcique, en augmentant la dégradation osseuse ce qui libère du calcium dans le sang. Elle stimule la résorption osseuse par stimulation des ostéoclastes et favorise l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. En ce qui concerne la calcitonine, il s'agit de la seule hormone hypocalcémiante. Son action au sein du tissu osseux est d'inhiber la résorption ostéocalcique. De plus, elle induit la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes, ce qui favorise en outre la mobilisation du calcium dans le tissu osseux.

## F. 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 au cours de l'ostéogenèse, lors de la réparation de fracture ou tout au long de la vie. Il existe une balance très régulée entre formation et dégradation osseuse assurée respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes. 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. Ce remodelage permet en particulier au tissu osseux de s'adapter et de modifier sa structure en fonction des contraintes mécaniques et/ou biochimiques environnantes.

Le remodelage du tissu osseux a lieu dans la totalité du squelette mais chaque unité de remodelage est spatialement et chronologiquement isolée des autres unités. Ceci suggère que les événements cellulaires responsables du remodelage sont contrôlés en partie par le microenvironnement osseux. Plus particulièrement, les cellules impliquées dans le remodelage osseux, présentes au niveau des surfaces osseuses résorbées sont en contact étroit avec les cellules de la cavité médullaire, qui produisent de nombreuses cytokines et de nombreux facteurs de croissance au potentiel ostéotrope.

## i. La chronologie du remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses fonctions cellulaires responsables du couplage entre la résorption et la néoformation osseuse. Ce remodelage obéit entre autres, à la loi de Wolff<sup>1</sup> et permet au tissu cicatriciel d'acquérir sa compétence mécanique.

### (1) Phase d'activation

La surface d'une travée osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès de la MEC aux ostéoclastes. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3 et PGE2) ou inflammatoires (l'interleukine-1, l'interleukine-6 et le TNF- $\alpha$ ), les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent adhérer à la matrice osseuse. L'afflux des ostéoclastes est favorisé par la prolifération de leurs précurseurs mononucléés en réponse à plusieurs molécules, notamment le M-CSF (**Figure 12**) (26).

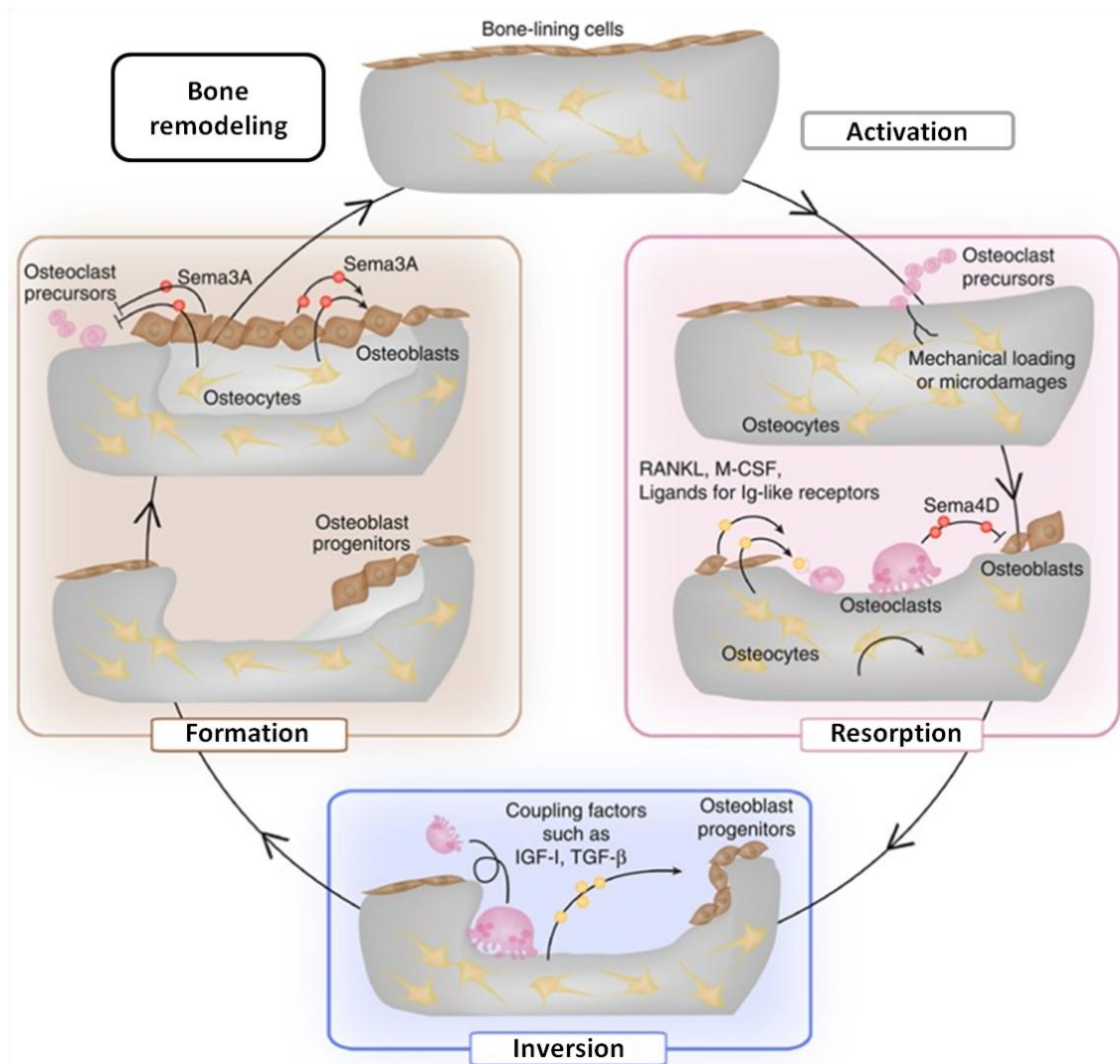
### (2) Phase de résorption

Après cette première phase intervient la phase de résorption (**Figure 12**) au cours de laquelle les cellules ostéoclastiques dégradent l'os ancien et forment une lacune de résorption. Cette phase débute par l'adhésion de l'ostéoclaste à la surface osseuse au niveau de la zone claire (zone qui délimite l'espace de résorption), créant une zone de scellement. La formation d'une zone de scellement conduit à la polarisation de la cellule et à la constitution d'une membrane cellulaire basale présentant de nombreuses invaginations. L'acidité du milieu au sein du compartiment sous ostéoclastique est entretenue par des pompes à protons spécifiques de l'ostéoclaste qui expulsent les ions H<sup>+</sup>. Cette acidité favorise la dissolution du cristal d'hydroxyapatite ce qui libère des minéraux (calcium et phosphore), et permet l'activation des enzymes protéolytiques (comme les collagénases et les cathepsines).

Par le biais de la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique, l'ostéoclast déverse des enzymes protéolytiques, comme la Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRAP), qui permettent la dégradation de la matrice organique ce qui libère des produits de dégradation du collagène. Ces dérivés pourront être dosés dans les urines et constituent ainsi un marqueur d'activité ostéoclastique. Une partie des produits de dégradation de la matrice peuvent être internalisés par l'ostéoclaste *via* des phénomènes d'endocytose puis métabolisés ou relargués par la partie basolatérale de la membrane (transcytose). Enfin, les ostéoclastes reçoivent un signal inhibiteur (comme l'IGF-I ou le TGF- $\beta$ ), leurs prolongements dendritiques se rétractent et les ostéoclastes meurent par apoptose.

---

<sup>1</sup> Loi de Wolff : L'os se forme et se résorbe en fonction des contraintes mécaniques qu'il subit. Sa résistance varie en fonction de la direction dans laquelle la charge est appliquée. L'os est plus fragile en tension qu'en compression. L'activité musculaire modifie les contraintes supportées par les os *in vivo*.



**Figure 12. Le cycle du remodelage osseux. D'après (27).**

Le processus de remodelage osseux est divisé en une phase d'activation, une phase de résorption, puis vient une phase d'inversion/réversion suivie d'une phase de formation.

### (3) Phase d'inversion / Phase de réversion

A la suite de ces deux premières phases intervient une étape intermédiaire, la phase d'inversion ou de réversion (**Figure 12**). Elle correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont « lisser » le fond des lacunes de résorption des ostéoclastes afin d'éliminer les débris restant de la MEC dégradée.

### (4) Phase de formation

La dernière étape est la phase de formation (**Figure 12**), elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond des lacunes de résorption. Ce fond est appelé « ligne cémentante », très bien visualisée en lumière polarisée. Durant cette phase, la Semaphorine 3A (Sema3A), qui est produite par les cellules de la lignée ostéoblastique, réduit l'ostéoclastogénèse en inhibant la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. De façon simultanée, elle favorise la formation de tissus osseux en inhibant la différenciation

adipogénique des cellules mésenchymateuses. Les ostéoblastes comblent la lacune en apposant une nouvelle matrice collagénique non minéralisée aussi appelée tissu ostéoïde, qui sera secondairement minéralisée. La minéralisation a lieu au niveau du front de minéralisation, c'est-à-dire à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé, qui est distant de la surface du tissu ostéoïde de 5 à 30  $\mu\text{m}$ .

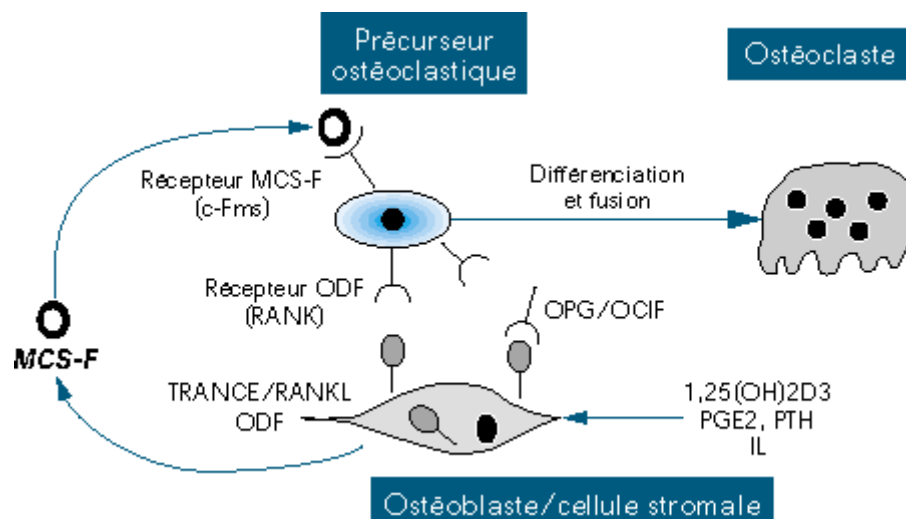
D'un point de vue moléculaire, pendant la phase de formation, les ostéoblastes synthétisent de la phosphatase alcaline (PAL), enzyme capable d'hydrolyser les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation (comme les pyrophosphates) pour les rendre inactifs.

Enfin, les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance pour réguler leur propre métabolisme, ainsi que des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines (Interleukine-1 ou encore le TGF- $\beta$ ). Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et seront ultérieurement libérés lorsque la matrice sera résorbée.

## ii. La régulation du remodelage osseux

L'équilibre entre la formation et la résorption osseuse est assuré par plusieurs facteurs de régulation, mais aussi par les hormones circulantes, les facteurs de croissance locaux ou encore les contraintes mécaniques.

L'un des éléments essentiels de cet équilibre est constitué par le complexe RANK/RANKL (**Figure 13**). Les ostéoblastes régulent la différenciation ostéoclastique en sécrétant le RANKL et l'OPG. En effet, en se fixant à son récepteur RANK, le RANKL est un puissant acteur de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse.



**Figure 13. La différenciation ostéoclastique. D'après (28).**

Les ostéoblastes et les cellules stromales expriment au niveau membranaire le facteur RANKL. Son récepteur RANK est exprimé par les précurseurs ostéoclastiques et induit la différenciation ostéoclastique en présence de M-CSF. L'ostéoprotégérine (OPG) est le récepteur soluble de RANK et inhibe la liaison sur son récepteur membranaire présent sur les précurseurs ostéoclastiques. La vitamine D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la parathormone (PTH) ou encore l'interleukine 1 (IL1) constituent des facteurs qui favorisent la différenciation ostéoclastique.

A l'opposé, l'OPG se lie au RANKL, empêchant toute liaison avec son récepteur et inhibe la différenciation ostéoclastique. Le système RANKL/OPG, médiateur de cette communication entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce ainsi un rôle fondamental dans la régulation de l'ostéoclastogénèse et dans le remaniement du tissu osseux.

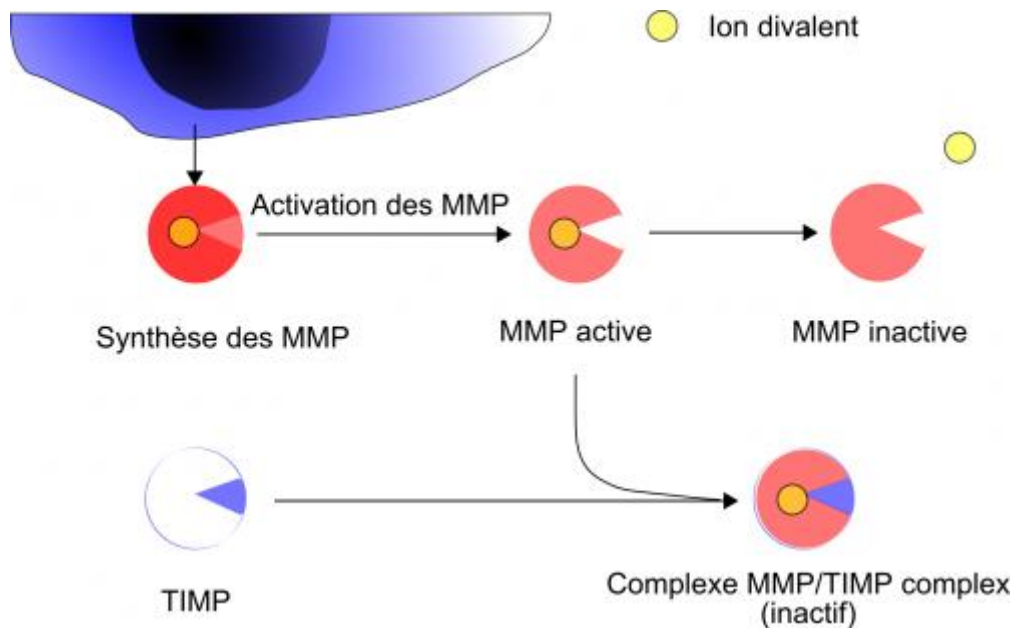
De même, de multiples facteurs séquestrés dans la MEC peuvent stimuler la formation osseuse. Le TGF- $\beta$  constitue l'un des facteurs de croissance les plus abondamment stockés dans la matrice osseuse. Une fois libéré et clivé, il devient actif et, du fait de ses propriétés chimiotactiques, il est capable de recruter différents types cellulaires au site de réparation comme les précurseurs ostéoblastiques ou encore les cellules endothéliales. Il peut également exercer un effet inhibiteur sur l'activité des ostéoclastes et un effet stimulateur sur la fonction ostéoblastique.

Les protéoglycanes (PGs) sont des glycoprotéines auxquelles sont attachées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Ils participent indirectement au contrôle du remodelage osseux. Les GAGs sont des polymères d'unités disaccharidiques qui s'associent à une grande variété de protéines, matricielles ou membranaires, parmi lesquelles se trouvent plusieurs récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines. La décorine et le biglycane appartiennent à la famille des protéoglycanes riches en leucine (SLRP : small Leucin-Rich Proteoglycan) et sont majoritaires dans l'os. La décorine est impliquée dans la fibrillogenèse 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 (29). Les PGs sont généralement associés aux fibres de collagène de type I. Ils sont des régulateurs de la formation et de la stabilité de la trame collagénique. Ils pourraient être également impliqués dans le processus de minéralisation de la matrice osseuse. Ils jouent enfin un rôle important dans le stockage matriciel et la présentation de facteurs de croissance, notamment le TGF- $\beta$  et de cytokines (IL-1, IL-6) influençant la prolifération et la différenciation cellulaire.

D'autres facteurs de croissance tels que les BMPs, le VEGF, le bFGF ou encore l'IGF peuvent stimuler la formation osseuse. Certains de ces facteurs liés à la matrice sont libérés lors de la résorption de la matrice sous l'action des MMPs. Une fois activées, ces dernières (**Figure 14**) sont capables de dégrader les composants de la MEC mais aussi des molécules non matricielles. Elles permettent également la migration des cellules et participent à différentes fonctions cellulaires comme l'adhésion, la prolifération ou l'apoptose. Elles régulent également l'activité d'autres protéases et modulent l'activité biologique de certaines molécules en les clivant et en les libérant de la MEC.

Suite à leur sécrétion, les MMPs peuvent cliver la liaison à l'héparine qui existe entre la MEC et les molécules séquestrées, ce qui entraîne leur libération. L'activité des MMPs est régulée par les TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinases) qui exercent une fonction inhibitrice des MMPs. Dans le tissu osseux, il a été montré que les MMP9 et MMP13 sont des régulateurs majeurs du remodelage osseux. Elles coordonnent la dégradation de la MEC mais

permettent aussi le recrutement de cellules souches et leur différenciation en cellules ostéogéniques et endothéliales.



**Figure 14. L'inhibition des MMPs par le TIMP (<http://hydroclean.integration.client.rbs-fr.net/regulation-des-mmp,10448,fr.html>).**

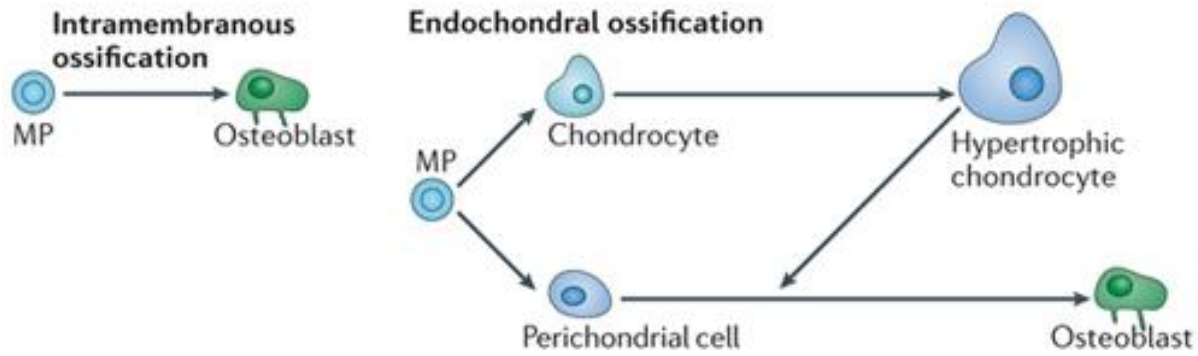
Une fois synthétisées par les cellules, les MMPs sont activées par protéolyse pour libérer leur site actif. La formation d'un complexe non-covalent entre une TIMP et une MMP induit son inactivation.

D'un point de vue physiologique, la dégradation de la matrice extracellulaire du tissu osseux par les MMPs permet de créer un microenvironnement favorable à l'invasion cellulaire et à l'infiltration vasculaire, deux processus qui interviennent dans la réparation de l'os.

## II. La réparation du tissu osseux

### A. La réparation naturelle

Au cours de l'ostéogenèse ou d'un processus de réparation du tissu lésé, l'os se régénère par remplacement et remodelage d'un tissu conjonctif préexistant. Les deux mécanismes de formation (**Figure 15**) du tissu osseux observés chez l'embryon sont l'ossification membranaire, dans laquelle le tissu osseux se dépose directement dans le tissu conjonctif primitif, et l'ossification endochondrale au cours de laquelle le tissu osseux remplace un cartilage hyalin préexistant mettant en œuvre des cellules de type chondrocytaire.



**Figure 15. Les différents types cellulaires impliqués dans l'ossification membranaire et endochondrale. D'après (17).**

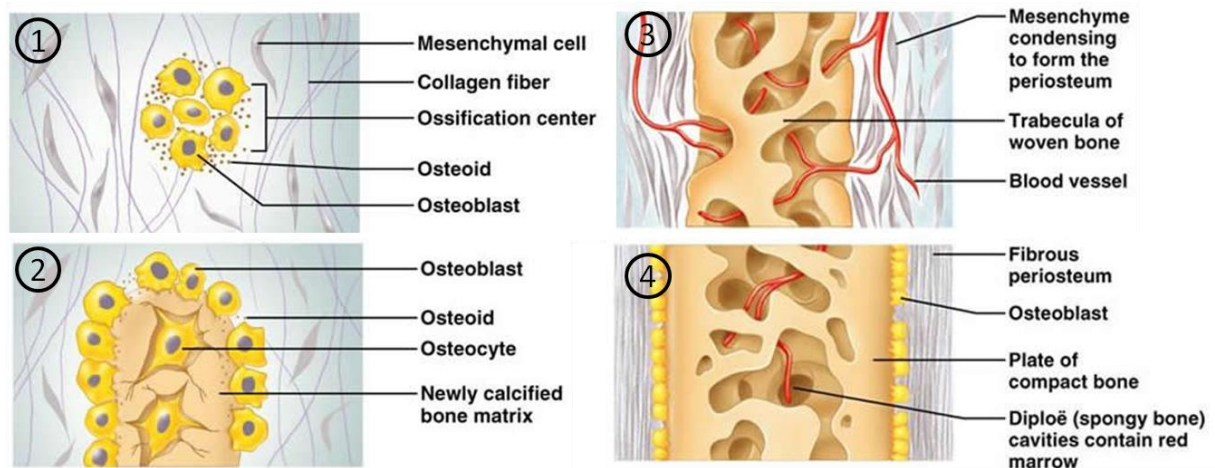
Les ostéoblastes se différencient à partir des progéniteurs mésenchymateux (MP). Au cours de l'ossification membranaire, les MPs se différencient vers le lignage ostéoblastique. En revanche, au cours de l'ossification endochondrale, les MPs se différencient dans un premier temps vers le lignage chondrocytaire, puis deviennent par la suite hypertrophiques. Ils peuvent également évoluer alternativement vers des cellules péri-chondriales (cellules présentes en bordure du cartilage) puis en ostéoblastes sous l'effet de facteurs sécrétés par les chondrocytes hypertrophiques.

#### i. L'ossification membranaire

Elle concerne l'ossification des os de la voûte du crâne et les os de la face. Un centre d'ossification (**Figure 16, 1**) apparaît dans la membrane de tissu conjonctif fibreux, les cellules mésenchymateuses se regroupent au centre et se différencient en ostéoblastes pour former un centre d'ossification. Une matrice osseuse non minéralisée (ostéoïde) est sécrétée (**Figure 16, 2**) à l'intérieur du tissu fibreux synthétisé. Ce tissu ostéoïde s'accumule entre les vaisseaux sanguins qui forment un réseau vasculaire aléatoire. Puis la matrice se minéralise en quelques jours, le tissu conjonctif se transforme alors en un réseau de trabécules minéralisées richement vascularisé (**Figure 16, 3**). Les ostéoblastes piégés dans cette matrice osseuse minéralisée sont au stade terminal de leur différenciation et acquièrent le phénotype des ostéocytes.

De nombreux centres d'ossification se développent et fusionnent ultérieurement, constituant un réseau de travées anastomosées, pour former l'os trabéculaire primaire (30). Sur les faces externes, le tissu conjonctif se condense et devient le périoste. Puis une couche d'os compact se constitue entre l'os trabéculaire et le périoste, qui sera par la suite remplacée par de l'os lamellaire (cortical) mature. Enfin, l'os spongieux situé entre les deux lames d'os cortical sera colonisé par de la moelle osseuse (**Figure 16, 4**).

D'un point de vue moléculaire, un grand nombre de gènes interviennent et sont impliqués au cours de l'ossification membranaire. C'est le cas du facteur Wnt16, un facteur de développement des os longs, démontré comme un des acteurs principaux de l'ossification membranaire (31).



**Figure 16. L'ossification membranaire. D'après (1).**

(1) : Un centre d'ossification apparaît dans la membrane du tissu conjonctif fibreux. (2) : Une matrice osseuse ostéoïde est sécrétée dans le tissu fibreux. (3) : Formation de l'os trabéculaire et du périoste. (4) : Formation de tissu osseux compact et apparition de la moelle osseuse.

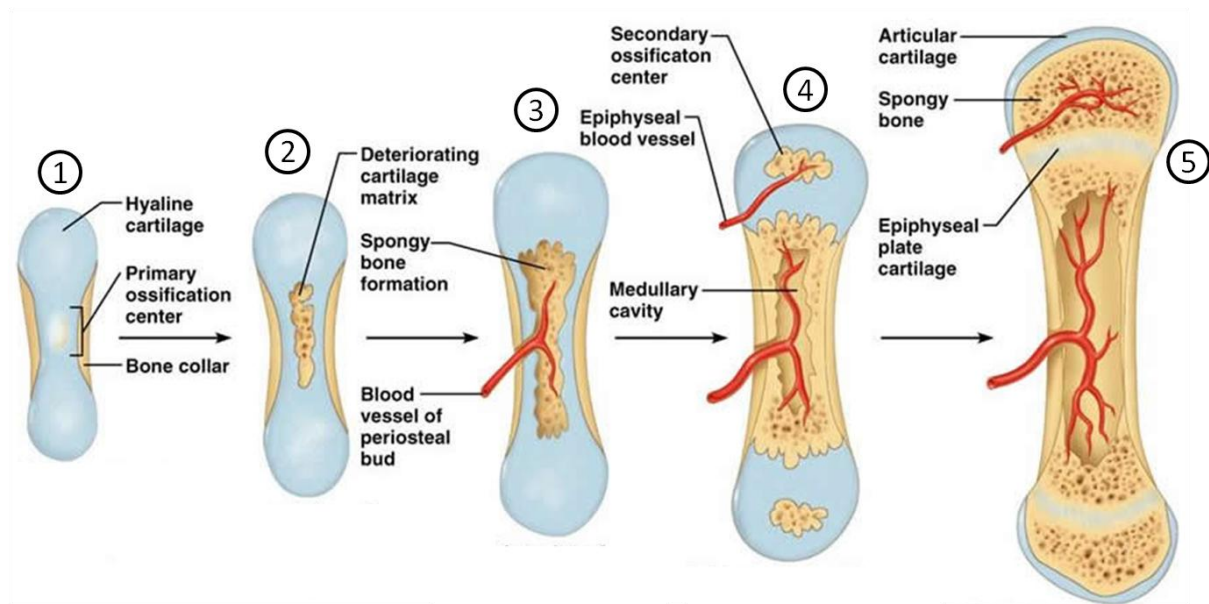
## ii. L'ossification endochondrale

Elle est à l'origine des os longs et se développe à partir d'une ébauche cartilagineuse (**Figure 17, 1**). Comme décrit précédemment, un centre d'ossification primaire se forme (**Figure 17, 2**) et des cellules chondrocytaires synthétisent une matrice extracellulaire contenant en partie du collagène de type II. Par la suite, les chondrocytes de la région centrale parviennent à maturation, s'hypertrophient et synthétisent de nombreux facteurs angiogènes de même qu'une matrice contenant principalement du collagène de type X.

Parmi les facteurs angiogènes, le VEGF, produit par les chondrocytes hypertrophiques, stimule en particulier la formation d'un réseau vasculaire (**Figure 17, 3**). L'ensemble de ces événements aboutissent à la formation du centre d'ossification primaire, au sein duquel les chondrocytes hypertrophiques rentrent en apoptose tandis que la calcification de la matrice a lieu dans la partie centrale du modèle cartilagineux.

Dans le même temps, les cellules périchondrales internes expriment un phénotype ostéogénique, formant une fine collerette de périoste autour de la diaphyse. Puis les vaisseaux sanguins envahissent l'espace occupé préalablement par les chondrocytes hypertrophiques, ils se ramifient et forment un réseau vers chaque extrémité du centre d'ossification. Des cellules ostéoprogénitrices et des cellules souches hématopoïétiques gagnent le cœur du cartilage calcifié par l'intermédiaire du tissu conjonctif périvasculaire entourant les vaisseaux sanguins invasifs. Les centres d'ossifications secondaires se développent ensuite dans les épiphyses (**Figure 17, 4**).

Enfin, la croissance en longueur des os longs dépend de la croissance interstitielle du cartilage hyalin tandis que le centre du cartilage est progressivement remplacé par de l'os au niveau des zones d'ossification équidistantes (**Figure 17, 5**).



**Figure 17. L'ossification endochondrale. D'après (1).**

(1) : Formation de tissu périostique autour du cartilage hyalin. (2) : Formation d'une cavité au centre du cartilage hyalin. (3) : Invasion de la cavité par des vaisseaux et formation de l'os spongieux. (4) : Formation de la cavité médullaire et ossification secondaire dans les épiphyses. (5) : Fin de l'ossification épiphysaire.

La plus grande partie du cartilage hyalin de l'épiphyse est alors remplacé par de l'os spongieux, excepté au niveau du cartilage artriculaire et de la plaque de croissance épiphysaire.

## B. La chronologie de la réparation osseuse après lésion tissulaire

La lésion osseuse la plus commune est une fracture (**Figure 18**), qui est définie comme une discontinuité de l'os. Il existe plusieurs types de fractures selon le type de rupture appliquée à l'os. Quand une force perpendiculaire à l'axe long de l'os est appliquée, elle produit une fracture transversale. Une force de même sens que l'axe long de l'os fournit une fracture par compression. Les forces de torsion engendrent des fractures en spirale, et les tensions qui combinent forces de cisaillement et de compression provoquent une angulation et un déplacement des extrémités fracturées.

Les fractures s'accompagnent d'une lésion des tissus mous adjacents. Dans cette situation, il y a souvent une vaste nécrose musculaire, une hémorragie en raison du cisaillement des lits de capillaires et des vaisseaux de ces tissus, ainsi que la déchirure des insertions/pièces jointes ligamentaires/tendineuses. Il peut exister également des dommages au niveau des structures nerveuses, causés par l'étirement ou la déchirure des nerfs qui innervent l'ensemble du tissu osseux.

Dans ce contexte, la régénération/réparation du tissu osseux peut être divisée en trois phases ; la phase inflammatoire, la phase de réparation puis la phase de remodelage. La durée de chaque phase dépend de l'âge du patient, de son état de santé, du site de fracture,

ainsi que de l'étendue de la lésion des tissus mous (lésions vasculaires et lésions nerveuses). Des facteurs locaux, comme l'apport vasculaire et les forces mécaniques qui y seront appliquées, joueront un rôle prépondérant dans la cinétique de ces trois phases.

#### i. La phase inflammatoire

Dans les deux premiers jours après une fracture, la rupture des vaisseaux sanguins dans le périoste et le muscle ainsi que dans les tissus mous adjacents conduit à une hémorragie. Une nécrose osseuse se produit au niveau du foyer de fracture en raison de la rupture du système vasculaire de l'os et de l'interruption des vaisseaux corticaux présents dans les canaux de Volkmann et les canaux de Havers. Deux à cinq jours après, l'hémorragie forme un important caillot sanguin (**Figure 18, 1**), qui est résorbé par les macrophages. Les débris osseux dans le site fracturaire sont quant à eux éliminés par les ostéoclastes et les macrophages. La néo-vascularisation est stimulée dans un premier temps en périphérie du caillot de sang (**Figure 18, 2**). Dès la première semaine environ, la majeure partie du caillot est envahie par des vaisseaux sanguins.

Un tissu fibreux conjonctif est progressivement formé après sept jours environ. Ceci correspond à la "cicatrice" de l'os. Des spicules d'os commencent à apparaître à la périphérie du caillot. Des cellules mésenchymateuses pluripotentes de la moelle osseuse seront recrutées au niveau du site.

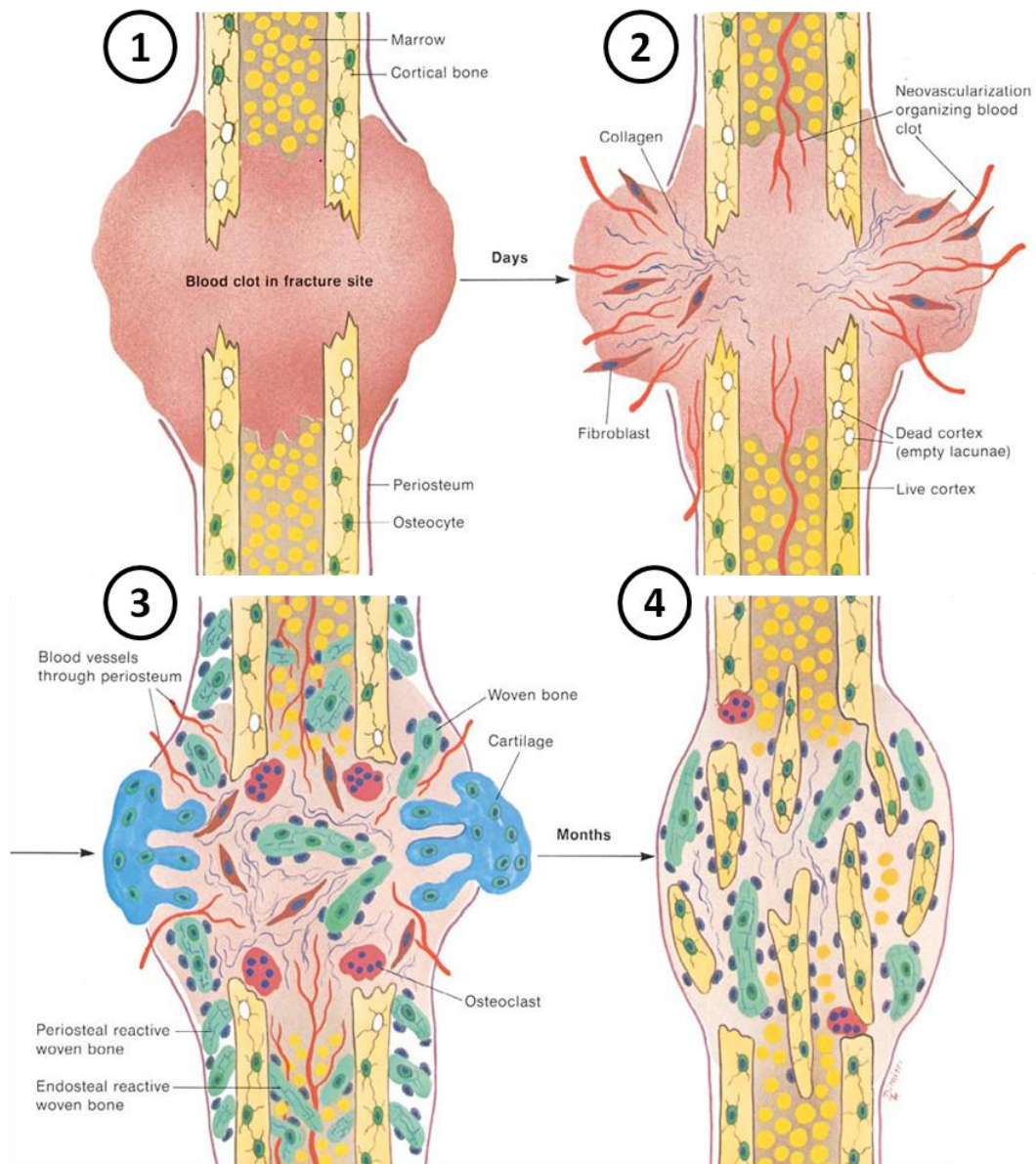
#### ii. La phase de réparation

La phase réparatrice intervient environ après la première semaine qui suit la fracture et peut durer des mois, en fonction d'un grand nombre de paramètres biochimiques et mécaniques, notamment le degré de mouvement du site fracturaire. Durant cette période, l'inflammation aiguë est dissipée et les cellules souches recrutées sur le site grâce à sa vascularisation se différencient en fibroblastes et en ostéoblastes.

D'un point de vue tissulaire, la réparation (**Figure 18, 3**) se produit de la périphérie vers le centre du foyer de fracture. Les premières étapes sont la résorption du caillot de sang, puis la vascularisation du cal, qui aura éventuellement comblé le site fracturaire.

D'un point de vue cellulaire, ces événements s'accompagnent du recrutement de nombreux ostéoclastes. Provenant des canaux de Havers, ils forment des cônes de résorption, allant du cortex vers la ligne de fracture. De nouveaux vaisseaux accompagnent la résorption, apportent des nutriments à ces cellules et permettent un apport en cellules multipotentes pour assurer le renouvellement cellulaire. Dans le même temps, le cal externe, présent à la surface de l'os et formé à partir du périoste, continue à croître vers le site de la fracture. Un cal interne se forme simultanément dans la cavité médullaire et se développe vers l'extérieur du site de fracture. Les cônes de résorption atteignent le foyer de fracture et les extrémités de l'os fracturé.

De nouveaux vaisseaux sanguins envahissent le cartilage calcifié, après quoi la séquence endochondrale reproduit la formation osseuse au niveau de la plaque de croissance.



**Figure 18. Chronologie de la cicatrisation d'une fracture osseuse. D'après (32).**

(1) : Formation d'un caillot sanguin. (2) : Phase inflammatoire associée à une néovascularisation. (3) : Phase de réparation et formation du cartilage. (4) : Phase de remodelage avec formation de nouveaux tissus osseux.

### iii. La phase de remodelage

Plusieurs semaines après une fracture, la croissance interne du cal permet le « scellement » des extrémités de l'os et le remodelage intervient (**Figure 18, 4**). Dans cette phase, l'os est réorganisé de sorte que le cortex d'origine est restauré. Le tissu régénéré peut parfois apparaître comme une structure remodelée et minéralisée permettant de conclure la réparation de la fracture. Néanmoins, le remodelage tissulaire peut se prolonger pendant plusieurs mois au-delà de la réparation du site. A titre d'exemple, le cal observé dans le cas

d'une fracture d'une côte peut rester tout au long de la vie, car les mouvements d'inspiration et d'expiration au niveau de la cage thoracique engendrent des contraintes de cisaillement au niveau vasculaire et préservent l'étendue du cal cartilagineux.

### **C. Les acteurs de la réparation du tissu osseux**

Les mécanismes de réparation osseuse sont sous le contrôle de facteurs exogènes ou endogènes, de nature cellulaire, biochimique et mécanique. Ces différents signaux et stimuli sont à l'origine d'une modulation des activités métaboliques des cellules osseuses et des cellules environnantes telles que les cellules endothéliales. Ceci a une conséquence directe sur la cinétique de la néoformation osseuse, sur la vascularisation du tissu osseux, son remodelage et *in fine* sur les propriétés mécaniques de l'os reconstruit.

#### **i. Acteurs cellulaires**

Les principaux acteurs cellulaires de la réparation osseuse, qu'il s'agisse des cellules de type ostéoblastique ou ostéocalcique, ont été décrits dans le paragraphe I, F.

#### **ii. Acteurs biochimiques**

Parmi les acteurs biochimiques, la production de cytokines inflammatoires joue un rôle prépondérant dans le recrutement de différents types cellulaires nécessaires à la régénération tissulaire. Les principaux facteurs sont le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 (IL-1) et l'interleukine-6 (IL-6), ainsi que les métalloprotéases (MMPs) produites par les monocytes, les macrophages ou encore les cellules synoviales (33). Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 stimulent l'activité des ostéoclastes et des chondrocytes, qui peuvent en échange libérer des MMPs matricielles. Elles détruisent et résorbent le tissu cartilagineux et participent ainsi au remodelage tissulaire.

#### **iii. Acteurs mécaniques**

Les contraintes appliquées à l'os sont de différentes natures, il s'agit de forces de compression, d'étirement ou encore des contraintes de cisaillement engendrées par les mouvements de fluides déplacés lors de la déformation du tissu osseux.

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 ou le type de contrainte existant au niveau des sites fracturaires. 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 du site. Inversement, la réparation membranaire est privilégiée lorsque les segments osseux sont stabilisés. 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 tissu fibro-cartilagineux peu résistant et peu évolutif en terme de spécificités tissulaires. L'instabilité et l'incompétence mécanique conduisent très rapidement à 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.

Cependant, des contraintes mécaniques modérées peuvent être bénéfiques et être utilisées comme traitement « non pharmacologique » utilisé par les chirurgiens orthopédiques afin de stimuler la réparation tissulaire. Ce procédé, appelé « dynamisation », est largement utilisé lors du processus d'allongement osseux, appelé distraction ostéogénique, qui est destiné à réparer ou à allonger les os longs.

La charge mécanique appliquée est également importante pour les différentes étapes du remodelage osseux. Une immobilisation prolongée peut entraîner une activation de la résorption osseuse. A l'opposé, l'exercice physique ou une stimulation mécanique externe sont susceptibles de promouvoir la formation osseuse (34). La charge mécanique va potentiellement augmenter la pression hydrostatique dans la moelle osseuse, ce qui aura pour effet de modifier la fonction des cellules osseuses telles que la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, la différenciation des cellules bordantes en ostéoblastes et la minéralisation de la matrice extracellulaire. La stimulation mécanique pourra également agir sur les mécanismes de l'ostéoinduction et favoriser l'activité de la BMP2 (35).

### **D. Les limites de la réparation osseuse naturelle**

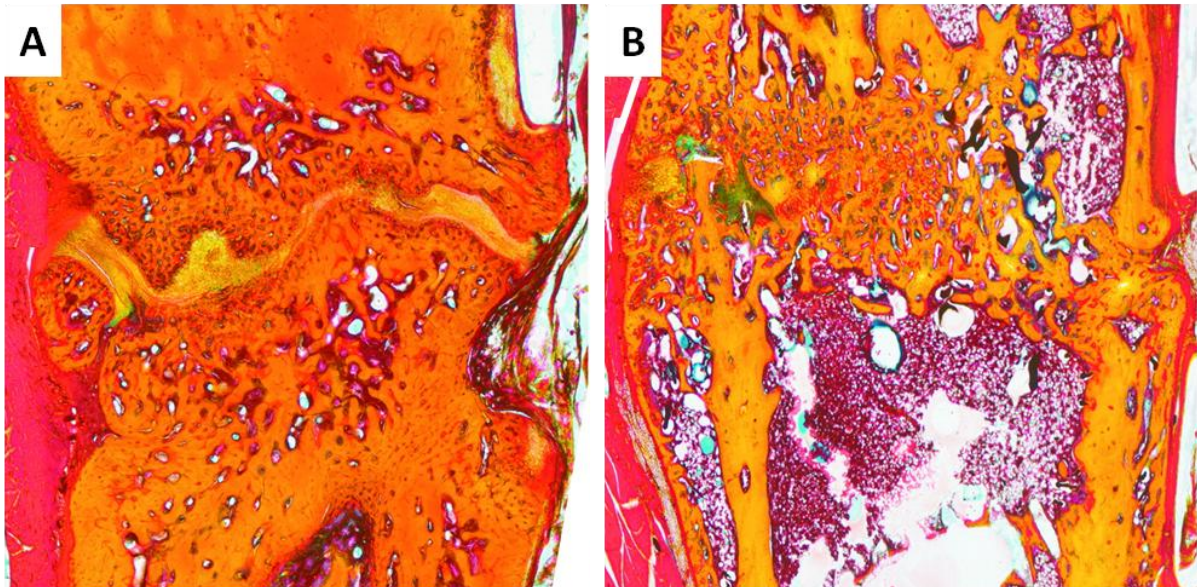
L'os est un tissu conjonctif capable de se réparer naturellement si les lésions du site fracturaire sont de petit volume. Mais dans le cas de physiopathologies osseuses ou encore lorsque le volume de la lésion osseuse est trop important, les différents mécanismes d'ossification ne peuvent aboutir à une réparation totale de la lésion du tissu.

#### **i. Réparation tissulaire et physiopathologie osseuse**

Nous décrivons dans ce paragraphe l'exemple de l'ostéoporose, pathologie osseuse la plus fréquente, observée lors du vieillissement et qui peut générer de nombreuses fractures et lésions osseuses pour lesquelles les mécanismes de réparation s'avèrent difficiles (36).

La principale cause de l'ostéoporose est la carence en stéroïde sexuel de type œstrogène qui survient chez les femmes ménopausées, bien que l'ostéoporose et les fractures ostéoporotiques s'observent également chez l'homme. Dans ces conditions, la quantité d'os âgé résorbé (due à une augmentation du nombre des ostéoclastes) dépasse la quantité d'os néoformé par les ostéoblastes, entraînant une diminution importante de la densité minérale et une fragilité du tissu.

L'ostéoporose influence donc le versant ostéogénique de la réparation osseuse, mais aussi, à moindre échelle, le versant angiogénique (37). Ainsi, les personnes souffrant d'ostéoporose auront une capacité de régénération et/ou de réparation osseuse nettement plus faible qu'une personne saine, dans les mêmes conditions de lésions osseuses (**Figure 19**).



**Figure 19. Cicatrisation d'un défaut osseux métaphysaire de taille critique. D'après (38).**

Coloration d'une coupe histologique au Movat Pentachrome, (A) chez une rate normale et (B) chez une rate rendue ostéoporotique.

## ii. Les pertes de grand volume et l'importance de la vascularisation

Comme expliqué 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 substances osseuses de grand volume, la lésion est trop importante (résection de tumeur osseuse, grave traumatisme osseux) pour permettre une réparation naturelle. De nombreux travaux de la littérature décrivent des modèles expérimentaux dans lesquels des lésions osseuses de différentes tailles, dites de « taille critique », sont réalisées. Les principaux modèles se trouvent principalement au niveau diaphysaire. Toutes ces études s'accordent pour fixer cette distance à 1,4 fois le diamètre diaphysaire moyen de l'os considéré. Au-delà de cette échelle, le défaut de progression de la vascularisation et l'incapacité du foyer de fracture à cicatriser conduisent à une absence d'union des deux extrémités diaphysaires.

De nombreux travaux de la littérature, qu'ils soient fondamentaux ou expérimentaux, démontrent que la vascularisation joue un rôle prépondérant dans la régénération osseuse. La circulation sanguine permet un apport en nutriments et en oxygène, éléments indispensables à l'ossification. En outre, la teneur en oxygène au sein du foyer de fracture a un rôle majeur dans la cicatrisation puisqu'elle influe directement sur la différenciation des cellules souches, vers le lignage chondroblastique (précurseur chondrocytaire) d'une part si

la teneur en oxygène est basse et vers le lignage ostéoblastique d'autre part si la teneur est élevée.

Un déficit vasculaire peut être à l'origine d'un retard, voire d'une absence de cicatrisation (39). Ce problème peut provenir du traumatisme initial (lésion importante des artères nourricières ou métaphysaires) consécutif à une chimiothérapie suite à un traitement médicamenteux, ou consécutif à une radiothérapie des sites lésés après une résection osseuse.

Les sites infectieux associés aux sites de lésions osseuses peuvent moduler la réaction inflammatoire, accroître le mécanisme de résorption osseuse et induire une nécrose supplémentaire de l'os. De plus, ces mécanismes infectieux peuvent générer une instabilité ou entraîner la formation de séquestres osseux (détachement d'un fragment osseux) qui vont entretenir le phénomène inflammatoire.

### iii. Les greffes osseuses comme comblement

La greffe osseuse est définie comme un procédé chirurgical consistant à prélever un fragment d'os d'une partie du corps pour combler 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, il s'agit dans ce cas d'une autogreffe. S'il provient d'un autre individu de la même espèce, on parle d'une allogreffe et s'il est d'une espèce différente, d'une xélogreffe.

#### (1) 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 de la crête iliaque.

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 arthrodeuse (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.

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 disponibilités d'os autologues et notamment d'os spongieux sont limitées et il existe au niveau du site donneur un risque non négligeable de morbidité, de risque septique et de fractures secondaires. Enfin, cette technique n'est pas toujours utilisable chez les sujets âgés, le plus souvent des patients déminéralisés ou ostéoporotiques.

## (2) L'allogreffe et la xénogreffe

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 osseux. Le greffon provient le plus souvent de déchets chirurgicaux (principalement des têtes fémorales) ou issus de dons de tissus. Le greffon peut aussi provenir d'une espèce différente, il s'agit alors d'une 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 des contaminations virales. La sécurisation bactérienne et virale des greffons est assurée par une sélection stricte des donneurs (40), des conditions aseptiques de prélèvement et de conservation et une mise en quarantaine dans des banques de tissus à -80°C (41). 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 (42). Cependant, les protocoles de préparation des greffons peuvent affecter leurs propriétés et compromettre les mécanismes d'ostéointégration de la greffe (43, 44).

Enfin, il reste néanmoins des risques immunitaires et inflammatoires liés à l'utilisation de ces allogreffes.

## (3) La technique de Masquelet

Dans les situations où l'autogreffe n'est pas envisageable en raison des limites précédemment citées, la technique de la membrane induite, décrite par Alain-Charles Masquelet (45), prend tout son intérêt. Cette technique va permettre une reconstruction osseuse en cas de lésion osseuse massive (jusqu'à 30 cm) du membre inférieur comme du membre supérieur, ou encore dans le cas d'une chirurgie maxillo-faciale. Cette technique fait intervenir deux actes chirurgicaux. Dans un premier temps, la perte de substance osseuse est comblée par une entretoise composée d'un ciment chirurgical (méthylméthacrylate) recouvert par un lambeau musculaire.

Ce ciment génère, après deux mois ou plus, la formation d'une membrane pseudo-synoviale riche en facteurs de croissance ostéomodulateurs et pro-angiogéniques (VEGF, TGF- $\beta$  et BMP-2) (46). Le ciment est alors retiré tout en préservant l'intégrité de la membrane, appelée « membrane induite », afin de préserver l'espace intramembranaire. Dans un second temps, une greffe osseuse spongieuse autologue est insérée à l'intérieur de cette espace afin d'assurer la réparation du site.

La membrane induite protégerait l'os greffé de la résorption, améliorerait sa vascularisation et faciliterait son remodelage et son adaptation aux contraintes mécaniques (47).

L'originalité de cette technique est d'utiliser les propriétés angiogéniques et ostéogènes de cette « membrane induite » pour activer le processus de néoformation osseuse et de vascularisation. La limite de cette approche est liée aux deux actes chirurgicaux et à la reconstruction tissulaire en deux temps. De plus, elle ne permet pas à ce jour de s'affranchir du prélèvement d'os autologue, bien que certains modèles montrent l'utilisation de BMP2 injectée au sein de la « membrane induite » pour accélérer le processus de régénération osseuse.

En résumé, l'utilisation des greffes osseuses représente entre 75% et 90% des indications cliniques dans le traitement des pertes osseuses (48). Bien que l'autogreffe demeure la plus utilisée (50% des cas), elle présente des inconvénients liés à son prélèvement. 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 de substitution osseuse assurant une parfaite biosécurité pour le patient.

### **III. L'ingénierie tissulaire osseuse**

Malgré les progrès effectués au cours de ces vingt dernières années sur la compréhension et la physiologie de la régénération osseuse, la reconstitution du tissu osseux pour des pertes de substance étendues reste un défi thérapeutique. La multiplicité des procédés proposés dans la littérature témoigne de la difficulté de sélectionner une stratégie pour une problématique clinique donnée.

Si la science des biomatériaux a permis le développement d'un grand nombre de matrices ou de substituts osseux, commercialisés ou non, utilisés cliniquement ou encore à l'état expérimental, le cahier des charges de ces biomatériaux reste très complexe.

Aux côtés de ces nouvelles matrices tridimensionnelles, 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, de la biologie cellulaire, de l'ingénierie chimique et des sciences de la matière. Selon le principe d'ingénierie tissulaire, les biomatériaux pourront être associés à des composantes cellulaires et/ou biochimiques (49) placés dans un environnement mécanique pour améliorer la réparation *in situ*.

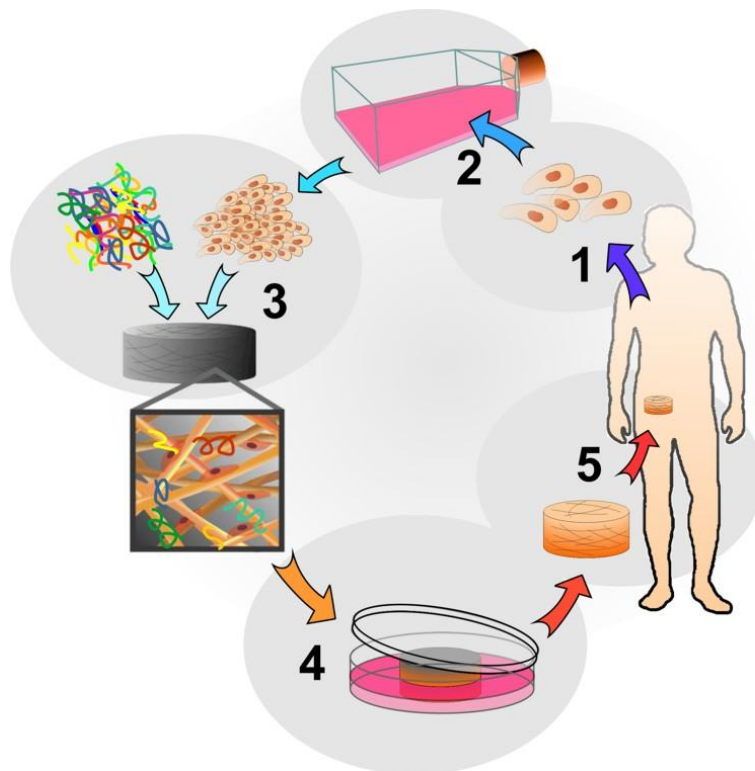
Quatre principaux acteurs sont sollicités par ces techniques d'ingénierie tissulaire : I) le biomatériau qui va servir de matrice tridimensionnelle, II) des cellules dites « réparatrices » présentant en particulier une capacité ostéogénique, III) des facteurs bioactifs de la régénération tissulaire et IV) une stimulation mécanique pour activer la fonction des cellules hébergées dans cette matrice.

Le biomatériau aura pour mission de véhiculer les cellules et leur permettre d'initier un processus de régénération.

Ce biomatériau peut être utilisé également comme un système de délivrance de cellules et de facteurs bioactifs afin de stimuler la régénération du site. Ces deux approches ne sont pas exclusives et peuvent être combinées (50).

Enfin, 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 et de favoriser un meilleur apport en oxygène et en nutriments.

La **Figure 20** résume les principales étapes de l'ingénierie tissulaire « de la boîte de culture jusqu'au lit du patient ».



**Figure 20. Principe de l'ingénierie tissulaire. D'après (51).**

(1) Isolement des cellules du patient. (2) Amplification des cellules *in vitro*. (3) Dépôt des cellules sur une matrice 3D, combinée ou non à des biomolécules « bioactives ». (4) Culture en 3D et amplification des cellules qui devraient produire au sein de cette structure 3D une matrice extracellulaire spécifique. (5) Implantation chez le patient du produit d'ingénierie tissulaire.

La construction d'un tel produit d'ingénierie tissulaire soulève de nombreuses difficultés : la première concerne le choix du matériau qui doit procurer un environnement approprié pour stimuler la régénération osseuse et présenter des propriétés mécaniques contrôlables au cours du temps.

La seconde difficulté consiste à assurer la survie cellulaire dans un environnement avasculaire et hypoxique, tel qu'il se présente en situation clinique. Enfin, la troisième difficulté est de contourner la lourdeur de la technique d'amplification cellulaire en 2D puis en 3D par des applications cliniques immédiates.

## **A. La composante matricielle**

Les biomatériaux, ou plus exactement la composante matricielle de l'ingénierie tissulaire osseuse, doivent être capables d'assurer un support structural et mécanique aux cellules, qu'il s'agisse des cellules du tissu hôte ou des cellules qui seront associées à la matrice avant son implantation. Le biomatériau doit permettre la colonisation cellulaire, la prolifération des cellules et la synthèse d'une matrice extracellulaire osseuse minéralisée. Un cahier des charges précis, prenant en compte les différentes caractéristiques biologiques du tissu osseux, doit être respecté.

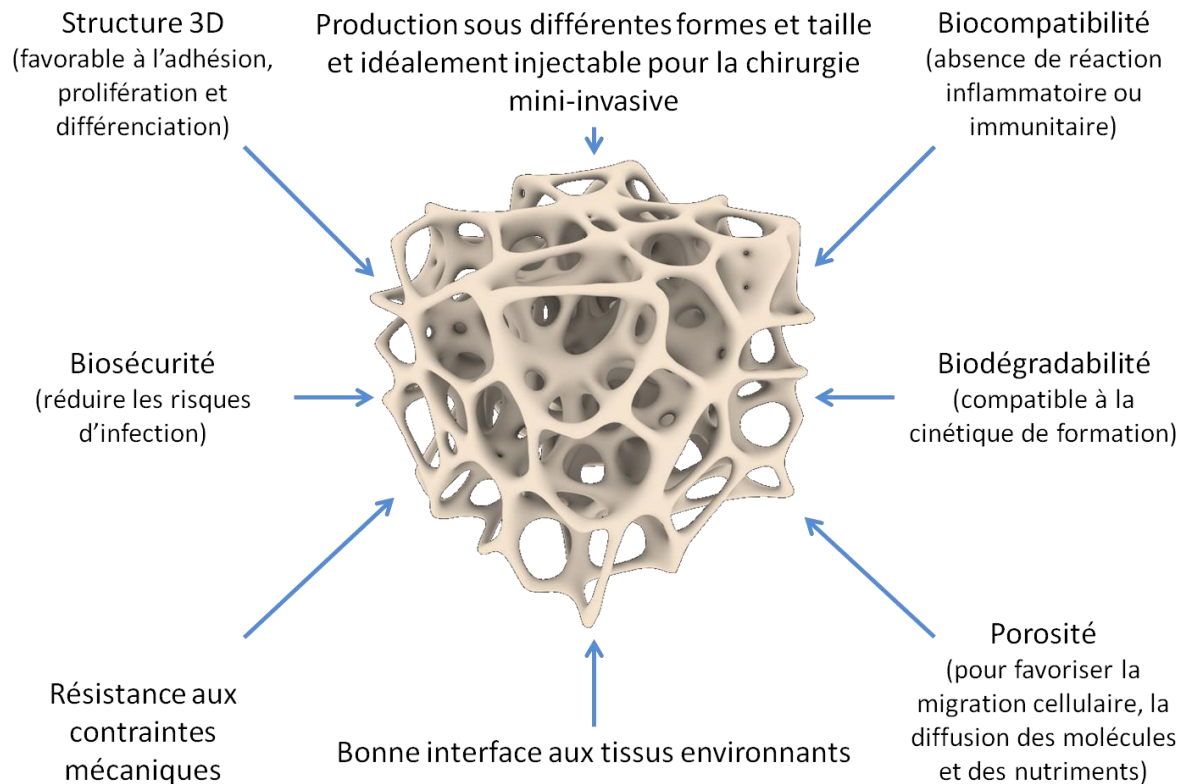
### **i. Le cahier des charges des biomatériaux pour l'ingénierie osseuse**

Les biomatériaux doivent donc répondre à un cahier des charges précis afin de correspondre au mieux aux caractéristiques physicochimiques, biologiques et mécaniques de l'os (**Figure 21**).

#### **(1) Biocompatibilité et ostéointégration**

La première règle dans le choix de la composante matricielle doit être avant tout sa biocompatibilité. Cette composante ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire importante, ni de toxicité au niveau de l'hôte. Une telle biocompatibilité entre le biomatériau et le tissu hôte doit permettre de créer une véritable interface entre le matériel et le tissu hôte. Cette bioactivité permet, d'une part, d'avoir une liaison entre le biomatériau et le tissu hôte, assurant l'ostéointégration de l'implant et, d'autre part, la mobilisation du substitut osseux par les cellules pour favoriser la néoformation osseuse. On parle alors de matériau ostéoconducteur.

L'ostéoconduction est définie par la capacité du matériau à permettre sa colonisation par les cellules de l'hôte, la formation d'un réseau vasculaire et le dépôt d'un tissu osseux. L'ostéoinduction est quant à elle la capacité active du biomatériau à recruter et à orienter des cellules indifférenciées vers le phénotype ostéoblastique et donc à favoriser la néoformation d'os dans un site ectopique. Cette ostéoinductivité peut être induite par le matériau lui-même de par ses propriétés intrinsèques chimiques, biologiques ou mécaniques (52), ou de par sa fonctionnalisation avec des facteurs ostéogéniques comme la BMP-2 (53), mais aussi de par la présence de cellules ostéoprogénitrices associées à cette composante matricielle.



**Figure 21. Cahier des charges d'un biomatériau de substitution osseuse. D'après ([www.inserm.fr](http://www.inserm.fr)).**

## (2) Porosité

Un pore peut être défini comme un espace vide à l'intérieur d'un matériau, tandis que la porosité peut être considérée comme un ensemble de pores. La taille des pores et la porosité sont des paramètres importants dans les caractéristiques physiques de la composante matricielle. Les macro-pores (supérieurs à 50  $\mu\text{m}$ ) ont une échelle susceptible d'influencer le type du tissu. Les pores de plus de 300  $\mu\text{m}$  sont par exemple généralement favorables à la croissance de la matrice osseuse et à la vascularisation des tissus néoformés. Les micro-pores (inférieurs à 50  $\mu\text{m}$ ) sont pour leur part capables d'influencer les propriétés de bioactivité de la matrice et l'attachement cellulaire. La nano-porosité se réfère à des textures de surfaces à une échelle nanométrique (1-1000 nm).

Une porosité élevée (supérieure à 80%) peut fournir un volume de pores nécessaire à l'infiltration de cellules, mais peut également à l'inverse, diminuer les propriétés mécaniques conformément à la relation de la loi de puissance (54). L'interconnectivité des pores est un facteur essentiel pour permettre la migration, la prolifération cellulaire et la colonisation totale de la matrice, de la périphérie au centre de l'implant. Il est souhaitable qu'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire présente une interconnectivité de 100% pour permettre la diffusion et les échanges en nutriments et en oxygène dans le volume entier de la matrice (55).

### (3) Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques rentrent aussi en compte dans les caractéristiques de la composante matricielle. Elles doivent être adaptées au site d'implantation dans lequel les matériaux seront destinés (56). Outre le contact spécifique avec le tissu hôte, le biomatériau doit posséder une rigidité et une élasticité adaptées au milieu dans lequel il va être implanté (57). De nombreux travaux de la littérature ont démontré que la rigidité ou l'élasticité permettent en particulier de diriger la différenciation des cellules souches vers un lignage spécifique. Pour le tissu osseux les propriétés mécaniques doivent être de l'ordre de 100 kPa (57). Par ailleurs, la production d'une matrice extracellulaire minéralisée par les cellules elles-mêmes (associées au biomatériau ou au cellules du tissu hôte) modifiera également les propriétés mécaniques du tissu néoformé.

### (4) Biodégradabilité

Idéalement, les biomatériaux implantés doivent pouvoir se dégrader pour laisser la place au tissu néoformé. Il reste toutefois important de s'assurer que les produits de dégradation des matériaux utilisés ne soient pas cytotoxiques pour le milieu environnant (58). 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. Les ostéoclastes peuvent de la même façon qu'ils dégradent le minéral osseux, résorber certains types de supports tridimensionnels comme certaines céramiques de phosphate de calcium (59).

### (5) Injectabilité

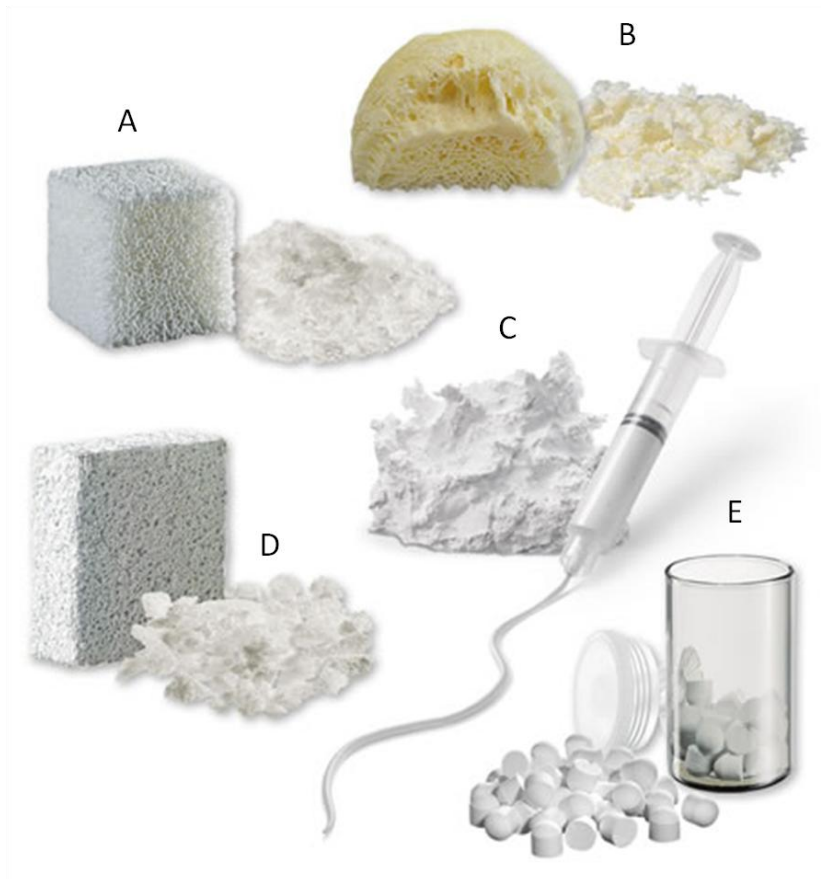
Un autre aspect important concerne la conception de la composante matricielle et sa disponibilité sous différentes formes et tailles selon le site à combler. Un autre critère est la facilité avec laquelle le biomatériau sera utilisé notamment par les chirurgiens. Dans ce contexte, un matériau injectable *in situ* peut offrir une alternative intéressante pour des sites qui présentent des irrégularités. De plus, il peut diminuer le caractère invasif de l'acte chirurgical (60).

#### ii. Les différents biomatériaux de substitution

De nombreux matériaux de substitution osseuse destinés à remplacer l'os autologue ou allogénique ont été évalués au cours des deux dernières décennies (**Figure 22**). Alors que les matériaux destinés à être implantés dans le passé étaient conçus pour être uniquement biocompatibles et mimétiques de la MEC osseuse, les matériaux actuels évoluent vers des matériaux « bioactifs » qui intègrent des molécules biologiques ou des cellules pour stimuler la régénération des tissus (61, 62). Les matériaux de substitution osseuse doivent répondre à

un cahier des charges précis comme cela a pu être précédemment présenté (ostéoinducteurs, ostéoconducteurs, biodégradables et propriétés mécaniques).

Les matériaux peuvent être classés en plusieurs familles. Les matériaux les plus couramment utilisés sont des céramiques à base de phosphate de calcium, à base de polymères naturels ou synthétiques ou encore de polymères composites (63).



**Figure 22. Les différents matériaux de comblement/substituts osseux ([www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/knochenersatzmaterial](http://www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/knochenersatzmaterial)).**

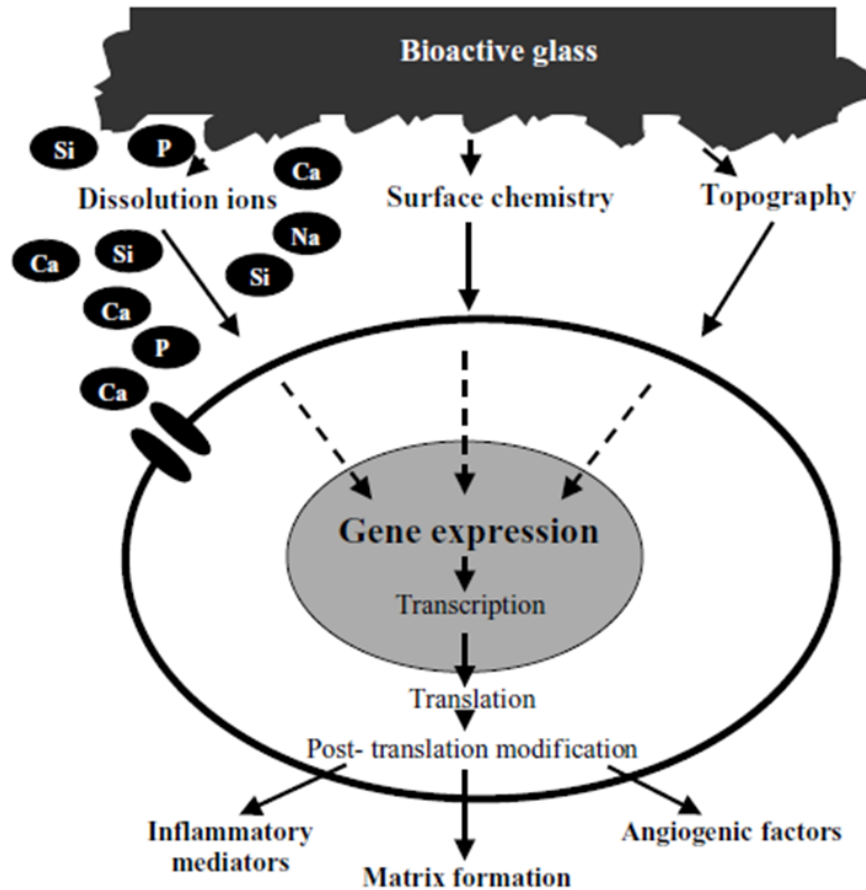
(A) Exemple de substituts osseux obtenus à partir d'os trabéculaire bovin (Cerabone®). (B) Substituts osseux obtenus à partir d'os humains (Osnatal®). (C) Ciment phosphocalcique (OsteoCem®). (D) Céramiques bioactives (PerOssal®). (E) Granules et bloc de céramiques phosphocalciques biphasées (Cerabone®).

### (1) Les matériaux à base de phosphate de calcium

De nombreux matériaux à base de phosphate de calcium, composition la plus proche de la phase minérale de l'os, sont développés et même commercialisés, pour certains. On peut citer le phosphate tricalcique (TCP), l'hydroxyapatite (HA), des céramiques phosphocalciques, des verres bioactifs et leurs combinaisons dans différentes proportions pour modifier leurs propriétés de biodégradabilité (64).

Les verres bioactifs (des verres de silice contenant du calcium et éventuellement du phosphate) peuvent rapidement produire dans un fluide biologique une couche d'HA

bioactive qui est capable de se lier à un tissu biologique. En outre, ils peuvent être adaptés pour fournir des ions tels que les siliciums (**Figure 23**) à des niveaux capables d'activer l'ostéogenèse (65, 66) des cellules du tissu aux cellules associées aux matrices, et ce vers le lignage ostéoblastique.



**Figure 23. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les verres bioactifs. D'après (65).**

Les verres bioactifs induisent l'expression des gènes par quatre mécanismes principaux : la chimie de surface, la topographie/structure de surface, le taux et le type d'ions libérés et les contraintes de cisaillement à l'interface avec l'implant (propriétés mécaniques).

Du point de vue de leur biocompatibilité, de leur ostéointégration et de leur propriété ostéoconductrice, les céramiques phosphocalciques sont des supports extrêmement intéressants. Certaines des céramiques phosphocalciques, de par leur architecture et leur micro et nano-porosités, présenteraient, en outre, un potentiel ostéoinducteur et seraient capables de régénérer des lésions de taille critique. De façon plus précise, l'équipe de Ruitter a démontré que la formation osseuse observée en site ectopique augmentait avec la microporosités de ces céramiques (67). La présence de cette microporosités pourrait augmenter la surface d'échange entre les cellules et le milieu biologique. Cette ostéoinduction serait potentiellement liée à un processus de dissolution/précipitation de la céramique. Les cristaux en contact avec les fluides biologiques seraient capables de se dissoudre, d'interagir avec des ions d'origine biologique, de précipiter et enfin de former des

cristaux apatitiques biologiques proches de ceux de l'os. Ces cristaux pourraient favoriser ainsi l'absorption de protéines, dont les BMPs, permettant ainsi d'orienter les cellules vers une différenciation ostéoblastique (68).

Au niveau cellulaire, des matrices à base de phosphate de calcium offrent un excellent environnement en favorisant l'adhérence cellulaire des ostéoprogéniteurs, leur prolifération et la synthèse d'une matrice extracellulaire minéralisée (69).

Parmi les limites de ces matériaux, nous citerons leur dégradabilité qui n'est pas toujours optimisée par rapport aux propriétés mécaniques. Par ailleurs, ces matrices ne permettent pas toujours une ostéoformation complète. Cette dernière est souvent limitée à la périphérie des implants macroporeux. La culture dynamique en bioréacteur peut néanmoins améliorer cette cinétique de formation osseuse et de vascularisation.

## (2) Les polymères

Il existe plusieurs familles de polymères. D'une part, les polymères synthétiques comme le poly(lactic acid) PLA et le poly(glycolic acid) PGA. Mais il y a également les polymères d'origine naturelle, synthétisés par des organismes vivants, tels que les polysaccharides de type pullulane, alginate, chitosane (70-72) ou encore des protéines telles que le collagène, la soie ou la fibrine (73-75).

Les polymères sont des chaînes de macromolécules, ils sont aisément « façonnables » de par leur composition chimique et leur structure (76). Ils peuvent être le support de nombreuses modifications pour adapter et moduler leurs propriétés (77). De manière générale, les polymères sont biocompatibles. Certains d'entre eux permettent aux cellules de proliférer et de se différencier sans engendrer, pour la plupart (78), de réactions cytotoxiques.

Leur caractère biodégradable constitue un atout important en ingénierie tissulaire osseuse (76).

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.

Les polymères sont utilisés également comme des systèmes de délivrance de molécules bioactives, à l'image du PLA et du PLGA pour la délivrance de BMPs (79).

De nombreux produits à base de collagène de type I sont commercialisés à ce jour (Collapatil®, Collagraft®, Biostite®). Ils permettent la colonisation, la prolifération et la différenciation des cellules du lignage ostéoblastique. Certains de ces polymères sont utilisés en clinique et autorisés par l'US Food and Drug Administration (FDA).

De nombreuses équipes se sont également intéressées au chitosane comme système implantable ou injectable. Il s'agit de délivrer des facteurs de croissance (80) ou des

glucocorticoïdes (81) pour stimuler l'ostéogenèse. Cependant, de nombreuses études expérimentales soulèvent le caractère inflammatoire de ce type de polymère.

Parmi les autres types de polymères à base de polysaccharides, l'alginate, isolé à partir d'algues comme les *Lessonia flavicans*, *Desmarestia ligulata* ou *Desmarestia distans* (82), est généralement utilisé comme système d'encapsulation de cellules et/ou de molécules dans un hydrogel (83). Des travaux de la littérature (84) montrent que les cellules mésenchymateuses issus de la moelle osseuse peuvent former *in vitro* et *in vivo* une matrice extracellulaire minéralisée au sein de billes d'alginate d'environ 300 µm. De la même façon, ces structures à base d'alginate peuvent être modifiées avec des peptides d'adhésion, comme les séquences RGD, pour améliorer les propriétés d'adhésion cellulaire.

Parmi les polysaccharides, on peut citer le pullulane. Il est neutre et non immunogène et est 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 (85). Ce type de matrice offre une chimie et une porosité modulables, et d'intéressantes perspectives d'application pour l'ingénierie tissulaire osseuse (86) qui seront exploitées dans ce travail de thèse.

Par ailleurs, les polymères biologiques apparaissent également comme des candidats intéressants pour les techniques de biofabrication et de prototypage rapide (87) afin de générer une gamme de biomatériaux tridimensionnels dont les caractéristiques comme la porosité peuvent être modifiables. Le contrôle à la fois de la forme du matériau et de son volume par sa microarchitecture tridimensionnelle permet des progrès dans la fabrication de solides sous forme libre (FSFL). La FSFL comprend un certain nombre de procédés de fabrication couche par couche qui permettent la construction assistée par ordinateur de matériaux tridimensionnels anatomiquement complexes (88).

Le criblage à haut débit pour évaluer directement l'effet de nouveaux polymères sur le phénotype cellulaire est également en cours (89). Les hydrogels, tels que le polyéthylène glycol, sont aussi populaires car ils peuvent souvent être implantés d'une manière peu invasive et être polymérisés *in situ* (par exemple par photoréticulation). Leurs propriétés viscoélastiques semblent particulièrement appropriées pour la régénération du cartilage, bien que de nombreuses applications dans le domaine de l'ingénierie osseuse aient également été explorées (90).

De manière générale, les hydrogels présentent l'avantage d'une grande versatilité chimique. Ils permettent également d'encapsuler et de délivrer des cellules (91). Leur caractère biodégradable constitue également un atout important en ingénierie tissulaire osseuse (76). Si les polymères offrent d'importantes alternatives en termes de modifications chimiques, de fonctionnalisation par des molécules bioactives et/ou des séquences peptidiques, les principales limites de ces matrices sont leur manque de résistance pour supporter certains types de contraintes mécaniques résidant dans le tissu osseux.

### (3) Les matériaux composites

A ce jour, de nouvelles matrices composites, associant polymères et phosphates de calcium, sont développées (92) afin de mimer au plus près la structure de l'os, constituée de composants organiques et inorganiques. Ces composites inorganiques-organiques utilisent le potentiel chimique des polymères et les propriétés mécaniques d'une phase minérale pour générer des matériaux mieux adaptés à l'ingénierie osseuse. Il est reconnu que le composant minéral de taille nanométrique est susceptible d'être plus bioactif que des composants de phosphate de calcium de taille micrométrique. Des systèmes nanocomposites d'HA-collagène en ingénierie tissulaire, par exemple, apparaissent comme très prometteurs (93) pour la régénération des lésions osseuses. L'un des critères essentiels de cette association entre polymère et nanoparticules concerne la dispersion de la phase minérale au sein du polymère.

Recréer un support 3D capable de mimer à la fois l'échelle macrométrique, l'échelle micrométrique et l'échelle nanométrique de l'os reste encore un défi à relever. De plus, les propriétés mécaniques des composites actuels sont encore loin de celles du tissu osseux.

### B. La composante cellulaire

Les cellules « réparatrices » utilisées comme composante cellulaire en ingénierie du tissu osseux (**Figure 24**) sont majoritairement représentées par les cellules souches adultes, en particulier celles isolées à partir de différents tissus : moelle osseuse, sang de cordon, sang adulte, cordon ombilical, périoste, muscle, tissu adipeux ou encore membrane synoviale. Cependant, au vu de la diversité des études précliniques en ingénierie tissulaire, l'origine des cellules les mieux adaptées est une source de débats au sein de la communauté scientifique: cellules autologues ou allogéniques, cellules souches adultes ou embryonnaires ou encore iPSCs.

#### i. Les cellules souches embryonnaires

Au cours des dernières années, une attention accrue a été portée sur l'utilisation des cellules souches embryonnaire (ESCs pour Embryonic Stem Cells) en ingénierie tissulaire et en thérapie cellulaire. Les raisons de cet intérêt grandissant sont leur capacité d'amplification à grande échelle et leur capacité de pluripotence (94).

Sur le plan expérimental, de nombreux travaux de la littérature démontrent la différenciation des cellules ESCs en cellules osseuses. La plupart de ces études décrivent des implantations ectopiques de cellules (sous-cutané) et leurs comportements *in vivo* (95). D'autres études précliniques ont été réalisées dans le cas de fractures osseuses (96) sur des modèles ostéoporotiques (97). Cependant, la qualité du tissu osseux formé semble être encore insuffisante en termes d'homogénéité et de stabilité.

Par ailleurs, d'un point de vue clinique, ces cellules souches présentent encore des risques non négligeables d'induction de tumeurs. Enfin, bien que les données précliniques précédemment citées donnent des résultats très prometteurs (98), les lois éthiques en France limitent encore l'utilisation des ESCs humaines.

## ii. Les cellules souches adultes

### (1) Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont depuis longtemps reconnues pour leur potentiel en ingénierie osseuse. Elles présentent la capacité de se différencier en cellules ostéoprogénitrices et leur intérêt dans des modèles expérimentaux a été largement démontré.

Les MSCs ont été caractérisées par l'expression de différents marqueurs ou « cluster de différenciation » (CD). Elles sont négatives pour CD34, CD45, CD14, CD11a, CD19 et HLA-DR et positives pour STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD146, CD271 et CD44 (99).

Les MSCs peuvent être isolées à partir d'un grand nombre de tissus adultes, y compris la moelle osseuse, le sang périphérique, le sang du cordon ombilical, la membrane synoviale, les dents de lait, la pulpe dentaire, le liquide amniotique, le tissu adipeux, la peau, le cœur, les reins ou encore le foie. Pour chacun de ces tissus ou organes, des protocoles d'isolement ont été établis. Ils reposent en partie sur la capacité des cellules à adhérer à un support plastique dans une culture tissulaire. En outre, leur potentiel de prolifération élevé, combiné à leur capacité à résister aux conditions de congélation, permet de disposer de banques cellulaires et de faciliter leur amplification *in vitro* afin d'obtenir un nombre de cellules suffisant pour une utilisation en clinique (100).

Outre les sources de tissus adultes, les MSCs peuvent être isolées à partir des cellules souches embryonnaires, mais aussi des cellules dites iPSCs (101). Ces cellules souches mésenchymateuses dérivées des cellules embryonnaires et les iPSCs présentent les mêmes caractéristiques multipotentes *in vitro* et *in vivo* que les cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissus adultes. Dans tous les cas, les MSCs d'origine embryonnaire ou issues des iPSCs doivent encore être évaluées pour écarter la possibilité de la formation de tératome avant leur utilisation pour des applications cliniques.

D'un point de vue expérimental, l'association des cellules souches mésenchymateuses dans des biomatériaux destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse est une stratégie très largement décrite car elle stimule la formation osseuse et l'ostéointégration des produits d'ingénierie tissulaire au sein de ces lésions osseuses. Les MSCs vont aussi permettre de renforcer l'ostéoinductivité du biomatériau par l'intermédiaire de la libération de facteurs de croissance ostéogéniques. En outre, il a été démontré que l'orientation préalable des MSCs

vers le lignage ostéoblastique avant leur implantation permet d'accélérer la cinétique de réparation des lésions osseuses.

Enfin, des études expérimentales, aussi bien sur le petit que sur le gros animal, prouvent l'efficacité des matrices colonisées par les cellules mésenchymateuses pour promouvoir la résorption osseuse dans divers scénarios, y compris en cas de défauts de taille critique au niveau des os longs, de malformations cranio-maxillo-faciales et de fusions vertébrales (102).

| Cell type                              | Source                                                    | Clinical use                                                                                                                                       |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Embryonic stem cells (ESCs)            | Embryonic bodies (EBs)                                    | N/D                                                                                                                                                |
| Induced Pluripotent stem cells (iPSCs) | Any cell type that could be induced to become osteoblasts | N/D                                                                                                                                                |
| Adult stem cells                       | Bone marrow                                               | Segmental defects of long bones<br>Large bone diaphysis defects<br>Maxillary sinus augmentation<br>Posterior spinal fusion<br>Bone tumor resection |
|                                        | Adipose tissue                                            | Large calvarial defect<br>Osteonecrotic femoral heads<br>Hip osteonecrosis                                                                         |
|                                        | Peripheral blood                                          | N/D                                                                                                                                                |
|                                        | Teeth                                                     | N/D                                                                                                                                                |
|                                        | Cord blood                                                | N/D                                                                                                                                                |
|                                        | Amniotic fluid                                            | N/D                                                                                                                                                |
|                                        | Stem cells derived from ESCs and iPSCs                    | N/D                                                                                                                                                |

**Figure 24. Les différents types de cellules utilisés en l'ingénierie tissulaire osseuse : leur source et leur utilisation clinique. D'après (103).**

Il existe trois grands types cellulaires utilisés en ingénierie du tissu osseux : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites et les cellules souches adultes. Seules ces dernières sont utilisées pour des applications en clinique. (N/D) : Non déterminé.

Bien que les MSCs semblent représenter une bonne alternative pour l'ingénierie du tissu osseux, plusieurs limites ont été identifiées pour leur utilisation en clinique : I) la nécessité d'intervenir deux fois chirurgicalement, une fois pour le prélèvement des cellules et une autre fois pour leur implantation ; II) la diminution des capacités prolifératives et de différenciation des cellules corrélées avec l'augmentation de l'âge et de la pathologie osseuse du patient ; III) la quantité de cellules disponibles dans un prélèvement et surtout ; IV) le temps d'expansion cellulaire afin de constituer une quantité de cellules suffisante pour une utilisation en clinique.

Plusieurs études ont tout d'abord montré que les MSCs présentaient un nombre de doublements de la population limité avant d'entrer dans une phase de sénescence cellulaire

(104). En outre, le potentiel de différenciation ostéogénique diminue significativement avec l'âge du donneur ainsi que dans un contexte physiopathologique (ostéoporose, etc.).

Environ 4 à 6 semaines sont nécessaires pour permettre l'amplification avant d'envisager un traitement thérapeutique pour l'ingénierie tissulaire. De plus, la culture en deux dimensions sur du long terme peut conduire à une sélection cellulaire, voire au développement de caryotypes anormaux et à la transformation en lignée cellulaire maligne.

Ces limites expliquent en partie le nombre réduit d'essais cliniques, et le nombre limité de patients pour chaque essai (105-107).

Une alternative à ces limites serait de disposer d'une banque de cellules MSCs humaines allogéniques "prêtes à l'emploi". Bien que cela puisse sembler difficilement envisageable sans nécessiter l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs, il a été montré que les MSCs présentaient un phénotype peu immunogène (108). De plus, les MSCs ont été identifiées comme étant immunosuppressives. Plus précisément, elles inhibent la prolifération des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules dendritiques ainsi que des cellules NK. Ces données renforcent considérablement l'utilisation thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses dans les techniques d'ingénierie tissulaire.

Le paragraphe suivant présentera l'intérêt d'utiliser le tissu adipeux, le sang périphérique ou encore le tissu dentaire pour isoler et amplifier des cellules souches mésenchymateuses et associer à ces cellules une composante vasculaire.

## (2) Les cellules souches dérivées du tissu adipeux

Les cellules souches du tissu adipeux (ADSCs) représentent une source facilement accessible, largement disponible et abondante de cellules autologues. Les ADSCs ont un potentiel de différenciation « multilignage » (e.g. ostéogénique, chondrogénique, adipogénique, neurale, cardiomyocytaire et endothéliale). Les prélèvements abritent une quantité relativement élevée d'ADSCs (1 % à 5 % des cellules isolées), en comparaison des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (0,001 % à 0,1 % des cellules isolées) (109).

La quantité d'ADSCs isolées est influencée par la procédure de prélèvement du tissu, ainsi que par le site de prélèvement (e.g. le bras, la cuisse, l'abdomen, le sein). Les ADSCs partagent également l'expression d'antigènes de surface communs, incluant le CD44, CD90, CD13, CD29, CD73, CD166 et CD105 (110). Les protocoles d'isolement des ADSCs reposent sur l'utilisation de gradients de densité générés par centrifugation des prélèvements préalablement digérés par une solution de collagénases (allant de 100 ml à plusieurs litres). L'isolement de ces cellules se base sur leur capacité d'adhérence à des supports plastiques (**Figure 25**).



**Figure 25. Procédure d'extraction des ADSCs à partir du tissu adipeux. D'après (111).**

Quelques travaux dans la littérature démontrent l'intérêt de la fraction vasculaire stromale (SVF). Cette fraction, très hétérogène, contient de nombreux types cellulaires incluant des ADSCs, des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques. Des travaux récents démontrent l'intérêt de la fraction SVF totale, qui présente des qualités ostéogéniques et endothéliales attractives (112, 113) pour l'ingénierie osseuse et vasculaire.

Le potentiel ostéogénique des ADSCs a été démontré non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*. La différenciation ostéogénique *in vitro* peut être réalisée par l'addition de facteurs susceptibles de favoriser la minéralisation de la matrice extracellulaire, tels que le  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ GP), l'acide ascorbique (AA), la dexaméthasone (Dex) ou encore la BMP-2 (114). La performance ostéogénique des ADSCs a été également évaluée *in vivo* en site orthotopique. Une amélioration de la régénération de l'os a été démontrée avec l'implantation d'ADSCs (115).

L'intérêt majeur des ADSCs concerne leur application directe en clinique sans amplification préalable en 2D et 3D. Dans cette approche, le prélèvement de tissu, l'isolement des cellules, leur ensemencement dans une matrice et l'implantation ultérieure peuvent se produire en quelques heures, sans culture *ex vivo* des cellules, directement dans le bloc opératoire. Muller et ses collaborateurs ont apporté la preuve de cette approche préopératoire en démontrant la formation d'un tissu osseux vascularisé après 8 semaines d'implantation en site ectopique chez la souris Nude. Dans cette étude, le produit a été construit dans les toutes premières heures, suite au prélèvement du tissu adipeux (116). Ces résultats sont très prometteurs pour les applications en ingénierie du tissu osseux dans

lequel les ADSCs pourraient être utilisées directement au bloc opératoire au cours de l'intervention chirurgicale.

### (3) Les cellules souches dérivées du sang

Des études récentes ont identifié le sang périphérique comme une source d'isolement des MSCs. Chong et ses collaborateurs (117) ont suggéré qu'environ 1 million de cellules pouvaient être obtenues après 2 semaines d'amplification en 2D à partir de 2 mL de sang périphérique. Ces MSCs présenteraient le même profil de différenciation que les MSCs isolées à partir de moelle osseuse (i.e. tri-lignage ; chondrogénique, ostéogénique, et adipogénique) (117).

Une autre population cellulaire présente un intérêt et peut être isolée à partir du sang périphérique : les progéniteurs endothéliaux (EPCs). Ces derniers ont démontré *in vitro* et *in vivo* leur potentiel angiogénique de même que leur efficacité pour promouvoir la néo-vascularisation des lésions osseuses après leur association dans un biomatériau (118).

Le sang de cordon ombilical représente également une autre source de cellules pour l'ingénierie tissulaire, mais avec une disponibilité beaucoup plus réduite dans les banques de tissus.

### (4) Les cellules souches dérivées du tissu dentaire

Des résultats intéressants obtenus depuis une dizaine d'années ont mis en évidence l'intérêt des cellules souches résidant dans le tissu de la pulpe dentaire comme une source de cellules pour l'ingénierie du tissu osseux (119). Les cellules souches dérivées de la pulpe dentaire (DPDSCs) peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires, y compris les odontoblastes, les chondrocytes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules neurales (120). Les DPDSCs sont généralement isolées à partir de la pulpe de tissus traitée avec une solution de collagénase, processus suivi d'une sélection par une méthode d'isolement immunomagnétique en utilisant des anticorps anti-STRO-1 et un tri cellulaire.

Les DPDSCs ont une capacité proliférative très élevée et affichent le même profil phénotypique que les cellules souches mésenchymateuses (121). La différenciation ostéogénique de DPDSCs a été démontrée *in vitro* et la transplantation *in vivo* de ces DPDSCs dans des rats Nude associées ou non à des matrice 3D permettent de générer un tissu osseux lamellaire (122).

A titre d'exemple, la formation d'un tissu fortement minéralisé a été rapportée dans une étude expérimentale associant des DPDSCs de lapin dans une matrice d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) implantée en sous-cutané (123).

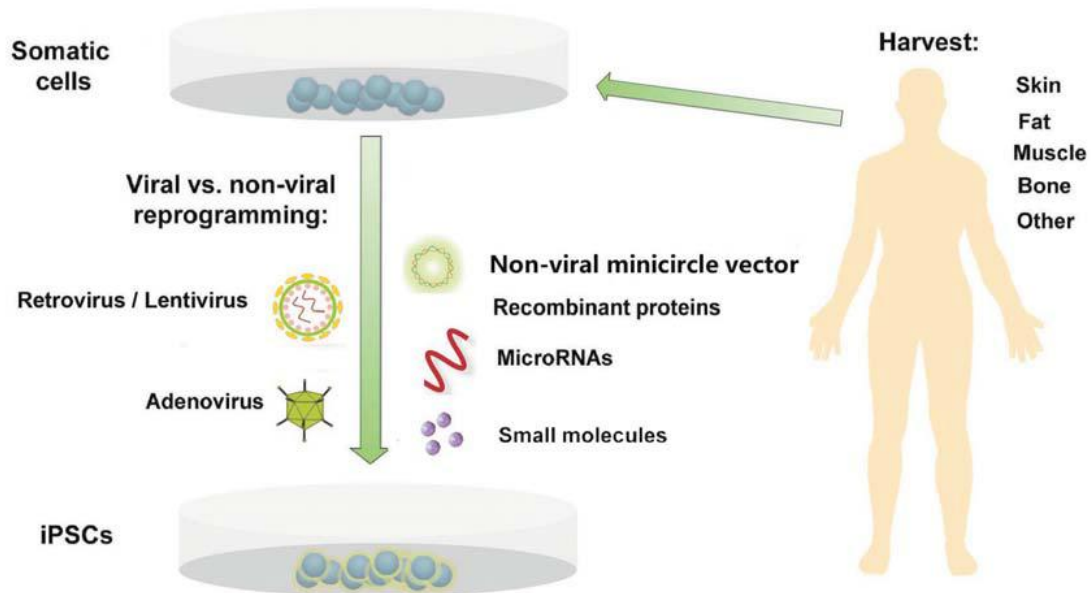
Les cellules souches de la papille apicale (SCAPs), issues de l'apex de la racine des dents permanentes, représentent également une population de cellules souches/progénitrices

mésenchymateuses. Ces cellules souches post-natales peuvent générer *in vitro* une matrice minéralisée dans un milieu ostéo/odontogénique mais aussi une différenciation adipogénique (124). *In vivo*, ces cellules conduisent à la formation d'un tissu minéralisé proche de la structure de la dentine (125).

### iii. Les iPSCs

Au cours des dernières années, la capacité à générer des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) est l'une des avancées majeures dans le domaine des cellules souches. Des cellules somatiques, comme des fibroblastes humains, peuvent être reprogrammées (**Figure 26**) et exprimer les caractéristiques des cellules embryonnaires capables de se différencier vers les trois feuillets embryonnaires (l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme). Ces cellules pluripotentes peuvent offrir d'importantes perspectives thérapeutiques au service de la médecine régénératrice (126).

Les cellules souches pluripotentes sont donc des candidats prometteurs pour la construction de tissu et notamment de tissu osseux. Ces cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSCs) sont reprogrammées en utilisant des vecteurs non-viraux (127) ou viraux comme détaillé dans la Figure 26. Les protocoles de culture développés pour les ESCs humaines ont été adaptés à la culture des iPSCs humaines. Celles-ci présentent une morphologie, une signature moléculaire et un potentiel de différenciation très similaire aux ESCs (128).



**Figure 26. Le processus d'obtention des iPSCs à partir de cellules somatiques. D'après (129).**

Des efficacités variables dans la création de lignées spécifiques ont néanmoins été décrites (130). Quelques exemples de la littérature témoignent de l'obtention de cellules ostéogéniques à partir d'IPS humaines (131) ainsi qu'une validation *in vivo* de leur potentiel ostéogénique.

## C. Les facteurs biochimiques et mécaniques

La régénération des tissus est également le résultat de l'activité de nombreux facteurs de signalisation ou de croissance. Ces facteurs régulent le phénotype cellulaire, la migration, la formation des tissus ainsi que sa morphogenèse. De nombreux facteurs de croissance et de molécules de signalisation sont impliqués au cours du développement de l'os, ainsi que dans les processus de réparation de l'os. Ces facteurs et leur mode d'action vont être décrits dans les paragraphes suivants.

### i. Facteurs ostéogéniques

Les « Bone Morphogenetic Proteins » (BMPs), produites par les cellules souches, agissent de manière autocrine et paracrine et sont capables pour certaines d'entre elles de stimuler la différenciation des cellules souches vers le lignage ostéo-articulaire (**Figure 27**) (132). La famille des BMPs se compose de plus de 15 membres identifiés. L'analyse phylogénétique a révélé que les BMP-5, BMP-6, BMP-7 et BMP-8 forment un groupe différent de celui de la BMP-2 et de la BMP-4. La BMP-2 et la BMP-7 ont été étudiées de manière plus poussée, elles sont produites sous forme de protéines humaines recombinantes (rhBMP-2 et rhBMP-7) et sont les seules autorisées par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour une utilisation clinique spécifique (133). L'administration combinée de BMP-2 et BMP-7 semble plus efficace que l'utilisation d'une seule protéine pour activer la réparation de lésions osseuses de grands volumes.

Les effets de la BMP-2, de la BMP-4 et de la BMP-6 ont été évalués respectivement pour activer la différenciation de lignées cellulaires dérivées de la moelle osseuse. Des effets différents ont été obtenus en fonction du type de cellule exposée à ces protéines (134). Une étude récente, réalisée sur des cellules stromales humaines, montre que la BMP-6 semble être la plus active sur la différenciation des ostéoblastes, comparée à la BMP-2 et la BMP-4.

| BMP                                | Main physiological roles                                                        |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Bone morphogenetic proteins</i> |                                                                                 |
| <u>BMP-2</u>                       | Cartilage and bone morphogenesis/heart formation                                |
| BMP-3                              | Negative regulator of bone morphogenesis                                        |
| BMP-3b                             | Negative regulator of bone morphogenesis                                        |
| <u>BMP-4</u>                       | Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation                               |
| BMP-5                              | Limb development/bone morphogenesis                                             |
| <u>BMP-6</u>                       | Hypertrophy of cartilage/bone morphogenesis/oestrogen mediation                 |
| <u>BMP-7</u>                       | Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation                               |
| BMP-8                              | Bone morphogenesis/spermatogenesis                                              |
| <u>BMP-9</u>                       | Bone morphogenesis/development of cholinergic neurons/glucose metabolism        |
| BMP-11                             | Axial skeleton patterning/eye development/pancreas development/kidney formation |

BMPs known to induce complete bone morphogenesis are underlined.

**Figure 27. La famille des BMPs et leur fonction au niveau tissulaire. D'après (135).**

La BMP-2 et la BMP-4 d'une part, la BMP-6 et la BMP-7 d'autre part utilisent différents récepteurs présents sur les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse humaine et induisent des mécanismes différents pour activer la différenciation ostéoblastique primaire des MSCs humaines (136).

L'association de la BMP-2 et/ou de la BMP-7 avec des supports tridimensionnels fait l'objet d'une abondante littérature pour l'ingénierie osseuse. Les différents travaux décrits dans la littérature depuis plus de 15 ans soulèvent de nombreuses limites à l'utilisation de ces BMPs pour des applications cliniques :

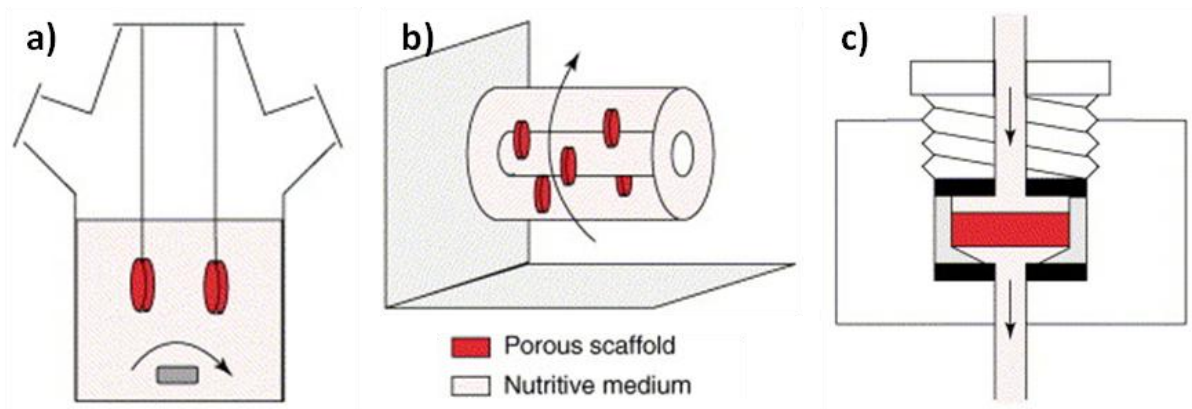
- coût très élevé des protéines recombinantes,
- concentration élevée des BMPs utilisées dans la construction des produits d'ingénierie tissulaire et risque de transformation cellulaire,
- absence de contrôle de délivrance de ces facteurs ostéoinducteurs.

## ii. La culture dynamique en bioréacteurs

La culture dynamique des produits d'ingénierie tissulaire est apparue très rapidement fondamentale pour favoriser la survie cellulaire, mais aussi pour favoriser la prolifération et la production *in situ* d'une matrice extracellulaire minéralisée et vascularisée (137). De façon

plus précise, la culture dans des bioréacteurs permet d'améliorer (**Figure 28**) l'efficacité d'ensemencement cellulaire, d'obtenir une stimulation mécanique accrue des cellules ostéogéniques (et vasculaires), d'activer des mécanismes de mécanotransduction et permet également de surmonter la limite de l'échange par diffusion des nutriments et de l'oxygène, limites généralement observées en culture statique.

Les bioréacteurs peuvent permettre la fabrication de tissus automatisés et standardisés avec des coûts de production réduits. Ils ont permis le contrôle des facteurs environnementaux spécifiques tels que le pH, la température, l'élimination des déchets et l'amplitude des contraintes appliquées.



**Figure 28. Les principaux bioréacteurs utilisés en ingénierie osseuse. D'après (138).**

(a) bioréacteur à agitation (les flèches montrent le mouvement de l'agitateur magnétique), (b) bioréacteur à rotation (la flèche indique le mouvement de la cuve), (c) bioréacteur à perfusion (la flèche indique l'écoulement du milieu).

Plusieurs types de bioréacteurs ont été développés, notamment des bioréacteurs à rotation, des bioréacteurs à perfusion ou encore des bioréacteurs permettant des étirements de support et des systèmes de compression.

### (1) Bioréacteurs à agitation ou rotatif

Les bioréacteurs dits à « agitation » (**Figure 28, a**) sont les systèmes les plus simples et les moins coûteux. Dans ce système, les forces de convection sont générées par un agitateur, ce qui permet l'écoulement des fluides autour des matériaux cellularisés positionnés dans le bioréacteur. Il apparaît que cette culture dynamique module la prolifération des cellules ostéogéniques, l'expression génique des marqueurs ostéogéniques et la minéralisation de la MEC (139). Cependant, l'utilisation d'un système de bioréacteur à rotation génère une distribution cellulaire principalement en périphérie du matériau.

En revanche, le système rotatif (**Figure 28, b**) permet de produire un écoulement laminaire. Des études utilisant un bioréacteur à rotation conçu par l'agence américaine de l'aéronautique et de l'espace (NASA) ont montré des performances améliorées pour stimuler la différenciation ostéoblastique (140). Mais l'une des limites principales de ce type de

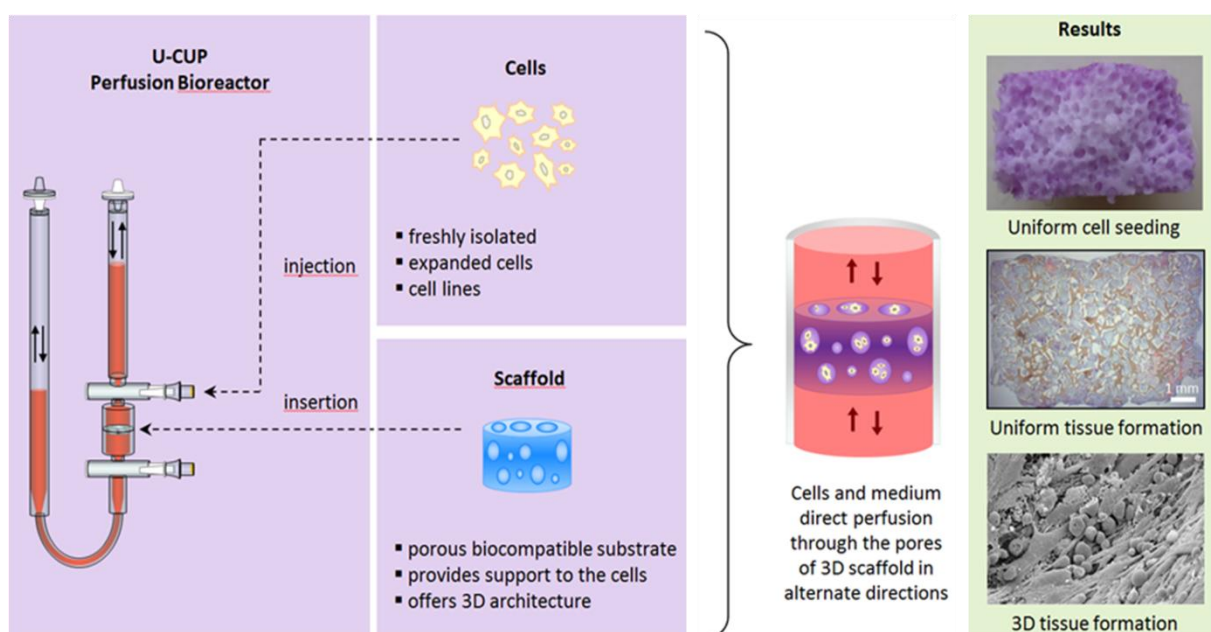
bioréacteur est, entre autres, la difficulté à conserver les matrices en rotation sans qu'elles s'accumulent au fond du bioréacteur.

## (2) Bioréacteurs à perfusion

A la différence des bioréacteurs précédemment décrits, les bioréacteurs à perfusion (**Figure 28, c**) permettent le transport des nutriments et de l'oxygène dans l'ensemble du matériau. Les systèmes de perfusion sont généralement constitués d'une chambre, qui abrite les matériaux cellularisés, et d'une pompe péristaltique à galets qui délivre le milieu de culture. Le mode d'écoulement du fluide (i.e. constant, oscillant ou pulsé) peut influencer de manière significative la stimulation des cellules ostéogéniques. Ce système de perfusion permet une distribution plus homogène des cellules au sein de la matrice, une colonisation cellulaire plus importante, une prolifération accrue, une différenciation plus rapide ainsi qu'une synthèse accrue de matrice extracellulaire minéralisée dans la totalité du matériau (141). *In vivo*, les matrices cellularisées en conditions dynamiques de perfusion génèrent une quantité de tissu osseux plus importante comparativement aux témoins cultivés de manière statique (142, 143).

L'application de contraintes mécaniques va être perçue par des mécanorécepteurs présents au niveau des membranes (144, 145). Ces récepteurs vont transformer le signal mécanique en un signal chimique et permettre la méchanotransduction intracellulaire. Selon le modèle (cyclique ou continu) et le régime utilisé de ces contraintes (amplitude, fréquence, durée, continu, intermittent), la réponse cellulaire sera différente (activation des voies de signalisation pour la différenciation, prolifération...).

A ce jour, peu de bioréacteurs à perfusion ont été commercialisés. Le bioréacteur de la société CELLEC® est l'un des rares exemples (**Figure 29**).



**Figure 29. Un système de bioréacteur à perfusion commercial (© Celtec®).**

Ce bioréacteur a été développé par l'équipe d'Ivan Martin (à Bâle, en Suisse). Il peut être soit utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes de développement du tissu (146-148), soit comme système de fabrication d'une greffe dans le cadre de la médecine régénérative (112, 149).

La principale limite de ces différents bioréacteurs est de disposer d'un système ne permettant pas l'analyse d'un nombre important d'échantillon. Dans tous les cas, ils sont adaptés à un type de matériau (céramiques, polymères).

## **D. La vascularisation des implants osseux**

L'importance de la vascularisation pour le développement et la réparation du tissu osseux a été largement documentée dans la littérature sur l'ingénierie du tissu osseux (150). La néoformation osseuse a lieu majoritairement dans les zones les plus vascularisées alors qu'une vascularisation inadéquate des lésions osseuses est associée à une diminution de la réparation et de la régénération du tissu.

La vascularisation semble être la limite majeure au succès des produits d'ingénierie tissulaire osseuse. Les paramètres essentiels à maîtriser pour la construction de produits d'ingénierie tissulaire vascularisés sont :

- l'apport de nutriments,
- l'oxygénation des supports,
- l'élimination des déchets.

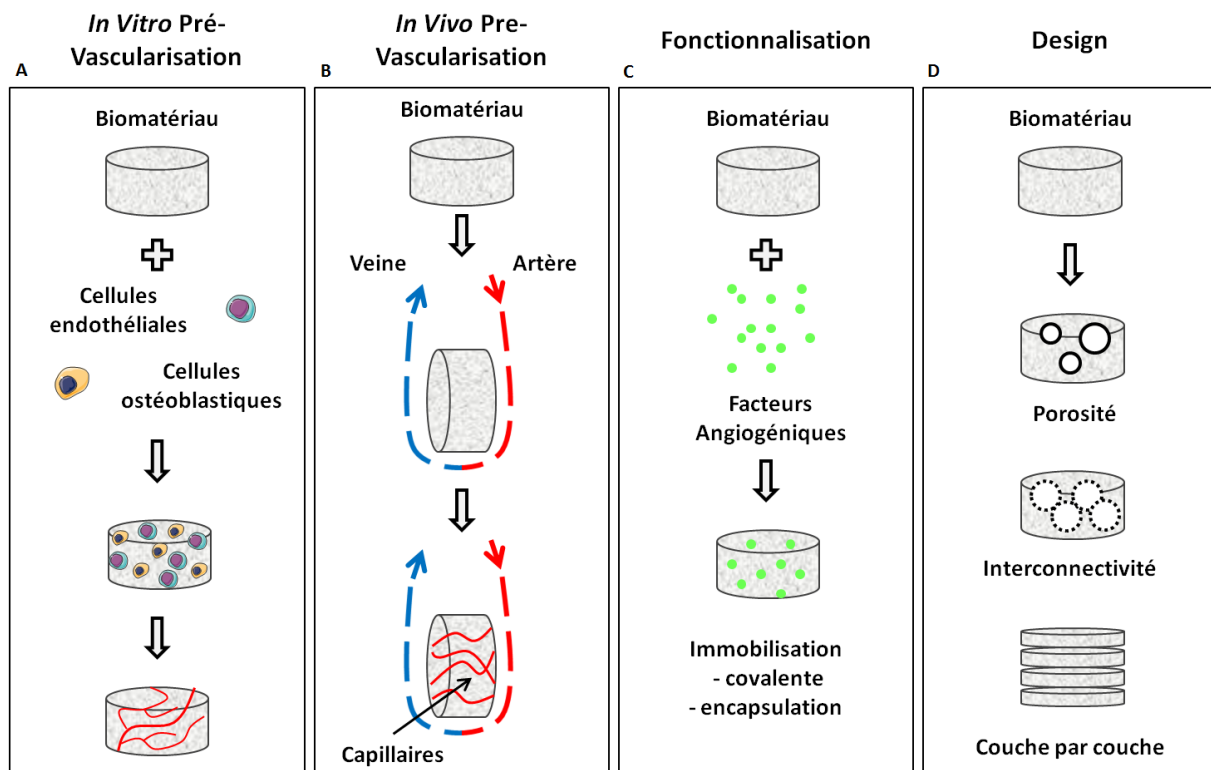
Un manque de diffusion des nutriments, un déficit de vascularisation et une absence d'élimination des déchets vont conduire rapidement à une nécrose des tissus au sein de ces implants. De façon générale, et d'un point de vue histologique, les sites de néoformation osseuse sont le plus souvent situés à moins de 200  $\mu\text{m}$  (151). Plusieurs stratégies sont proposées pour favoriser la vascularisation des tissus (**Figure 30**).

### **i. Les techniques *in vitro***

Les stratégies actuelles de pré-vascularisation *in vitro* impliquent la co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques (152). Cette stratégie s'appuie sur de nombreux travaux de la littérature mettant en évidence *in vitro* une communication directe et indirecte entre ces deux types cellulaires. L'association des deux types cellulaires à une même matrice 3D permet d'activer la différenciation ostéogénique mais aussi de promouvoir *in vivo* une vascularisation accrue (153). Cette approche expérimentale permet également une anastomose plus rapide avec la vascularisation du tissu hôte, par rapport aux constructions non pré-vascularisées.

Un élément important pour développer de telles stratégies de pré-vascularisation est le type de cellules endothéliales que l'on doit utiliser. Bien que les cellules endothéliales matures,

isolées à partir des veines saphènes, peuvent être utilisées, elles présentent des inconvénients majeurs comme leur nombre et leur faible capacité proliférative. En revanche, les cellules souches issues du sang périphérique constituent une population cellulaire pertinente pour une pratique clinique. Ces progéniteurs endothéliaux présentent *in vitro* un potentiel de prolifération très élevé, une morphologie pavimenteuse typique des cellules endothéliales et les caractéristiques des cellules endothéliales matures (CD31, vWF, VE-Cadherine, etc.). En outre, leur fonctionnalité et leur bonne capacité angiogénique, sont démontrées notamment par la formation de réseau vasculaire dans le Matrigel®.



**Figure 30. Les différentes méthodes de pré-vascularisation des biomatériaux. D'après (154).**

(A) Mise en place de co-culture de cellules ostéogéniques et endothéliales au sein d'une structure tridimensionnelle. (B) Formation d'une boucle artério-veineuse, au sein de la matrice. (C) Fonctionnalisation des matrices avec des facteurs angiogéniques. (D) Structuration du matériau.

La co-culture *in vitro* d'EPCs dérivées du sang périphérique avec des MSCs de moelle osseuse a été initiée au laboratoire (U1026, Bioingénierie Tissulaire, Bordeaux) depuis de nombreuses années. L'ensemble des résultats a démontré une synergie d'activité entre ces deux types cellulaires, qui se traduit par une augmentation de l'expression des facteurs angiogéniques et ostéogéniques et qui se traduit aussi par des niveaux de vascularisation et de néoformation osseuse accrus (155, 156). Yu *et al* ont également noté que la nécrose observée au centre des matrices de polycaprolactone associées avec de l'hydroxyapatite (HA) pouvait être limitée en co-cultivant les EPCs avec les ostéoblastes dérivées de MSCs, au sein de ces mêmes matrices (157).

Toutefois, ces co-cultures exigent de développer la culture des deux types cellulaires isolés à partir de sources différentes. Il serait pertinent de disposer des deux composantes cellulaires à partir d'une même origine pour faciliter la mise en place d'essais cliniques. Dans ce contexte la moelle osseuse ou le sang périphérique constituent des sources pertinentes pour isoler et permettre à la fois l'ostéogenèse et la vasculogenèse. On peut citer par exemple les MSCs qui, isolées à partir de la moelle osseuse, sont capables d'évoluer vers le lignage ostéoblastique et présentent également un potentiel de différenciation vers un lignage endothélial (158).

Une autre source autologue pertinente est la fraction stromale vasculaire (SVF) du tissu adipeux. Elle est en effet disponible en abondance, facile à récupérer (e.g. liposuction, chirurgie abdominale, etc.) et est associée à une morbidité minimale au niveau du site donneur.

Ces approches de pré-vascularisation *in vitro* soulèvent d'autres questions, notamment le temps nécessaire à la co-culture en 3D. Il est difficile de savoir s'il faut maintenir une culture à long terme pour la construction du produit afin d'établir la formation d'un réseau vasculaire plus abouti, ou s'il vaut mieux implanter la matrice directement après l'ensemencement des deux types cellulaires.

Enfin, même si les cellules endothéliales présentent un fort potentiel angiogénique, il est important de considérer les autres types cellulaires, tels que les cellules musculaires lisses ou les péricytes qui assurent la formation d'un système vasculaire fonctionnel et mature. Il en est de même pour la communication entre les cellules osseuses, vasculaires et hématopoïétiques.

## ii. Les techniques *in vivo*

Des approches *in vivo* peuvent être proposées pour permettre une vascularisation des constructions osseuses.

L'approche dite du « lambeau préfabriqué/prévascularisé » utilise un mode « extrinsèque » de vascularisation et comporte deux étapes principales. La première étape consiste en l'implantation du produit d'ingénierie dans un tissu vascularisé (e.g. en sous-cutané, en intramusculaire ou en intrapéritonéale). Au sein des constructions, un réseau micro-vasculaire va se former en quelques semaines. La construction est ensuite prélevée et transférée au niveau du site de la lésion osseuse où les structures vasculaires pourront se connecter avec le tissu hôte. Il en résulte une perfusion immédiate de la totalité du construit. Mais cette technique présente de nombreux inconvénients, notamment l'exigence de deux opérations chirurgicales, le coût, le degré de vascularisation sur le site primaire, ainsi que la morbidité de l'acte (159).

Une autre approche utilise un mode « intrinsèque » de vascularisation et repose sur l'incorporation d'une boucle artério-veineuse au sein du matériau (160). Cette procédure

présente des avantages par rapport à l'approche de « lambeau préfabriqué/prévascularisé » car elle ne nécessite pas deux opérations distinctes et ne dépend pas des conditions vasculaires locales. Par contre, elle reste encore très difficile à mettre en place car la plupart des constructions ne présentent pas des formes compatibles pour les entourer d'un vaisseau sanguin lors de leur implantation.

### iii. Fonctionnalisation par des facteurs angiogéniques

Des facteurs de croissance angiogéniques peuvent être incorporés dans la matrice par simple imprégnation/absorption pour une libération plus ou moins rapide selon le type et la structure de la matrice (161). Ils peuvent être encapsulés dans des microvecteurs (162), ou immobilisés de manière covalente et libérés sous l'action d'un stimulus externe (163). Les facteurs de croissance peuvent être également exprimés par les cellulesensemencées dans la matrice, qu'elles soient génétiquement modifiées ou non.

Plusieurs points importants déterminent le succès de cette approche. Tout d'abord, le choix des facteurs de croissance est essentiel. Plusieurs facteurs de croissance angiogéniques sont couramment étudiés, comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ou encore le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF). Des études ont montré que l'incorporation de VEGF et de bFGF permet une accélération de la vascularisation des constructions *via* la mobilisation et le recrutement de cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Cependant, les réseaux vasculaires qui en résultent sont souvent désorganisés et peu matures (164). L'addition de facteurs de croissance qui stimulent le recrutement des cellules musculaires lisses ou le recrutement des péricytes (tels que le PDGF, le TGF- $\beta$  et l'Ang1) peut permettre la stabilisation et la maturation des vaisseaux (163).

Le second point concerne la concentration du facteur de croissance qui doit être délivré pour se situer dans des conditions les plus physiologiques possibles. Il a été montré que des quantités excessives de VEGF libérées par une matrice pourrait induire une perméabilité vasculaire et une hypotension sévère (162).

Le troisième point concerne la cinétique de délivrance qui doit pouvoir être adaptée au type de facteur de croissance séquestré, pour permettre une libération physiologique adaptée à l'application envisagée. La délivrance des facteurs de croissance peut se faire par diffusion passive ou couplée à la vitesse de dégradation du biomatériau. Le profil de libération qui en résulte doit être en phase avec le processus de régénération tissulaire et les exigences cellulaires (165). Dans ce contexte, il a été montré que le réseau vasculaire formé à partir d'une libération contrôlée de VEGF permet une formation vasculaire organisée, contrairement au système vasculaire qui résulte d'une libération incontrôlée de VEGF (166).

Par ailleurs, de multiples facteurs de croissance peuvent être associés à ces matrices 3D. La cinétique de leur libération peut être différente pour permettre le recrutement et l'activité de plusieurs types cellulaires impliqués dans la régénération tissulaire.

La dernière alternative concerne l'utilisation des cellules génétiquement modifiées pour sécréter du VEGF. Des études expérimentales démontrent l'efficacité de cette thérapie génique et la formation vasculaire accrue par la présence de ces cellules (167) modifiées pour exprimer un ou deux facteurs (168). Cette stratégie n'en est néanmoins encore qu'à un niveau expérimental avant d'envisager des essais précliniques et cliniques.

En conclusion, les stratégies de pré-vascularisation sont nombreuses et reposent dans tous les cas sur les multiples interactions qui existent entre les deux niches vasculaires et stromales. Ce dialogue intercellulaire sera développé dans le paragraphe suivant.

## **IV. La communication cellulaire dans le tissu osseux**

Le développement du tissu osseux sollicite l'activité de nombreux types cellulaires (cellules chondrocytaires, ostéoblastiques, endothéliales et hématopoïétiques) capables de dialoguer pour produire un tissu osseux fonctionnel. De même, le remodelage osseux dans le squelette adulte est un processus dynamique qui nécessite des activités cellulaires coordonnées entre les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Ces différents couplages cellulaires nécessitent des mécanismes étroitement régulés comprenant la reconnaissance intercellulaire et la communication cellule-cellule, qu'elle soit de nature homotypique ou hétérotypique.

### **A. Les modes de communication cellulaire**

Les cellules peuvent communiquer par le biais de trois principaux mécanismes :

- Par des interactions directes entre des molécules membranaires de deux cellules adjacentes et par l'établissement de jonctions cellulaires (jonctions adhérentes ou par jonctions communicantes de type GAP qui forment des connexions cytoplasmiques directes entre des cellules adjacentes).
- Par des hémicanaux à la surface de la membrane plasmique des cellules.
- Par la production de facteurs diffusibles produits par les cellules ou libérés de la matrice extracellulaire. Ces facteurs pourront activer des récepteurs spécifiques sur les cellules cibles et agir de façon paracrine ou autocrine.

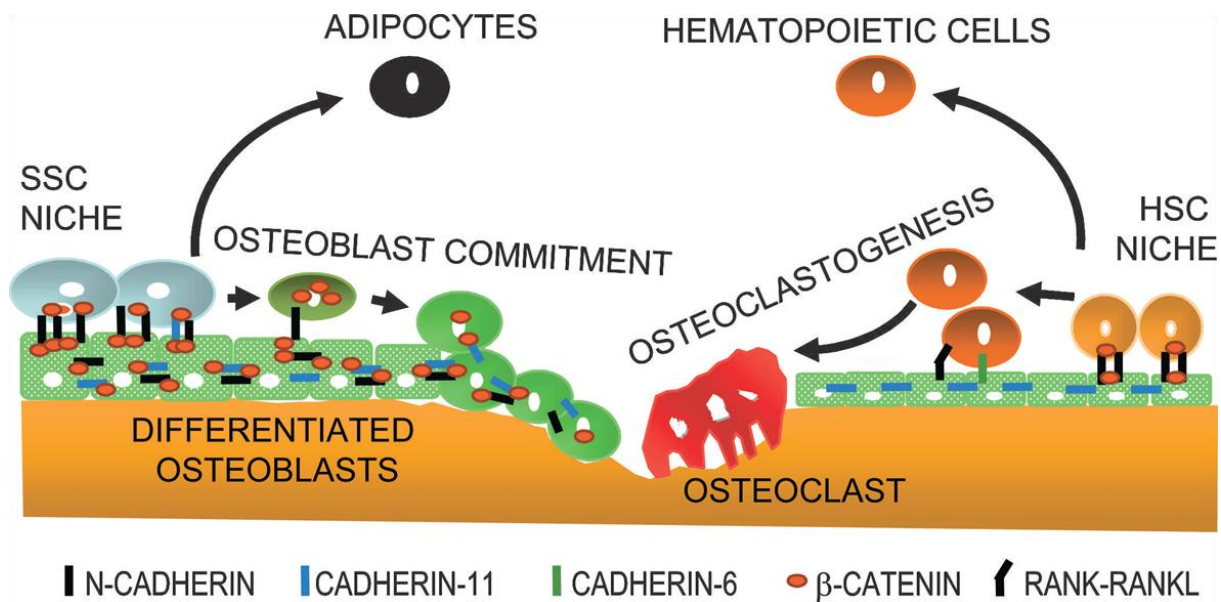
## i. Jonctions cellulaires

### (1) Les jonctions adhérentes

Les ostéoblastes communiquent par une grande variété d'interactions, y compris par l'établissement de jonctions intercellulaire dites adhérentes. Ces jonctions impliquent des protéines spécialisées, les Cadhérines, qui sont des structures intercellulaires homologues dépendantes du calcium. Elles représentent une famille de 30 glycoprotéines transmembranaires de 120 kDa, composées d'un long domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine transmembranaire unique ainsi que d'une queue intracellulaire C-terminale. Le domaine intracellulaire des Cadhérines lie les jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine *via* un complexe multiprotéique qui comprend des caténines et des plakoglobines. Les jonctions adhérentes sont essentielles, non seulement dans le développement embryonnaire, mais également dans d'autres processus biologiques, y compris dans la différenciation, le maintien de l'architecture tissulaire, le maintien de la polarité cellulaire, la réponse immunitaire, le processus inflammatoire, la division et la mort cellulaire, ou encore dans la progression des tumeurs et des métastases (169).

Un grand nombre de Cadhérines est sollicité lors de la morphogenèse des tissus et de la différenciation cellulaire. Dans le cas de la différenciation ostéoblastique, de nombreux travaux de la littérature démontrent que la N-Cadhérine (N-Cad) est en particulier sollicitée dans les premières phases de développement embryonnaire des structures osseuses (170). Les cellules souches expriment une variété de Cadhérines qui servent d'empreinte moléculaire pour l'identification de la phase d'engagement de leur phénotype (171). Les ostéoblastes différenciés expriment quant à eux principalement la N-Cad et la Cadhérine-11 (Cad-11), la N-Cad étant fortement exprimée lors de la différenciation ostéogénique.

Les fonctions multiples des Cadhérines dans la biologie du tissu osseux (**Figure 31**) ont été identifiées à l'aide de différents inhibiteurs utilisés *in vitro* ou dans des modèles expérimentaux (utilisation de peptides mimétiques, d'anticorps bloquants, des stratégies d'ARN antisens ou des méthodes de surexpression d'un dominant négatif de la Cadhérine). Quelles que soient les stratégies d'inhibition utilisées, elles confirment la fonction des Cadhérines au cours du développement osseux et la régénération du tissu (172).



**Figure 31. Fonctions des Cadhérines dans les interactions cellule-cellule au sein du microenvironnement osseux. D'après (173).**

Les cellules souches osseuses et hématopoïétiques (SSC, HSC) sont organisées autour de niches cellulaires. Ces cellules sont capables de communiquer entre elles et cette communication sollicite l'activité des Cadhérines (interactions orthotypiques et hétérotypiques), principalement la N-Cadhérine et la Cadhérine-11. Cette dernière semble réguler positivement l'engagement et la différenciation des cellules. Quant à la N-Cadhérine, elle est régulée négativement pour favoriser la « sortie » de la niche SSC. La communication entre les ostéoblastes et les précurseurs ostéoclastiques sollicite l'activité de la Cadhérine-6 et/ou de la N-Cadhérine qui permettent la différenciation des ostéoclastes en stabilisant le complexe RANK-RANKL.

La fonction *in vivo* des Cadhérines au niveau de la formation osseuse a également été évaluée à l'aide de modèles de génétique expérimentale. Des souris Knock Out (KO) pour la Cad-11 présentent une légère diminution de la calcification des sutures crâniennes et des métaphyses fémorales. Ce phénotype s'accompagne d'une ostéopénie modérée à partir de l'âge de trois mois, caractérisée par une surface de minéralisation et un volume d'os trabéculaire réduits. Le phénotype relativement atténué de ces animaux peut être lié à un « sauvetage » (compensation) partiel entre la N-Cad et la Cad-11. Par contre, le KO de la N-Cad est létal chez les souris après 10 jours de gestation, ce qui limite l'étude du rôle de la N-Cad dans le développement et la fonction du squelette.

Récemment, la surexpression dans les ostéoblastes chez la souris d'un dominant négatif de la N-Cad dépourvu du domaine extracellulaire (NcadΔC) a mis en évidence l'importance de la N-Cad dans le lignage ostéoblastique (174). Ces souris transgéniques présentent un retard notable dans l'acquisition de leur masse osseuse, en partie lié à une activité ostéogénique altérée. La vitesse de formation de l'os chez ces souris est réduite d'environ 74% par rapport aux témoins.

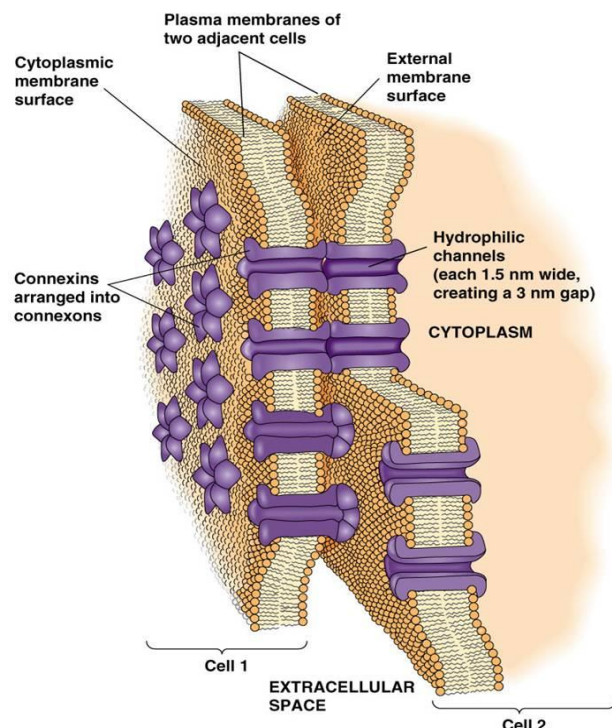
Les interactions hétérotypiques entre ostéoblastes / ostéoclastes / cellules mésenchymateuses / cellules hématopoïétiques par l'intermédiaire des Cadhérines ont récemment été mises en évidence. Des immunomarquages sur des sections de moelle

osseuse de souris ont pu démontrer la présence de N-Cad entre les ostéoblastes et les cellules souches hématopoïétiques (HSC) (175). Ce dernier point témoigne du contrôle de la niche hématopoïétique par les Cadhérines

Les Cadhérines, responsables de l'adhésion cellule-cellule, jouent également un rôle majeur dans l'établissement des jonctions communicantes ou jonctions GAP composées en partie par la Connexine 32 (Cx32) et la Connexine 43 (Cx43) (176). Une surexpression de la E-Cadhérine dans les cellules épidermiques induit une augmentation de la communication cellulaire par l'établissement de jonctions communicantes. Inversement, une inhibition de la N-Cadhérine par des anticorps bloquants induits une diminution de la formation des jonctions communicantes de type GAP.

## (2) Les jonctions communicantes

Les jonctions de type GAP représentent un autre mode d'interaction cellule-cellule. Elles sont composées de deux hémicanaux juxtaposés présents à la surface de cellules adjacentes (**Figure 32**). Les jonctions communicantes forment un canal transcellulaire qui permet la propagation des ions, de métabolites ou encore de seconds messagers entre les cellules adjacentes. Les Connexines (Cx) qui constituent ces connexons sont une famille de protéines codées par au moins 17 gènes différents.

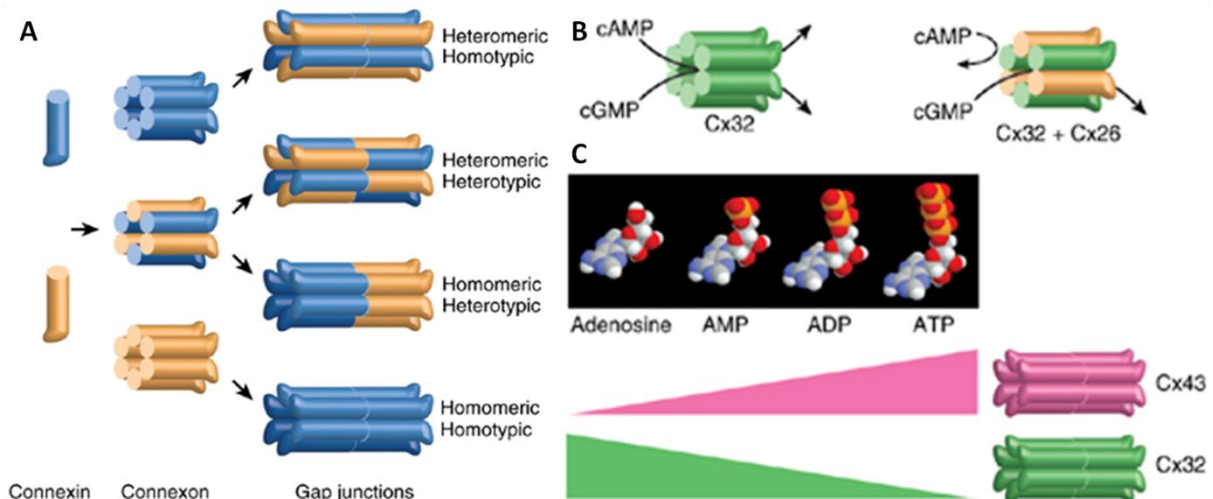


**Figure 32. Jonctions communicantes de type GAP. D'après (1).**

Ces jonctions sont constituées par des connexons composés de Connexines. Ces connexons forment de véritables canaux entre les cellules pour laisser passer de petites molécules.

Les Connexines peuvent s'assembler en tant qu'hémicanaux homomériques ou hétéromériques. L'isotype formant les hémicanaux dicte la taille et la perméabilité du canal résultant (**Figure 33**). Cependant, la perméabilité des Connexines et leur conductance

électrique moléculaire sont régulées par des phosphorylations et/ou par la tension de la membrane. Les jonctions communicantes de type GAP permettent le transfert de molécules de poids moléculaire inférieur à 1.2 kDa. Parmi ces molécules, nous citerons des ions comme le calcium, des métabolites, l'ATP, et d'autres molécules comme la prostaglandine IP3.



**Figure 33. Représentation schématique de l'assemblage des jonctions GAP et de leur perméabilité. D'après (177).**

**A :** Six Connexines oligomérisées forment un hémicanal appelé connexon. Différentes Connexines peuvent interagir pour former un homomère, un hétéromère et des canaux hétérotypiques. **B :** Les jonctions GAP sont spécifiques en terme de perméabilité. Les canaux composés de Cx32 sont perméables à la fois à l'AMPc et au GMPc alors que les canaux hétéromériques Cx26/Cx32 sont connus comme diminuant le transfert de l'AMPc mais présentant une perméabilité aux GMPc semblable à celle des canaux composés de Cx32. **C :** L'ajout de groupements phosphates supplémentaires à l'adénosine (allant d'un groupement phosphate pour l'AMP à trois groupements phosphate pour l'ATP) change sa perméabilité par les jonctions communicantes, composées de Cx43 ou Cx32.

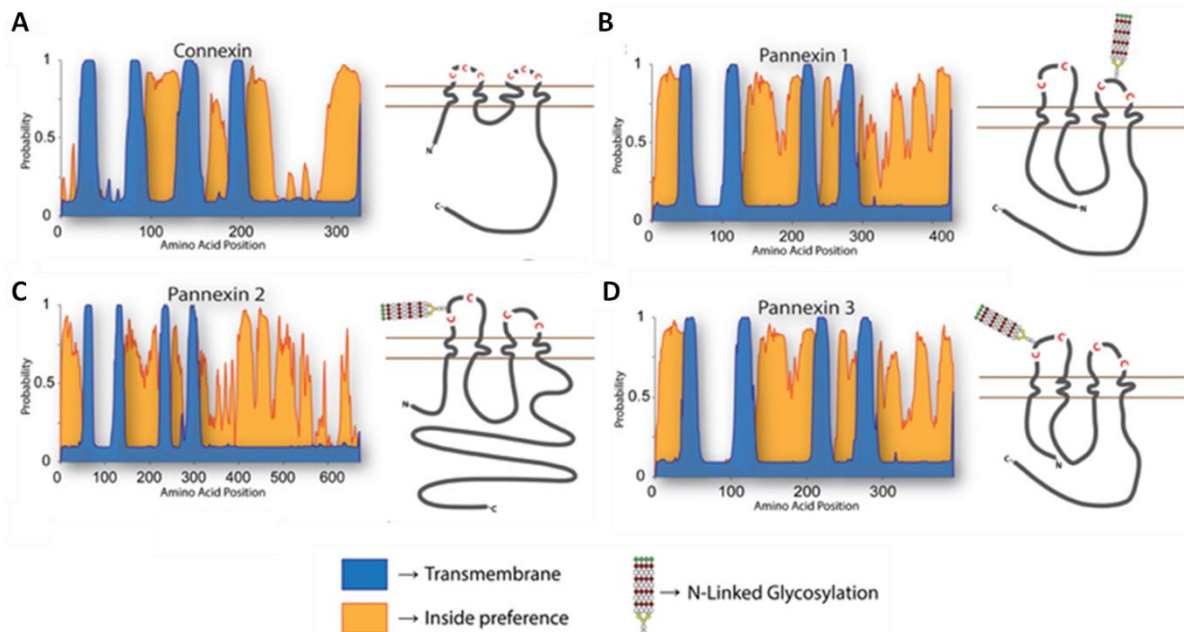
Dans l'os, des jonctions GAP ont été décrites entre les ostéoblastes mais aussi entre les ostéoblastes et les ostéocytes. Ces jonctions communicantes sont composées principalement de Cx43 et, dans une moindre mesure, de Cx45. La Cx43 a été étudiée comme étant perméable à des molécules pouvant aller jusqu'à 1,2 kDa, aux ions, aux métabolites et aux seconds messagers tels que les dérivés d'AMPc, d'ADPc-ribose et les dérivés de l'inositol. La Cx45 forme des canaux plus petits, perméables à des molécules jusqu'à environ 0,3 kDa.

### (3) Les Pannexines

Les Cx forment des jonctions communicantes intercellulaires. A côté des Connexines, il existe une autre famille de protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires, connues sous le nom de Pannexines (Panx).

Les gènes de Panx sont regroupés en trois grands isotypes et les produits de ces gènes ont été désignés par Panx1, Panx2, et Panx3. Les Panx présentent une structure similaire à celle

des Cx (**Figure 34**), à savoir quatre domaines transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques au niveau intracellulaire (C-terminale et N-terminale).



**Figure 34. Structure des Connexines et des Pannexines. D'après (178).**

(A) On peut observer l'arrangement et la conformation de toutes les Cxs humaines, et (B, C, D) la conformation des trois isotypes des Panxs. Toutes les protéines présentent de nombreuses similitudes de structure, avec 4 domaines transmembranaires (en bleu), et des sections intracellulaires (en orange) sont illustrées avec une extrémité N-terminale et une boucle C-terminale cytoplasmique.

Des expériences ont montré que les quatre résidus cystéine présents dans le domaine extracellulaire sont nécessaires pour la formation du canal fonctionnel de la Panx1. L'entrée extérieure du pore est estimée à un diamètre de  $\sim 17$  à  $21$  Å ( $\sim 29,5$  à  $30,5$  Å dans le cas de la Panx2). La protéine monomérique, une fois oligomérisée en hexamère, forme un pore analogue aux connexons, les pannexons. Des études en microscopie électronique réalisées sur des membranes cellulaires exprimant la Panx1 ou Panx2 confirment l'agencement en pannexons. Des expériences de Western blot révèlent les interactions des Panx1 en dimères et en hexamères (179). De la même façon les Panx2 peuvent former des structures octamériques, arrangement que les Cx ne sont pas capables de faire. En ce qui concerne la Panx3, elle présente un poids moléculaire en monomères de 42 kDa. Des expériences d'immunoprécipitation ont suggéré que des pannexons hétéromériques peuvent également se former, composés de Panx1 et Panx2 ou Panx1 et Panx3, mais pas entre Panx2 et Panx3.

## ii. Interactions récepteurs-ligands

Nous donnerons dans ce paragraphe l'exemple de l'interaction entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les premiers travaux ont montré que le contact direct cellule-cellule, entre les précurseurs ostéoclastiques et les cellules stromales ou entre les cellules ostéoblastiques, était nécessaire pour favoriser l'induction de la différenciation des ostéoclastes. Ces

interactions cellule-cellule impliquent l'engagement du récepteur activateur du NFκB (RANK) avec le RANK ligand (RANKL). La proximité étroite entre les deux cellules qui interagissent est requise pour l'initiation et le maintien du signal ostéoclastogénique, comme des travaux l'ont montré avec un blocage de la N-Cadhérine induisant une inhibition de l'ostéoclastogenèse (180).

### iii. Facteurs diffusibles

De multiples mécanismes font intervenir des facteurs locaux solubles qui peuvent être séquestrés au sein de la matrice osseuse minéralisée puis libérés par l'activité de résorption des ostéoclastes ou produits par les cellules dans le microenvironnement osseux (ostéoblastes, cellules endothéliales et macrophages). Ces facteurs, tels que le PDGF, l'EGF, les FGFs, les TGFs ou encore les IGFs, exercent un rôle majeur dans la régénération tissulaire et agissent de façon paracrine et autocrine.

## B. Les jonctions communicantes dans l'os

La formation de jonctions communicantes est le mode de communication le plus direct pour transmettre les signaux d'une cellule à une autre. Le rôle de ces jonctions est de maintenir un comportement synchronisé et coopératif des cellules au sein d'un même tissu.

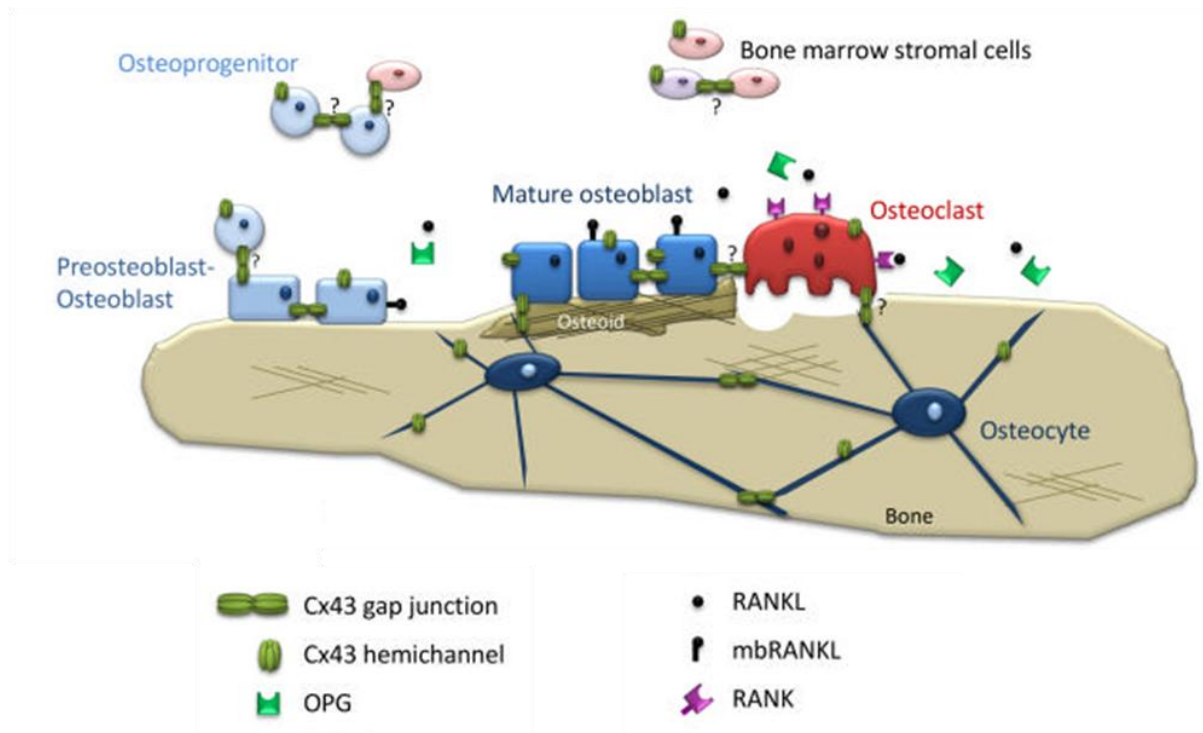
Les jonctions communicantes de type GAP jouent un rôle important dans la régulation de la transmission de signaux entre les différentes cellules osseuses. Elles réglementent le développement, la différenciation, la formation et le remodelage du tissu osseux (**Figure 35**). Des études *in vitro* ont mis en évidence le rôle des jonctions GAP dans l'ostéogenèse (181, 182). Elles régulent la différenciation, la survie et l'apoptose des ostéoblastes. Les ostéocytes utilisent les jonctions communicantes pour coordonner le remodelage osseux en réponse à des facteurs anabolisants et aux chargements mécaniques.

Au niveau osseux, l'inhibition de la communication intercellulaire, *via* les jonctions GAP, a toujours été associée à une réduction de la différenciation ostéoblastique, assistée par une expression réduite des gènes ostéoblastiques, et à une diminution de la minéralisation. A l'inverse, la surexpression de la Cx43 dans ces cellules augmente l'expression du phénotype ostéogénique (183). Par ailleurs, la différenciation des ostéoclastes et la capacité de résorption sont également modulées par l'activité des GAP jonctions.

Le modèle de génétique expérimentale Cx43<sup>+/-</sup> a permis de montrer que la déplétion, même partielle, de la Cx43 induit des modifications phénotypiques du tissu osseux telles qu'une hypominéralisation de la calvaria ainsi qu'une altération de la différenciation des cellules ostéoblastiques (184). Ces modifications ont été décrites comme résultant d'une perte de sensibilité des ostéoblastes aux facteurs solubles, perte de sensibilité modulée par l'intermédiaire de la Cx43.

De récentes études de génétique humaine relient le syndrome de la dysplasie oculo dento digitale (ODDD) au locus du gène de la Cx43.

Il a été montré que la perte et/ou la mutation de certaines Connexines conduisent à des troubles physiopathologiques dans de nombreux tissus, comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la surdité neurosensorielle non syndromique ou encore l'hétérotaxie viscéroatriale.



**Figure 35. La Connexine 43 dans le microenvironnement osseux. D'après (185).**

L'établissement des jonctions communicantes de type GAP entre les différents stades du lignage ostéoblastique (BMSCs, ostéoblastes, ostéocytes) et les cellules du lignage ostéoclastique assure la coordination entre la formation et la résorption osseuse.

#### i. Fonction dans les cellules du tissu osseux

##### (1) Cellules mésenchymateuses et la lignée ostéoblastique

L'expression de la Cx43 et de la Cx45 a été largement rapportée dans les compartiments de la moelle osseuse (186) au niveau de différents types cellulaires, de la cellule mésenchymateuse à l'ostéoblaste mature, ainsi que dans le lignage ostéoclastique.

Cette expression est confirmée à l'aide de modèles de culture des BMSCs et de différents stades de différenciation ostéoblastique. La surexpression de la Cx43 dans les BMSCs est corrélée avec l'expression des marqueurs ostéogéniques dans des cultures 3D (187). Un exemple récent de cette coordination Cx/phénotype osseux a été démontré à partir de cultures de cellules stromales de moelle osseuse humaine (188). Ces travaux démontrent le

rôle de la Cx43 et de la Cx45 dans les jonctions GAP pour favoriser la sécrétion de CXCL12, qui est essentiel dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques (188).

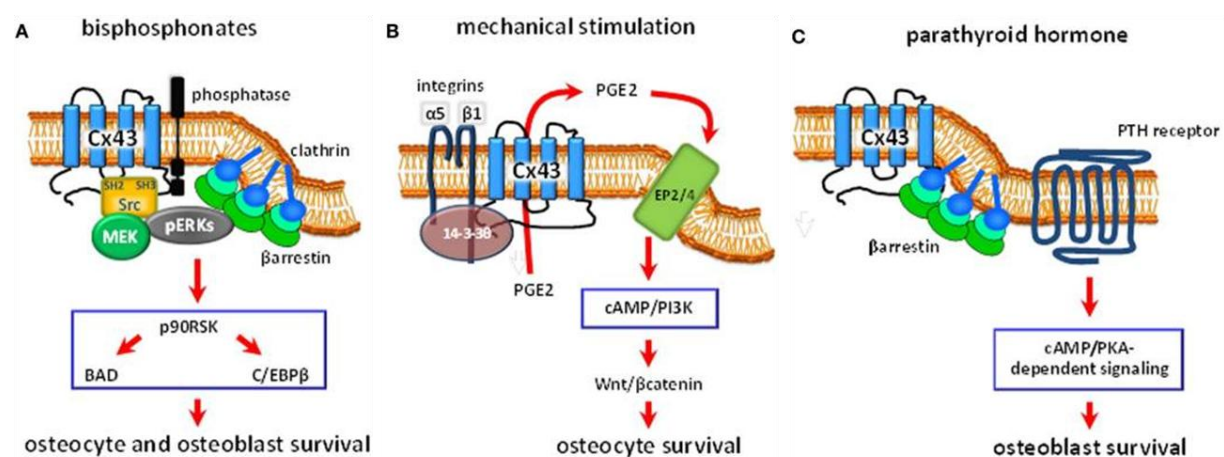
## (2) Ostéocytes

Les ostéocytes sont organisés en un véritable réseau cellulaire connecté par de nombreuses jonctions communicantes de type GAP. Ils expriment majoritairement la Cx43 qui permet le dialogue avec les ostéoblastes (**Figure 36**).

## (3) Ostéoclastes

Le rôle des jonctions GAP dans les ostéoclastes reste peu connu par rapport à celui dans les ostéoblastes et les ostéocytes. Cependant, des travaux de la littérature mettent en évidence un mécanisme de communication par l'intermédiaire de jonctions communicantes. La Cx43 a été identifiée dans les ostéoclastes et pourrait jouer un rôle dans la fusion des précurseurs monocytaires pour former des ostéoclastes multinucléés (189). En effet, l'inhibition des jonctions GAP à l'aide d'un peptide mimétique de la Connexine (Gap 27) provoque une diminution du nombre des ostéoclastes et une capacité de résorption de l'os réduite (190).

Par ailleurs, une augmentation de l'ARNm de la Cx43 est observée au cours de la résorption osseuse stimulée par l'hormone parathyroïdienne (PTH). Dans ce même contexte, l'utilisation des inhibiteurs des jonctions GAP provoque une inhibition de la formation des lacunes de résorption induites par la PTH ou le 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol). Enfin, l'ostéoclastogénèse, stimulée par le RANKL dans des cultures de moelle osseuse de souris, est réduite voire totalement inhibée par l'inactivation des jonctions GAP (191).



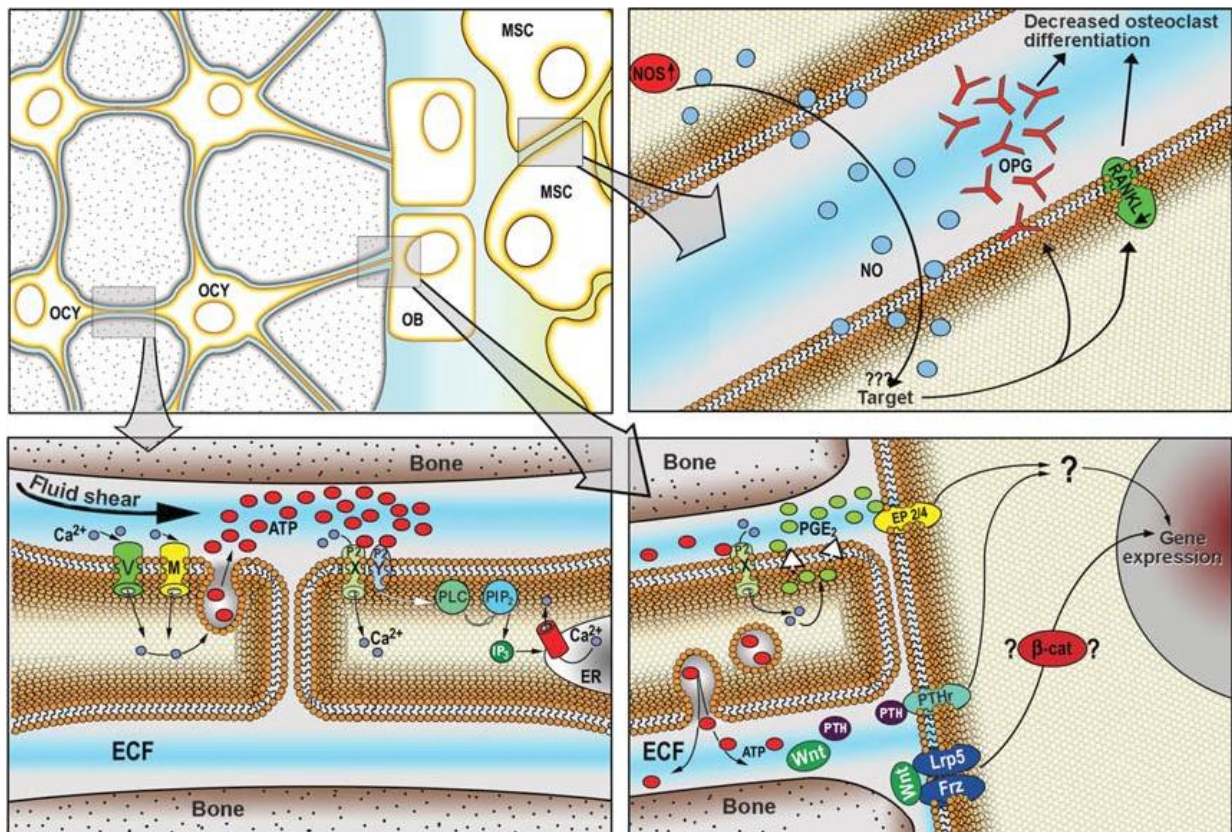
**Figure 36. Trois exemples de signalisation régulée par la Connexine 43 dans les cellules osseuses. D'après (192).**

(A) Les bisphosphonates se lient à des phosphatases présentes sur la membrane cellulaire. La liaison induit l'ouverture du canal Cx43 puis une activation des kinases Src, MEK et ERK. Cela conduit à la phosphorylation dans le cytoplasme de p90RSK, BAD et C/EBPβ, ce qui se traduit par un signal de survie des ostéoblastes et des ostéocytes. (B) La stimulation mécanique induit le rapprochement de

l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  avec la Cx43. Il en résulte son ouverture et la libération de PGE2 qui, à son tour, active le récepteur aux prostaglandines EP2/4, conduisant à l'activation de la voie AMPc/PI3K. Cela conduit à l'accumulation de  $\beta$ -caténine, une activation consécutive de la signalisation Wnt et un signal d'inhibition de l'apoptose des ostéocytes. (C) L'hormone parathyroïdienne (PTH), en se liant au récepteur de la PTH, induit l'activation de la voie de signalisation de l'AMPc/PKA. La Cx43, en séquestrant la  $\beta$ -arrestine, facilite la signalisation en aval de l'AMPc/PKA et favorise donc la survie des ostéoblastes.

## ii. Fonction dans la mécanotransduction de l'os

Le maintien de l'homéostasie tissulaire nécessite un équilibre approprié entre les signaux mécaniques et chimiques qui affectent la structure de l'os (**Figure 37**). Contrairement aux ostéoblastes et aux ostéoclastes, les ostéocytes sont connus pour être extrêmement sensibles aux contraintes mécaniques et plus particulièrement aux contraintes de cisaillement. De nombreuses études ont montré que les ostéocytes sont reliés aux ostéoblastes par des jonctions GAP (193) et suggèrent l'importance de ces jonctions dans la mécanotransduction au niveau du système musculo-squelettique. Des expériences de stimulation mécanique appliquée aux ostéocytes (et non aux ostéoblastes) provoquent une augmentation de l'ALP uniquement dans les ostéoblastes.



**Figure 37. La mécanotransduction dans le tissu osseux. D'après (145).**

Les ostéocytes sont des cellules emmurées dans la partie corticale du tissu osseux et ils sont reliés entre eux par de longs prolongements cytoplasmiques et des canalicules qui assurent la transmission des stimuli externes. Les contraintes de cisaillement présentes au niveau des ostéocytes entraînent un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire via des canaux voltage dépendant (V) et mécano dépendant (M),

mais entraîne aussi la libération d'ATP, qui se lie à des récepteurs purinergiques P2X (ionotropiques) et P2Y (métabotropiques).

La signalisation intracellulaire induite par la PTH semble également être sollicitée dans les mécanismes de la méchanotransduction bien que les voies intracellulaires impliquées ne soient pas bien comprises. La pression exercée au niveau de la cavité médullaire et/ou les forces de cisaillement appliquées sur des cellules stromales de moelle osseuse (MSC) peuvent stimuler l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la production d'oxyde nitrique (NO). Le NO peut agir en tant qu'inhibiteur de la résorption osseuse par inhibition de l'expression de RANK-L, tout en augmentant la production de l'ostéoprotégérine (OPG). OCY = ostéocytes; OB = ostéoblastes; MSC = cellules stromales de la moelle.

### iii. Connexines et développement du tissu osseux

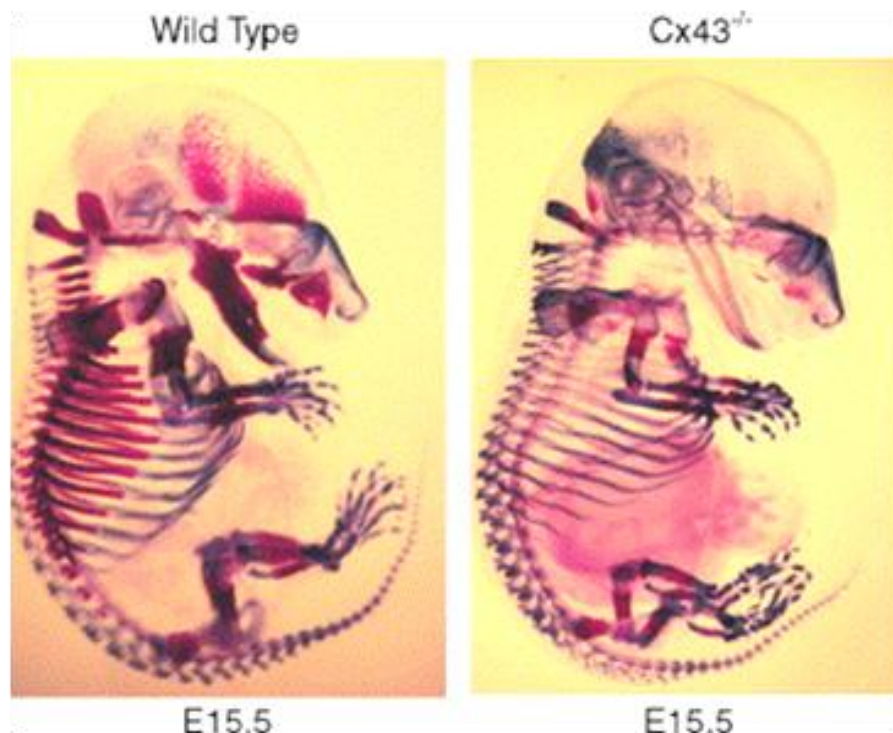
Comme cela a pu être précisé précédemment, l'utilisation de modèles de génétique expérimentale a permis de démontrer que les jonctions communicantes de type GAP et les Connexines jouent un rôle majeur dans le développement du squelette.

Plusieurs modèles expérimentaux ont confirmé ces données : au niveau embryonnaire, il a été montré que l'expression de la Cx43 est représentée comme étant spatialement et temporellement régulée dans le développement du poussin (194). L'inhibition de l'expression de la Cx43 dans l'embryon de poulet par des oligonucléotides antisens entraîne une malformation des membres, confirmant le rôle fondamental de la Cx43 dans le développement des membres.

Dans ce même sens, l'ossification endochondrale dermique de la voûte crânienne est retardée dans les embryons invalidés pour le gène de la Cx43. Ces animaux montrent également un retard d'ossification des vertèbres, de la clavicule, des côtes et des membres, ce qui suggère un rôle des jonctions GAP dans le maintien de la fonction des ostéoblastes et le développement du squelette.

Chez le poisson zèbre, la mutation de la Cx43 induit un phénotype tel que les nageoires apparaissent plus fines (195).

Des souris transgéniques surexprimant le miR206, ayant pour cible la Cx43, présentent un phénotype osseux altéré dû à l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes (**Figure 38**). La restauration de l'expression de la Cx43 dans les ostéoblastes exprimant le miR206 permet de retrouver leur capacité à se différencier (196). Ces dernières données suggèrent que l'inhibition de l'expression de ce micro-ARN pourrait fournir une stratégie thérapeutique pour traiter les maladies osseuses causées par une carence en Cx43 ou par une activité des jonctions GAP et/ou des hémicanaux diminuée.



**Figure 38. Phénotype osseux des souris sauvages et  $Cx43^{-/-}$ . D'après (197).**

Retard d'ossification des souris invalidées pour le gène de la Cx43. Une coloration au Bleu Alcian et Rouge Alizarine des embryons de souris à E15.5 montre que les souris déficientes en Cx43 ont un retard important dans l'ossification de la plupart des structures cranio-faciales, y compris des os de la voûte crânienne, des os de la mâchoire du crâne, ainsi que du squelette axial et appendiculaire. La coloration au Bleu Alcian permet d'identifier le tissu cartilagineux. La coloration rouge est plus spécifique d'un tissu minéralisé.

Chez l'homme, on retrouve des modifications d'ordre squelettique dans le cas de la dysplasie oculo dento digitale (ODDD). Les signes cliniques sont principalement une syndactylie des mains et des pieds, une hypoplasie ou aplasie des phalanges et des anomalies cranio-faciales causées par plus de 24 mutations différentes dans le gène de la Cx43 (198).

### C. Les différents rôles des Pannexines

Au cours de ces dernières années, les travaux de la littérature ont montré que les Panxs étaient impliquées dans une grande variété de processus physiologiques et physiopathologiques. Elles sont à ce jour considérées comme des acteurs majeurs de la communication purinergique extracellulaire. Mais les Pannexines peuvent aussi avoir des rôles plus précis et exercer une action spécifique sur un tissu donné.

#### i. Pannexines et tissu osseux

Au niveau cellulaire, les cellules ostéogéniques sont les rares cellules à exprimer la Panx3. Les cellules ostéoprogénitrices en culture expriment la Panx3 lorsqu'elles sont en cours de différenciation et de minéralisation de leur matrice extracellulaire (199). Au niveau tissulaire, l'immunohistochimie révèle une forte expression de Panx3 lors de l'ossification

endochondrale ainsi que pendant l'ossification membranaire. Une analyse plus approfondie sur les os longs révèle que les chondrocytes de la plaque de croissance expriment également la Panx3 au stade hypertrophique. Le facteur de transcription Runx2/Cbfa1 est un régulateur clé du gène de la Panx3 pendant l'ostéogenèse (200), et des études de surexpression et de sous-expression ont montré que les ostéoblastes et les chondrocytes en culture requièrent l'activité de la Panx3 pour initier et achever leur différenciation.

La Panx1 a également été détectée dans les ostéoblastes, bien que son rôle n'ait pas encore été exploré dans ces cellules (201).

## ii. Pannexines et morphologie cellulaire

Des données de la littérature démontrent le rôle de la Panx1 sur la morphologie cellulaire. Par exemple, la surexpression dans une culture de cellules de gliome C6 a pour conséquence l'étalement des cellules sur son substrat (202). Les cellules C6 surexprimant la Panx1 ont tendance à avoir un cytosquelette d'actine plus développé (203). Ces événements pourraient être liés à des interactions entre l'extrémité C-terminale de la chaîne intracellulaire de la Panx1, le réseau d'actine, et la protéine de nucléation de l'actine Arp3.

Si la Panx1 est capable de faciliter la nucléation et/ou la stabilisation des fibres d'actine, sa présence à la surface de la membrane plasmique pourrait réguler la migration cellulaire.

Les Panxs sont également impliquées dans le développement des neurites et des cellules neuronales en culture. Bien que la différenciation neuronale s'accompagne de l'expression des Panxs, il reste difficile d'établir un lien direct entre neuritogenèse et activité des Pannexines.

## V. L'ingénierie tissulaire et les applications précliniques et cliniques

Dès lors que les études *in vitro* donnent des résultats intéressants d'un point de vue biocompatibilité et bioactivité des produits d'ingénierie tissulaire, ces derniers doivent être évalués dans des modèles expérimentaux avant d'être utilisés en clinique chez l'humain.

Le modèle expérimental doit être pertinent pour mimer la situation pathologique, reproductible, il doit présenter un coût « raisonnable », répondre à un besoin clinique et être le plus approprié pour mimer la situation pathologique (204).

En 2008, l'Union européenne a référencé les différents modèles expérimentaux utilisés dans le cadre des études scientifiques (**Figure 39**). Les modèles chez les poissons et les oiseaux représentent environ 15%, les cochons d'Inde, les lapins et les hamsters environ 5%, les chevaux, les singes, les cochons et les chiens, moins de 1%. Les modèles murins constituent environ 77% des modèles utilisés.

Enfin, toutes les expérimentations doivent faire l'objet d'une demande d'autorisation préalable auprès du comité d'éthique de chaque université. Ce comité est chargé d'examiner les protocoles, de vérifier que ces derniers respectent les termes de la charte d'éthique, de la réglementation nationale et de la réglementation internationale. Ce comité peut formuler des recommandations en vue d'une meilleure prise en compte du bien-être animal.

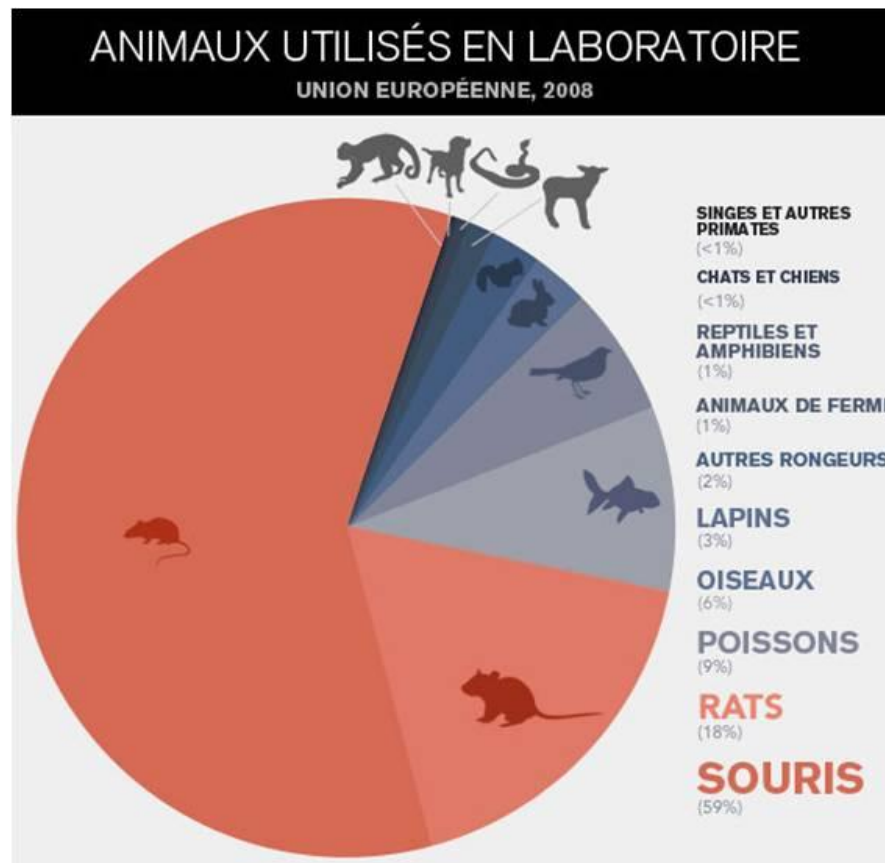
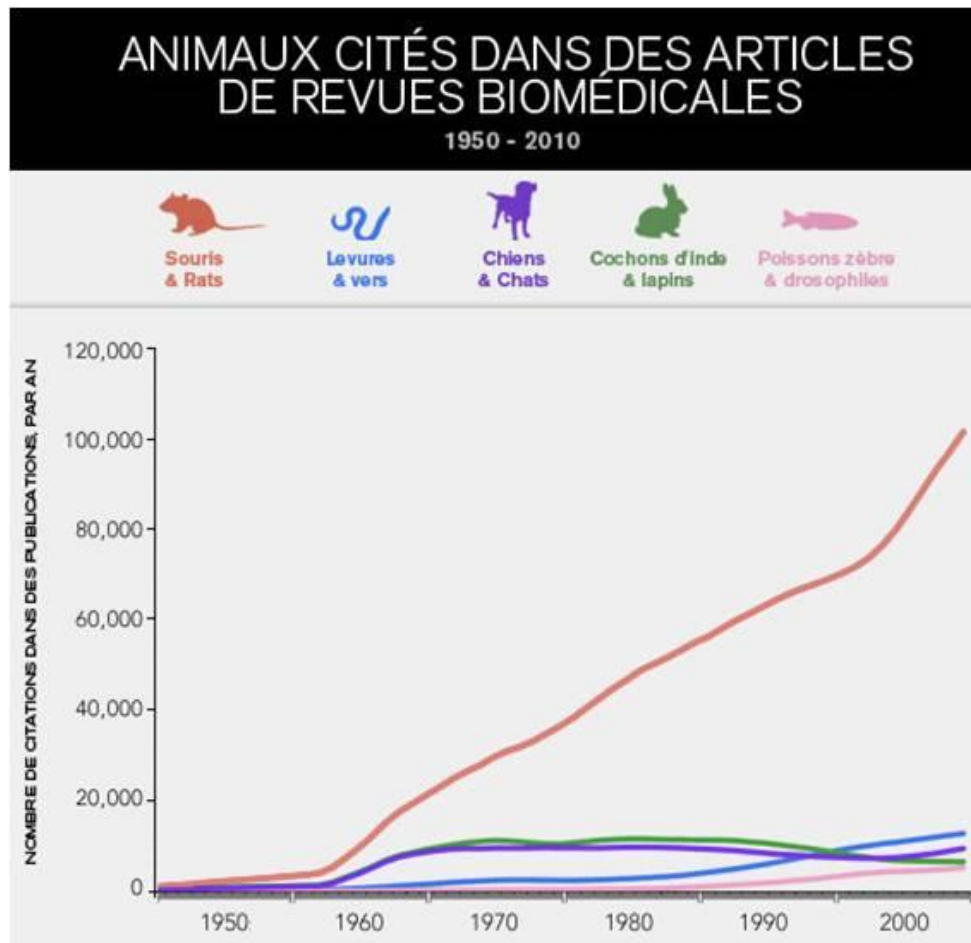


Figure 39. Les différents modèles d'études utilisés en expérimentations animales (<http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire>).

### A. Les modèles animaux et leurs caractéristiques

Les études précliniques chez l'animal permettent d'approcher au mieux les considérations biologiques et physiologiques qui vont influencer les études cliniques chez l'homme. Le nombre de publications témoignent que l'expérimentation animale ne cesse de croître depuis quelques années, principalement avec l'utilisation des modèles murins (**Figure 40**).

En ingénierie tissulaire et plus particulièrement dans le domaine de la régénération osseuse, les approches expérimentales sont classées en deux catégories. La première concerne l'étude de la biocompatibilité des matériaux, la deuxième porte sur la fonctionnalité de la matrice. Dans le premier cas, il n'est pas nécessaire d'avoir un environnement tissulaire qui reproduit à l'identique les conditions biologiques et biomécaniques d'une situation clinique. En revanche dans le deuxième cas, une simulation du contexte clinique où le produit d'ingénierie tissulaire sera placé est nécessaire.



**Figure 40. Nombre de publications scientifiques citant un modèle animal entre 1950 et 2010 (<http://www.slate.fr/story/51209/souris-laboratoire>).**

En chirurgie orthopédique ou en chirurgie orale, les lésions osseuses de taille critique ne représentent pas les cas majoritaires. Il est donc important d'avoir une corrélation entre les besoins cliniques chirurgicaux et le modèle animal qui sera utilisé en laboratoire, aussi bien au niveau du site et de son anatomie, de la réparation osseuse qui pourrait être sollicitée, que des contraintes mécaniques requises et des conditions de remodelage du tissu.

## i. Considérations biologiques

### (1) Anatomique

Les spécificités anatomiques des sites à réparer conditionnent les procédures chirurgicales dans les essais précliniques. En chirurgie maxillo-faciale, les lésions au niveau mandibulaire ne sont pas possibles chez le lapin et les rongeurs en raison d'une ouverture très limitée de leur bouche.

La forme des os et leur taille conditionnent aussi le type d'implantation en fonction des techniques chirurgicales à utiliser. Les chiens, les moutons/brebis et les cochons présentent des os larges et sont plus appropriés pour des validations précliniques avant le transfert clinique. Les modèles expérimentaux au niveau de la calvaria sont utilisés préférentiellement

dans le cadre des cranioplasties. Les lésions dans les métaphyses/diaphyses sont utilisées principalement pour des applications de comblement ou de lésions segmentaires dans les os longs.

## (2) Physiologique

La réparation et le remodelage osseux sont dépendants de l'espèce, de l'âge et de la charge mécanique appliquée à l'os.

Le taux de réparation osseuse est inversement proportionnel à la position sur l'arbre phylogénétique. Par exemple, la capacité de réparation osseuse est nettement supérieure chez les rongeurs et les lapins que chez les autres espèces animales. Par ailleurs, il existe aussi de grandes variations au niveau du remodelage osseux. Les lapins, chats, chiens, cochons et primates non humains présentent un remodelage de l'os cortical de type Haversien contrairement aux rongeurs. Le remodelage de l'os cortical chez les lapins est deux fois plus rapide que chez les chiens et trois fois plus rapide que chez l'homme. Le choix de l'espèce est donc fondamental pour ce qui est du remodelage osseux mais aussi vis-à-vis de la résorption du matériau implanté, celle-ci peut varier en fonction de l'espèce. Par exemple, la résorption est plus lente chez le mouton que chez la chèvre pour un animal de taille similaire.

De même, l'âge de l'animal est un critère à prendre en considération. Les animaux jeunes ont des capacités de régénération osseuse supérieures aux animaux adultes. Il est donc préférable, pour une meilleure reproductibilité, d'utiliser des animaux adultes, chez qui les plaques de croissance des épiphyses ne sont pas en cours de développement. Les rongeurs comme les souris et les rats font exception à cette règle car leur croissance osseuse se poursuit tout au long de leur vie.

Pour finir, les contraintes mécaniques sont tout aussi importantes à prendre en compte, une baisse de la charge mécanique sur une partie du squelette (par exemple suite à la pause de fixateur interne lors de résection segmentaire) peut entraîner une diminution du remodelage osseux.

## (3) Biomécanique

Les propriétés mécaniques de l'os à reconstruire sont aussi variables d'une espèce à l'autre. Il faut prendre en compte la géométrie de l'os en coupe transversale, la proportion relative entre os cortical et os trabéculaire, le degré de minéralisation et le remodelage Haversien.

La biomécanique osseuse est corrélée avec la forme de l'os et la fonction de l'os. Celle-ci dépend de la taille de l'animal ainsi que de son style de vie. Un chargement mécanique spécifique approprié au besoin clinique identifié doit donc être pris en compte dans la démarche expérimentale et le choix du modèle animal.

#### (4) Métabolique

La physiologie osseuse est partiellement conditionnée par le métabolisme des œstrogènes. De ce fait, pour une étude expérimentale dans une situation physiologique normale, il est préférable d'utiliser des mâles afin de diminuer au maximum la variabilité de ces études. Les modèles d'ovariectomie pour mimer l'ostéoporose humaine sont l'exception à cette règle, sachant que les souris, les rats et les brebis sont couramment utilisés dans ce cadre. Le degré d'ostéoporose obtenu est dépendant de l'espèce, même si on peut souligner que l'ostéopénie chez des singes ovariectomisés est modérée par rapport au remodelage osseux observé chez les rats. De plus, les primates reproduisent des changements précoces post-ménopause dans la biologie du squelette mais ils ne reproduisent en aucun cas les troubles chroniques de l'ostéoporose post-ménopause.

#### (5) Génétique

Une uniformité génétique est nécessaire dans le cas d'études avec implantation de tissu ou de cellules. Les rongeurs hybrides, les lapins blancs de Nouvelle Zélande, les « micropigs » du Yucatan et les souris immunodéprimées (SCID, NUDE ou NOG) sont utilisés dans ces cas-là.

Par ailleurs, des animaux sélectionnés génétiquement pour développer des pathologies osseuses spécifiques peuvent être utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. A titre d'exemple nous pouvons citer les souris SAM (pour « senescence-altered mouse ») qui ont une sénescence accélérée et qui sont utilisées pour étudier l'ostéoporose.

##### ii. Considérations techniques

#### (1) Reproductibilité des modèles expérimentaux

Une étude doit être composée au minimum de trois groupes, le premier avec des animaux opérés, groupe dits de contrôle ou « sham », le deuxième groupe est constitué d'animaux traités avec un contrôle positif (greffe autologue par exemple) et le troisième groupe correspond aux animaux ayant reçu le produit d'ingénierie tissulaire ou biomatériau que l'on souhaite évaluer. Pour chacun des groupes, au moins 8 échantillons sont nécessaires pour une analyse statistique correcte et significative de l'expérimentation.

#### (2) Critères financiers

Les modèles animaux les plus utilisés sont les rongeurs et les lapins, mais l'inconvénient majeur reste le volume de matériau qu'il est possible d'étudier sur ces animaux de petite taille. Par contre, un grand nombre d'animaux peut être utilisé pour permettre la réalisation d'études préliminaires à moindre coût ainsi qu'une analyse statistique. Les modèles animaux de taille moyenne à grande sont beaucoup plus onéreux et demandent des conditions

d'hébergement, d'entretien et de soins beaucoup plus importantes. Ils restent cependant indispensables pour les études précliniques avant d'envisager tout essai clinique.

### (3) Ethique et modèles animaux

Les expérimentations *in vivo* doivent être effectuées uniquement quand des méthodes alternatives comme la culture de cellules ou d'organes ne permettent pas de répondre aux problèmes posés ni de les résoudre. Toutes les expérimentations animales doivent être faites par du personnel spécialisé, agréé et agrémenté. Les protocoles, ou saisines, sont évalués par un comité d'éthique et les études doivent être réalisées en accord avec la réglementation du pays.

### (4) Manipulation des modèles animaux

Le choix de l'animal doit prendre en compte la manipulation et la faisabilité des soins post-opératoires. Si des animaux de taille importante sont nécessaires, l'utilisation de mouton/brebis est préférable par rapport aux cochons qui sont plus difficiles à manipuler et à confiner pour un suivi longitudinal sur 6 mois (temps d'analyse pour un suivi de la reconstruction osseuse). Par ailleurs, si l'utilisation de fixateurs externes s'avère nécessaire, comme dans le cas de la réparation de lésions segmentaires, il est préférable de réaliser cette étude chez des animaux qui sont hébergés dans un environnement propre, comme le chien, la brebis ou la chèvre.

Les caractéristiques physiques du matériau doivent également être prises en considération, notamment son aspect injectable ou non. Un matériau sous forme de pâte ou de gel doit être mis en place dans une cavité close afin de limiter la diffusion dans les tissus environnants. D'un autre côté, les matériaux sous forme de poudre/granule ou dans des supports massifs doivent être maintenus sur le site par un système de contention pour rester dans des conditions mécaniques optimales et non variables.

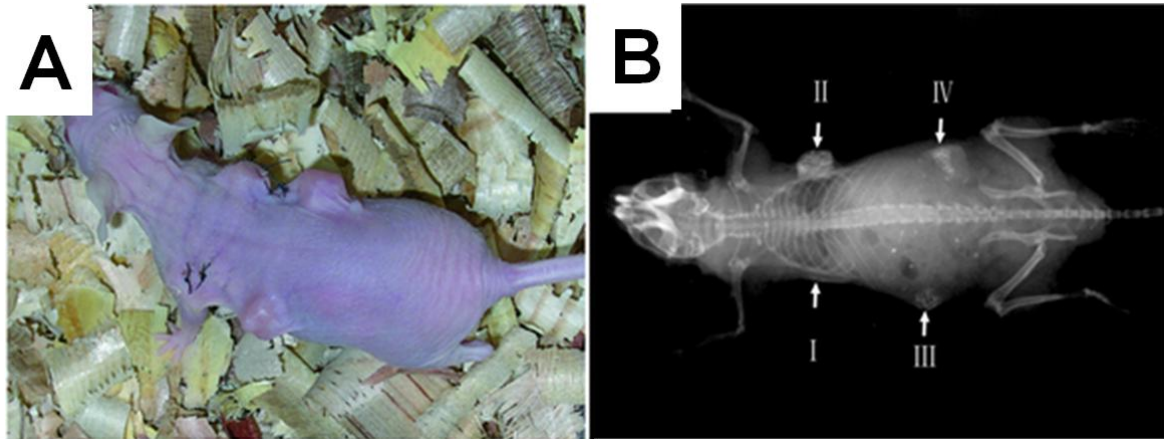
Pour finir, le choix des méthodes d'analyses pour un suivi longitudinal du modèle animal doit être défini selon le site d'implantation. Par exemple, l'imagerie intra vitale ne sera pas possible au-delà d'une certaine profondeur, ou encore l'utilisation de plaques métalliques empêchera les techniques d'IRM ou de radiographies.

## **B. Les sites d'implantation et leurs fonctions**

### **i. Ectopique**

Les implantations en site ectopique, en sous-cutané (S-C) ou en intramusculaire (I-M) vont permettre d'étudier la biocompatibilité, le potentiel ostéogénique et ostéoinducteur d'un biomatériau, ou encore la réaction inflammatoire associée à l'implantation du matériau. Ces implantations en site ectopique pourront être réalisées chez :

- la souris Nude (S-C) (**Figure 41**) (112),
- la souris SCID (S-C) (205),
- le rat Wistar (I-M) (206),
- ou encore chez un gros animal tel que la chèvre Néerlandaise (I-M), en créant de multiples poches intramusculaires pour l'implantation de matériaux (207).



**Figure 41. Implantation d'un biomatériau en sous-cutané chez une souris Nude. D'après (208).**

A ; Photographie d'une souris Nude avec deux implants sous la peau de chaque flanc. B ; Radiographie 12 semaines après implantation.

## ii. Orthotopique : Le modèle de la calvaria

Les implantations en site orthotopique permettent d'évaluer l'ostéoconductivité et l'ostéointégration des produits d'ingénierie tissulaire, ainsi que leur biointégration dans le microenvironnement de l'os. Le modèle de lésions osseuses réalisées dans la calvaria de rat est la technique la plus utilisée, de par une grande reproductibilité du modèle, la présence de peu de moelle osseuse, un faible apport sanguin, une mise en œuvre assez simple du modèle et parce qu'elle présente une morbidité réduite.

Les tailles des lésions osseuses peuvent varier d'un modèle à l'autre.

Dans le cas des modèles murins, les matériaux sont généralement implantés chez des souris immunodéficientes (BALB/c-nude, de 7 semaines) dans une lésion circulaire de 4 mm de diamètre et 1 mm de profondeur, produite dans l'os pariétal. Les implants sont retirés généralement après 8 semaines pour les analyses (209).

Des souris SCID (210) de six à huit semaines (CB-17-SCID) sont aussi utilisées pour recevoir l'implantation des matériaux. Les lésions crâniennes de 4,3 mm de diamètre et 1,5 mm de profondeur sont réalisées sur un côté de l'os de la voûte crânienne. Six semaines après l'intervention chirurgicale, les implants sont généralement retirés pour analyses.

Les lésions crâniennes chez le rat Wistar (**Figure 42**) ou chez le rat Nude (175-200 g) sont généralement (211) des défauts circulaires de 8,5 mm de diamètre dans le crâne de rat, et de 1,5 à 2 mm d'épaisseur. Les implants sont analysés au bout de 6 et 12 semaines.

Des lapins de Nouvelle-Zélande (212) de 6 mois pesant entre 3,9 et 4,4 kg peuvent être utilisés pour ce type de modèle ectopique. Deux fentes circulaires (diamètre intérieur de 9 mm et 0,5 mm de profondeur) sont réalisées dans l'os pariétal sur chaque côté de la suture sagittale médiane du crâne. Au bout de 4 semaines d'étude, les implants sont retirés.



**Figure 42. Implantation d'un biomatériau au sein d'une lésion osseuse de la calvaria de rat Wistar. D'après (213).**

A ; Photographie d'un rat Wistar lors de l'opération pour la formation du défaut circulaire en calvaria.  
B ; Radiographie après implantation.

Dans un modèle de « gros animal », les chèvres Dutch (214) de 1 an peuvent être utilisées, mâles ou femelles, avec des poids allant de 15 à 18 kg. Des lésions circulaires sur le crâne de 22 mm de diamètre et de 2 mm de profondeur sont réalisées entre les deux cornes et le matériel préparé peut être déposé dans la lésion osseuse sans fixation. Les échantillons sont prélevés à partir de 12 semaines après la chirurgie.

De manière générale, quels que soient les modèles utilisés, ce modèle de calvaria ne peut répondre à tous les critères physiologiques de la reconstruction osseuse. Ce site n'étant pas soumis à des contraintes mécaniques, le remodelage osseux reste modéré.

### iii. Orthotopique : Implantation au niveau des os longs

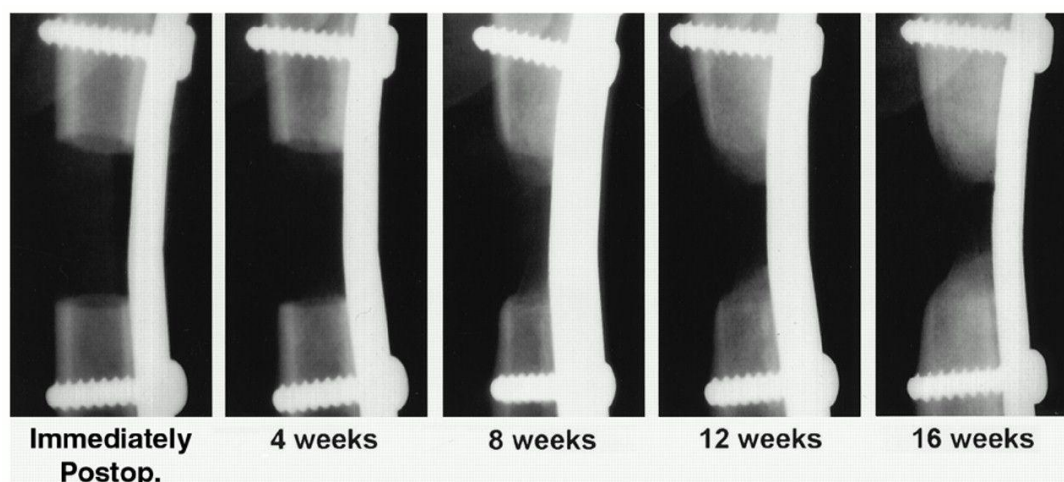
Des études expérimentales ont démontré qu'une lésion segmentaire faisant 1.5 fois la taille du diamètre de la diaphyse empêche la régénération osseuse et peut être proposée pour un modèle d'étude expérimentale. Ces lésions segmentaires nécessitent la plupart du temps une fixation externe ou interne. Un problème majeur cependant reste le degré de charge mécanique à appliquer au niveau de cette lésion, qui est très dépendant du dispositif de fixation entre les deux segments d'os encadrant la lésion. Les modèles expérimentaux utilisant ce type de lésions osseuses ont été décrits du petit au gros animal.

Chez des souris BALB/c (157) mâles âgées de 10 à 15 semaines, un segment d'os de 0,4 cm de long est enlevé de la diaphyse fémorale. Une aiguille de calibre 26 gauge est utilisée comme broche de fixation avec une assise dans la métaphyse opposée. Ce support intègre le fémur proximal, la greffe et le fémur distal. Après 6 semaines, les greffes sont récupérées pour une évaluation histologique.

Chez des rats Lewis, pesant entre 200 g et 250 g (215), la taille d'une lésion critique est un segment long de 0,8 cm sur l'os fémoral. Une broche intramédullaire de métal est insérée pour fixer la greffe dans les métaphyses opposées, par ancrage dans la cavité médullaire. Après 6 semaines, les fémurs implantés sont récupérés pour analyses.

Chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande (216) de 10 mois pesant de 1,8 à 2,2 kg, une lésion osseuse de 1,5 cm (qui inclut le périoste) peut être créée au niveau de l'ulna. Le radius est laissé intact pour assurer la stabilité mécanique. Les lapins sont généralement sacrifiés au bout de 16 semaines après l'intervention chirurgicale.

Dans le cas des modèles animaux de grande taille, il est possible d'utiliser des chèvres « chinoises » (217) de 12 mois pour lesquelles une lésion de 3 cm de long est effectuée sur la diaphyse tibiale. Une plaque d'acier est ensuite fixée pour assurer la stabilité de la lésion. Au bout de 12 à 24 semaines, les caprins sont sacrifiés et les lésions examinées. Il est également possible de faire ce type de défaut segmentaire chez le chien (**Figure 43**).



**Figure 43. Suivi longitudinal par radiographie d'une lésion segmentaire réalisée chez un chien. D'après (218).**

La brebis de Mérinos est également utilisée comme modèle animal de grande taille. Des moutons (219) âgés de 6 à 7 ans et pesant  $45 \pm 2$  kg subissent une lésion osseuse de 3 cm centrée sur le tibia. Les extrémités distales des plaques sont placées à 2,5 cm en amont de la malléole interne. La fixation d'une large plaque de compression dynamique (DCP) (4,5 mm, 10 trous) est utilisée pour éviter tout mouvement de la lésion. Les lésions osseuses sont généralement analysées après 12 semaines.

En conclusion, le choix du modèle expérimental dépend de l'ensemble des facteurs. Mais une démarche standardisée se détache dans l'ensemble. Dans tous les cas, ces modèles doivent répondre à une question préclinique ou clinique donnée.

### **C. Les méthodes d'investigation du tissu osseux néoformé**

En ingénierie tissulaire osseuse et plus particulièrement dans les études expérimentales, le choix des méthodes d'investigation est un élément important pour répondre aux questions posées : biodégradabilité ? Ostéointégration ? Devenir des cellules implantées ? Vascularisation du matériau ? Ces méthodes sont décisives pour la suite à donner dans les expérimentations. Elles doivent permettre le suivi des cellules implantées, celui du devenir de la matrice osseuse et l'étude des interactions matériau-tissu. Elles devront rendre possible le suivi des modifications tissulaires : perte ou gain de tissu, ou bien changement de la composition tissulaire. Par ailleurs, il sera nécessaire de caractériser la présence ou non d'une réaction inflammatoire et de la quantifier.

Il existe de nombreuses méthodes invasives et non invasives, destructrices ou non destructrices. Les études précliniques nécessitent de plus en plus de réaliser un suivi longitudinal pour étudier la chronologie de la réparation osseuse. Mais l'histologie et l'histomorphométrie sont les seules méthodes qui permettront une analyse au niveau cellulaire.

En effet, élaborée en 1959, la règle des 3 R constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Les 3 R sont : Réduire le nombre d'animaux en expérimentation, raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") et remplacer les modèles animaux.

Pour l'ensemble de ces raisons, les méthodes non invasives et/ou non destructrices de mesure sont des approches expérimentales privilégiées pour analyser le tissu néoformé des études précliniques et cliniques.

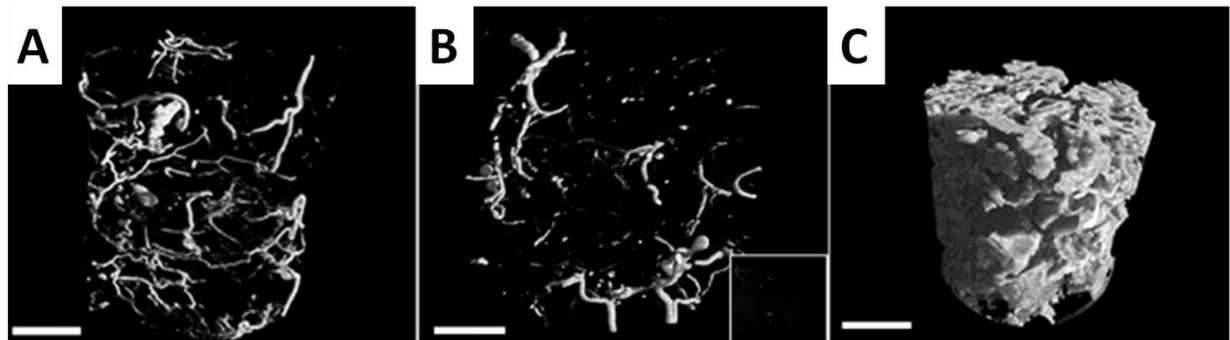
#### **i. Techniques non invasives**

##### **(1) Microtomographie aux rayons X**

La méthode la plus utilisée, pour mettre en évidence la formation osseuse au sein d'un implant, 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 en 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 rend possible un suivi longitudinal de l'évolution de la minéralisation et offre une résolution d'environ 50  $\mu\text{m}$  pour la microtomographie *in vivo* et de 8  $\mu\text{m}$  pour la microtomographie *ex*

*vivo*. Les quantifications morphologiques peuvent être corrélées avec l'histomorphométrie conventionnelle réalisée sur des coupes histologiques décalcifiées (220).

La microtomographie aux rayons X (**Figure 44**) peut être également une technique d'analyse de la vascularisation des biomatériaux implantés, à l'aide d'un agent de contraste préalablement injecté dans le sang. Dans la **Figure 44** il s'agit d'un polymère radio-opaque à base de chromate de plomb (221). Ce type d'imagerie de la vascularisation présente des limites pour certains sites d'implantation et certains types de matériaux.



**Figure 44. Analyse de la vascularisation au sein d'un biomatériau par microtomographie aux rayons X. D'après (221).**

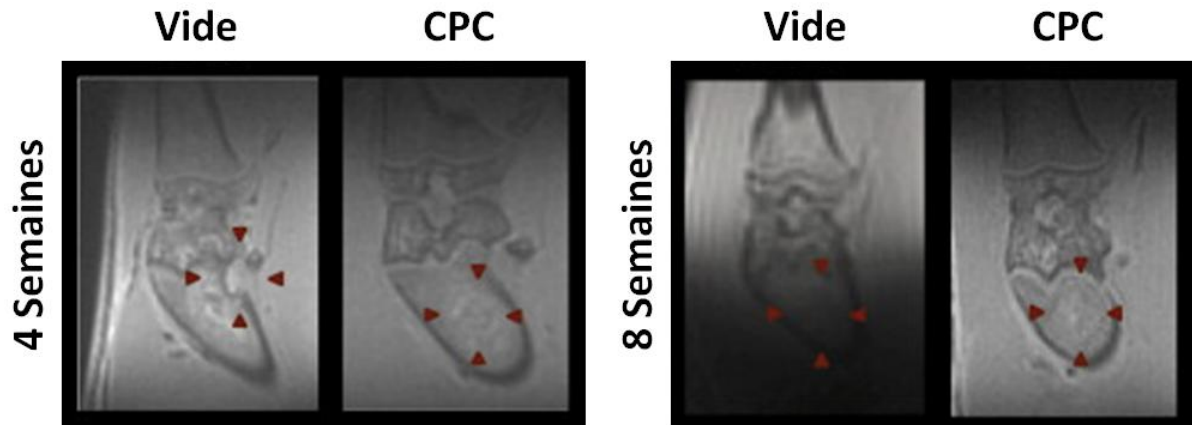
A et B ; Visualisation en  $\mu$ CT de la vascularisation d'un implant après reconstruction 3D. C ; Visualisation de la minéralisation d'un implant en  $\mu$ CT après reconstruction 3D.

## (2) Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est une technique d'imagerie non invasive, non irradiante et résolutive, basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN). L'IRM permet d'obtenir une reconstruction tridimensionnelle de la zone d'intérêt dans laquelle il est possible de distinguer le signal de l'os par rapport au signal des tissus mous environnants (**Figure 45**).

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 (222). De cette façon, il est possible de suivre le devenir des cellules au sein de la structure tridimensionnelle après implantation pendant plusieurs jours.

La technique d'IRM permet également de visualiser la présence d'une réaction inflammatoire suite à l'implantation d'un biomatériau (223).



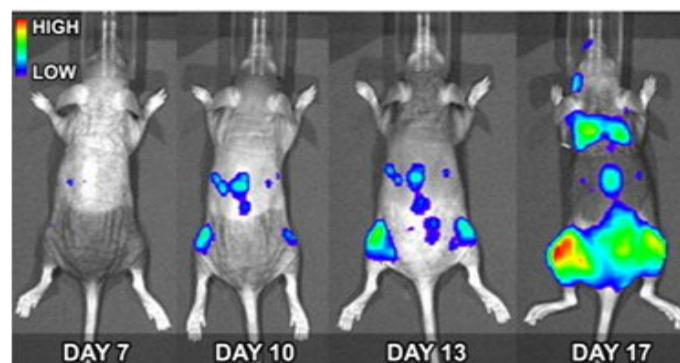
**Figure 45. Imagerie par IRM d'une lésion osseuse réalisée au niveau du condyle fémorale chez le rat. D'après (224).**

Images représentatives de lésions réalisées au niveau du condyle fémoral de rat, après 4 et 8 semaines d'implantation. Deux groupes expérimentaux sont réalisés dans cette étude : l'un avec une lésion vide et l'autre avec une lésion comblée avec du ciment de phosphate de calcium (CPC). Les flèches rouges indiquent l'emplacement de la lésion.

### (3) Suivi des cellules humaines implantées

La bioluminescence est une technique non invasive qui va permettre d'observer les cellules implantées, préalablement transfectées par le gène codant pour la luciférase, la Green Fluorescent Protein (GFP) ou encore la Td-Tomato.

Pour ce type d'imagerie, il faut injecter au préalable la luciférine dans l'animal, qui va se complexer à la luciférase et va s'oxyder, provoquant l'émission d'un photon (**Figure 46**). La production de luminescence par les cellules va être détectée et quantifiée par un capteur photonique. Cette méthode peut permettre de suivre le devenir des cellules dans le temps. Elle permet d'apprécier en particulier le taux de prolifération cellulaire *in vivo*, l'intensité de luminescence étant proportionnelle au nombre de cellules. Cependant, cette technique peu résolutive n'offre pas de visualisation tridimensionnelle de l'objet, ni d'analyse de la formation osseuse.



**Figure 46. Visualisation de la bioluminescence de cellules exprimant la luciférase hébergées dans une matrice 3D, à différents temps d'implantation chez une souris Nude. D'après (225).**

Des cellules humaines de cancer du sein exprimant la luciférase sont suivies au niveau du site de fixation des métastases dans les condyles osseux par injection intracardiaque de luciférine.

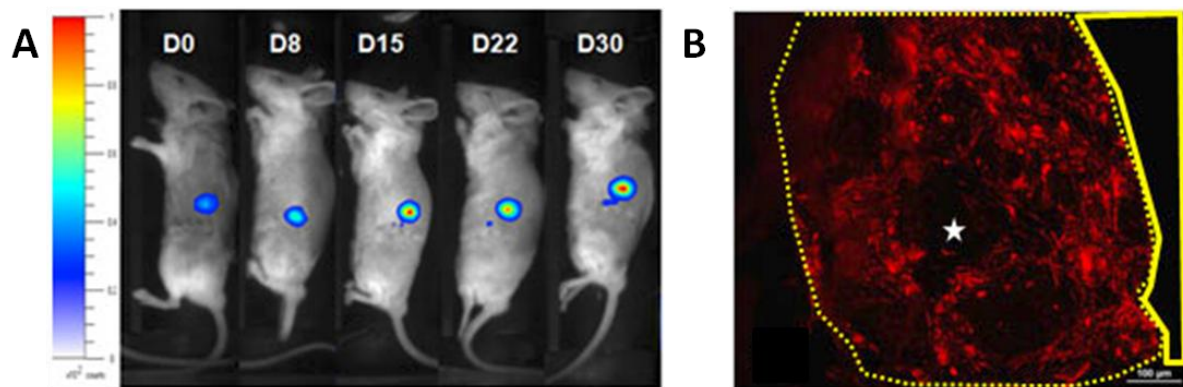
Plusieurs types de marquages peuvent être utilisés pour distinguer les cellules implantées des cellules du tissu hôte :

Si elles sont préalablement transfectées par le gène codant pour la GFP ou la Td-Tomato (**Figure 47**).

Par hybridation *in situ* qui permet par exemple de mettre en évidence des séquences génomiques spécifiques de l'espèce considérée.

Par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps spécifique de la séquence *ALU*. 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, spécifique de l'Homme et des primates proches dans l'évolution.

Une autre méthode consiste à détecter l'antigène HLA spécifique des cellules humaines par immunomarquage.

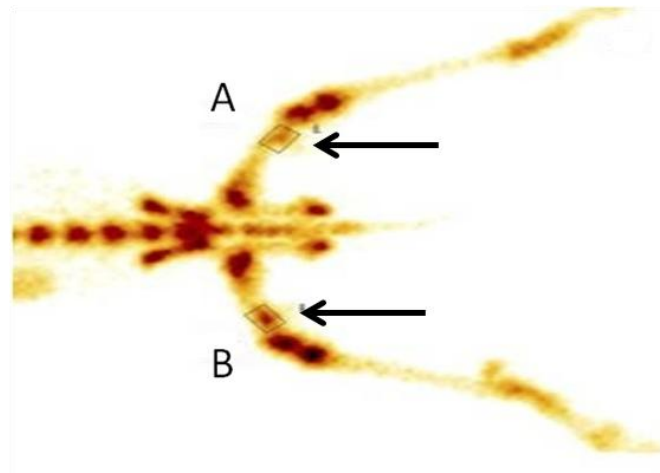


**Figure 47. Visualisation d'ADSCs-Tdtomato hébergées dans une matrice implantée en sous-cutané à différents temps d'implantation. D'après (226).**

A : Imagerie, au photon imageur, de cellules issues du tissu adipeux (ADSCs) exprimant de façon constitutive la Td-Tomato, pendant 30 jours. Les ADSCs-Td-Tomato sont ensemencées dans un biomatériau en site sous-cutané chez des souris NOG. B : Coupe histologique du biomatériau présentant les ADSCs-Td-Tomato après 30 jours d'implantation. L'étoile indique le matériau sur une coupe histologique observée en microscopie à fluorescence.

#### (4) Tomographie d'émissions monophotonique (TEMP)

La tomographie par émission monophotonique (TEMP) est une autre technique permettant également 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 radiotraceur, de par ses propriétés chimiques, est choisi pour se fixer sélectivement dans le tissu. Le technétium 99 métastable (<sup>99m</sup>Tc) est un radio-isotope utilisé en imagerie osseuse, il s'accumule dans la phase organique de l'os et permet de visualiser la croissance osseuse (**Figure 48**).



**Figure 48. Analyses postopératoires de la structure osseuse au TEMP. D'après (227).**

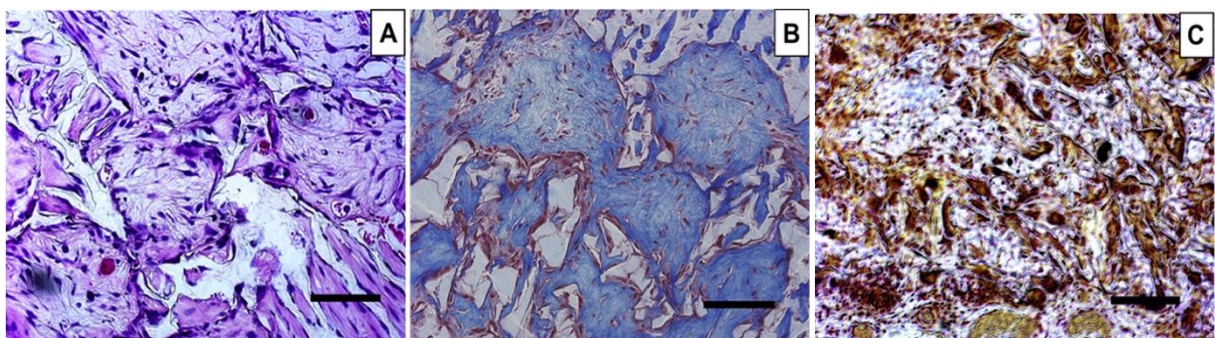
Analyse TEMP, après injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -méthylène diphosphonate ( $^{99m}\text{Tc}$ -MDP), à 12 semaines postopératoires chez une souris Nude. (A) BMSCs associées à du  $\beta$ -TCP, (B) BMSCs associées à du  $\beta$ -TCP mis en place à proximité d'un vaisseau.

Ce type d'imagerie présente un certain nombre de limites, tant à cause de sa résolution limitée que par la gestion compliquée de la technique.

## ii. Techniques invasives

### (1) Histologie

L'histologie est l'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer de façon qualitative et quantitative 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 Hématoxyline & Eosine (H&E) révèle les noyaux des cellules en bleu-noir, leur cytoplasme ainsi que la matrice extracellulaire en rose (**Figure 49, A**). La coloration au trichrome de Masson permet de révéler la présence de tissus collagéniques en vert (**Figure 49, B**). Un marquage au Von Kossa sur des coupes en résine non décalcifiées fera ressortir la minéralisation de la MEC par une coloration noire (**Figure 49, C**).



**Figure 49. Différentes colorations réalisées sur des coupes histologiques de tissus osseux. D'après (228).**

A ; Coloration H&E sur des matériaux cellularisés après 8 semaines d'implantation en site sous-cutané. B ; Coloration au trichrome de Masson sur des matériaux cellularisés après 8 semaines

d'implantation en site sous-cutané. C ; Coloration au Von Kossa sur des matériaux cellularisés après 8 semaines d'implantation en site sous-cutané.

## (2) Histomorphométrie

Les aspects structuraux, architecturaux et cellulaires du tissu osseux peuvent être étudiés et quantifiés par l'histomorphométrie osseuse. Elle est basée sur l'analyse quantitative de coupes histologiques réalisées à partir de biopsies osseuses. Grâce aux techniques d'analyse d'image, il est possible de déterminer les paramètres représentatifs de la quantité et de la qualité du tissu osseux : nombre de travées, épaisseur, porosité et volume osseux.



## **OBJECTIFS**

Les données de la littérature concernant l'ingénierie du tissu osseux démontrent que les échecs rencontrés dans le domaine de la substitution osseuse guidée par les biomatériaux sont en partie liés à leur faible capacité de colonisation et à un défaut de vascularisation de ces implants. Les techniques d'implantation de cellules progénitrices dans un biomatériau de substitution osseuse ont toutefois ouvert une voie de développement de thérapeutiques substitutives à la pratique de l'allogreffe et de l'hétérogreffe dont les limitations ont été présentées.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier le comportement des cellules souches adultes dans un environnement 3D et le rôle de cette communication cellulaire au sein de cet environnement pour promouvoir la régénération osseuse.

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

➤ La première partie des résultats concerne la culture tridimensionnelle des HBMSCs dans une matrice macroporeuse de polysaccharides naturels à base de pullulane et de dextrane. Ce travail nous a permis d'étudier l'influence de la culture 3D sur l'établissement des jonctions intercellulaires. Nous nous sommes intéressés principalement aux Connexines 43 et aux Pannexines 1 et 3.

➤ La deuxième partie rapporte l'importance de la communication ostéo-endothéliale en 3D sur la différenciation ostéoblastique des HBMSCs. Ce travail a été réalisé à l'aide d'un modèle de co-culture de HBMSCs avec des EPCs humains. Outre les aspects *in vitro* de ces interactions cellule-cellule, nous nous sommes intéressés au devenir de la matrice de polymère colonisée par les deux types cellulaires après implantation en site ectopique chez le petit animal.

➤ Enfin, la dernière partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'intérêt d'utiliser la fraction totale de moelle osseuse humaine comme unique source multicellulaire, pour générer un tissu osseux vascularisé en 3D sans étape d'isolement ou d'expansion préalable à la construction du produit d'ingénierie tissulaire.

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Docteur Didier Letourneur au Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle à Paris (Unité Inserm 1148) et le Centre des Biomateriaux du New Jersey en collaboration avec le Professeur Joachim Kohn. Mes travaux de thèse ont été réalisés grâce au soutien d'une ANR «Technologies pour la Santé» (TECSAN) intitulée Matri+ et d'une bourse doctorale du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Les résultats de mes travaux sont articulés autour de trois articles présentés ci-après, suivis d'une discussion et des perspectives de travail.

**Article 1:**

**IMPLICATION DE LA PANNEXINE 1 ET 3 DANS LA COMMUNICATION ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE.**

J. Guerrero, H Oliveira, R. Aid, R. Bareille, D. Letourneur, Y. Mao, J. Kohn and J. Amédée.

*Soumis à ECM (Journal of European Cells and Materials)*

**Article 2:**

**INTERACTIONS CELLULAIRES ENTRE LES CELLULES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE ET DES PROGENITEURS ENDOTHELIAUX AU SEIN D'UNE MATRICE TRIDIMENSIONNELLE.**

J. Guerrero, S. Catros, S.M. Derkaoui, C. Lalande, S. Siadous, R. Bareille, N. Thébaud, L. Bordenave, O. Chassande, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée.

*Publié dans Acta Biomaterialia*

**Article 3:**

**L'UTILISATION DE LA FRACTION TOTALE DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE DANS UNE APPROCHE DIRECTE D'EXPANSION EN 3D POUR DES APPLICATIONS EN INGENIERIE DU TISSU OSSEUX : FOCUS SUR L'ANGIOGENESE ET L'OSTEOGENESE.**

J. Guerrero, H. Oliveira, S. Catros, S. Siadous, S.M Derkaoui, R. Bareille, D. Letourneur, J. Amédée.

*Publié dans Tissue Engineering Part A.*



## **RESULTATS**

# **I. Implication de la Pannexine 1 et 3 dans la communication et la différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine**

## **A. Introduction**

Ce travail a été mené en collaboration avec le laboratoire du Professeur Joachim Kohn, au New Jersey Center for Biomaterials (New Jersey, USA) au sein duquel j'ai pu effectuer un stage de 3 mois grâce à l'obtention d'une bourse de mobilité. Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux jonctions intercellulaires sollicitées en 3D à l'aide de cellules mésenchymateuses humaines associées à une matrice macroporeuse composée de polysaccharides naturels, le dextrane et le pullulane, matrice développée par l'Inserm U1148 (Paris).

**Le but de cet article a été d'étudier les Pannexines et plus particulièrement la Pannexine 1 et la Pannexine 3, leur localisation au niveau cellulaire, leur expression (protéique, génique) et leur fonction, dans deux modèles de culture, en deux dimensions (2D) et en trois dimensions (3D).**

## **B. Article 1 :**

### **Abstract**

Pannexins are a class of chordate channel proteins identified by their similarity to connexins, the gap junction proteins. The pannexin family consists of three members, Panx1, Panx2, and Panx3, and the role of these proteins in cellular processes is still under investigation. The roles of Pannexin large-pore ion and metabolite channels are becoming recognized in many physiological and pathophysiological scenarios. Using a polysaccharide-based macroporous matrix, able to increase multicellular interactions and to exhibit an appropriate 3D microenvironment for stem cells, we investigated the expression of Panx1 and Panx3 in human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs). This study shows that Panx1 is involved in 3D cell-cell organization of human stem cells and its role was demonstrated by using Probenecid (PBN) and the mimetic peptide 10panx1, which specifically blocks Panx1 channels. Panx1 is involved in the compaction of the cellular aggregates induced by this 3D matrix. We show Panx3 gene expression profile could correlate with those of osteoblastic markers. Taken together, our data suggests that 3D culture of HBMSCs, within polysaccharide-based macroporous scaffolds, induces Panx1 and Panx3 expression, in relation to 2D culture.

### **Keywords**

Human bone marrow mesenchymal stem cell; Pannexin 1; Pannexin 3; Osteogenesis; 3D microenvironment.

## Abstract

Pannexins are a class of chordate channel proteins identified by their similarity to connexins, the gap junction proteins. The pannexin family consists of three members, Panx1, Panx2, and Panx3, and the role of these proteins in cellular processes is still under investigation. The roles of Pannexin large-pore ion and metabolite channels are becoming recognized in many physiological and pathophysiological scenarios. Using a polysaccharide-based macroporous matrix, able to increase multicellular interactions and to exhibit an appropriate 3D microenvironment for stem cells, we investigated the expression of Panx1 and Panx3 in human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs). This study shows that Panx1 is involved in 3D cell-cell organization of human stem cells and its role was demonstrated by using Probenecid (PBN) and the mimetic peptide 10panx1, which specifically blocks Panx1 channels. Panx1 is involved in the compaction of the cellular aggregates induced by this 3D matrix. We show Panx3 gene expression profile could correlate with those of osteoblastic markers. Taken together, our data suggests that 3D culture of HBMSCs, within polysaccharide-based macroporous scaffolds, induces Panx1 and Panx3 expression, in relation to 2D culture.

## 1. Introduction

The establishment of multicellularity has required the development of novel forms of communication and interaction, as to allow the monitoring and permit the coordination of a group of cells. As such, novel structures have independently emerged in order to provide direct cell-cell communication within tissues, such as gap junctions.

The complex control of cell differentiation and synchronization that occurs during tissue development is mediated by the intercellular diffusion of signaling molecules through gap junctions. This exchange process occurs through channels comprising connexin proteins (Cx) [1] that span the plasma membranes of adjacent cells and facilitate the selective passage of water-soluble molecules ( $< 1.2$  kDa), such as ions, nucleotides, cellular messengers (e.g. cAMP and inositol 1,4,5-triphosphate), and secondary metabolites.

In bone tissue, gap junctional intercellular communication proteins are directly associated with the coordinated development and remodeling of the mineralized matrix components [2, 3]. In this context and with regard to the literature, connexin43 (Cx43) can be found in several types of bone cells (i.e. chondrocytes, osteoclasts, and osteocytes) and also in mesenchymal stem cells. Cx43 is most closely associated with the initiation of osteogenesis and bone formation [4]. The role of Cx43 in osteogenesis and bone formation has been demonstrated in vitro using 2D culture models of different osteoblastic cell lines [5] and in vivo using experimental models in mice [6].

Interestingly, another family of membrane proteins named pannexins (Panxs) was recently described to present similar characteristics of connexins [7]. Three members of this protein family have currently been described (Panx1, Panx2, and Panx3) [8]. Although the homology in the amino acid sequence of connexins and pannexins is very low (~16%), these proteins share a similar membrane topology [7], which includes four transmembrane domains, two

extracellular loops, a cytoplasmic loop, and intracellular amino and carboxyl termini [9]. Hitherto pannexins have been observed to form only hemichannels in physiological conditions, which provides an additional mechanism of hemichannel-mediated paracrine or autocrine signaling processes [10, 11].

Most studies have been obtained with cells cultured on conventional 2D surfaces, and have provided detailed information regarding their impact on the molecular basis of cell-to-cell contact. Nonetheless, three-dimensional (3D) cultures may offer a physiologically optimized environment for cell survival that can favor cell-to-cell interaction and cell functionality, over a 2D culture system. Indeed, the importance of a 3D environment to cell-cell communication, in skeletal development, has been established in models using human and mouse cells [12]. The cultivation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) in a 3D matrix environment is a basic prerequisite in order to generate newly formed bone tissue. The 3D environment has been shown to affect cell morphology, proliferation and the gene expression profile, in comparison to 2D cultivation [13]. In this sense, scaffolds present favorable physicochemical cues, and macro and microstructures, providing a relevant 3D microenvironment for the promotion of cell communication and cell differentiation. Indeed, several studies focusing on bone tissue engineering have shown the promotion in on bone cell differentiation when using polysaccharide-based matrices, such as pullulan [14]. These natural polymers hold promise for the regeneration of damaged tissues, since they are highly permeable and therefore facilitate the transport of nutrients and metabolites [15]. Indeed, matrices based on the natural hydrophilic polysaccharides pullulan and dextran have been shown suitable for cell therapy [16, 17], to induce endothelial cell attachment and sustain vascular cell growth [18], for culture of MSCs from adipose tissue [19] and more recently, for the co-culture of MSCs, from bone marrow, and endothelial progenitor cells (EPCs) from umbilical cord blood [20]. In this study, and following this rational, we focused on the use of these pullulan/dextran matrices in order to attain a 3D environment, relevant for cell communication studies.

Previous work revealed that Panx1 is expressed in a wide variety of tissues, with high levels of expression being detected in the heart, skeletal muscle, and testis. Panx1 has also been detected in osteoblasts [21, 22]. A recent study has shown that Panx1 channels, in concert with P2X7R, are likely to form a molecular complex that performs the hemichannel function in osteoblast mechanosignaling via an unidentified pathway, which does not require Cx43 [23]. Moreover, evidence has tightly linked Panx1 trafficking and function to the cytoskeleton, a multi-component network that provides critical structural support, transportation, and scaffolding functions in all cell types [24]. With regards to its function, evidence exists to support the role of Panx1 in the control of cellular morphology. Indeed, in C6 glioma cells it has been shown that an over expression of Panx1 has a flattening effect on the cells, with an increase of the surface area on the substrate [25]. Additionally, Panx1 over-expressing C6 cells show a more developed actin cytoskeleton [26], consistent with the report that Panx1 is a specific binding protein for actin [27].

Concerning Panx3 expression, it was been shown in the skin, cochlea, and in developing hard tissues such as cartilage and bone [21]. Immunohistochemistry analysis has shown Panx3 expression in bone derived from both endochondral ossification as well as intramembranous

ossification. Furthermore, others reports have described its expression in the prehypertrophic zone and in the perichondrium of the growth plate [28]. At cellular level, the expression of Panx3 is particularly present in osteogenic cells. Panx3 expression is evidenced in differentiated osteoblasts, able to mineralize their extracellular matrix [29]. Moreover, it has been shown that the transcription factor Runx2 is a key regulator for Panx3 gene expression during osteogenesis [28].

In spite of the evidence supporting the key role of Panxs in cell communication and function, only few studies have examined their implication in human cells [30, 31] and human physiology or disease [32, 33]. Indeed, no study has focused on the impact of Panxs in the differentiation of human mesenchymal stromal cells towards the osteoblastic lineage, in a 3D environment and in view of bone regeneration approach.

Hence, the main goal of this study was to determine the influence of both Panx1 and Panx3 in a 3D culture system of HBMSCs, in relation to 2D, focusing on their tridimensional rearrangement and on osteoblastic differentiation mechanism. Here, and by the use of Panx1 inhibitors we reveal new functions of this channels in human stem cells, relevant for bone tissue engineering applications.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Isolation and culture of human bone marrow mesenchymal stem cells**

Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (HBMSCs) were isolated from human bone marrow samples, as previously described [20]. Briefly, bone marrow was aspirated from the femoral diaphysis or iliac bone after obtaining consent from patients undergoing hip prosthesis surgery after trauma. Here, experiments were performed using 10 individual different samples of HBMSCs with an average donor age of  $66 \pm 11$  years. The study was approved by the local institutional review board. Cells were separated into a single suspension by sequential passages through syringes fitted with 16-, 18- or 21-gauge needles. After centrifugation for 15 min at  $800 \times g$ , the pellet was resuspended in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM; Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS; Gibco) before cell seeding in standard cell culture plates or within the scaffolds.

### **2.2 Preparation of three-dimensional (3D) macroporous scaffolds**

Macroporous scaffolds were produced using a blend of pullulan/dextran 75:25 (pullulan, MW 200,000, Hayashibara Inc; Dextran, MW 500,000, Sigma), prepared by dissolving 9 g of pullulan and 3 g of dextran into 40 mL of distilled water containing 14 g of NaCl, as previously described [34]. Chemical cross-linking was carried out using trisodium trimetaphosphate. Pores were created by a patented gas-foaming technique. Resulting scaffolds were cut into the desired shape, soaked in PBS, and then washed extensively with a 0.025 % NaCl solution. After freeze-drying, scaffolds were stored at room temperature until further use. Pore size and pore area were determined using Environmental Scanning Electron Microscopy and confocal microscopy (FITC-Labeled dextran scaffolds). Water content and swelling ratio were determined as previously described [34]. Scaffolds with 6 mm diameter, 2

mm thickness, 20 mm<sup>3</sup>, porosity  $68 \pm 3$  %, and pore size  $243 \pm 14$   $\mu$ m were used in this work [34].

### **2.3 Cell seeding in 2D cultures or within 3D macroporous scaffolds and cell viability evaluation**

Before cell seeding, dried scaffolds (6 mm in diameter, 2 mm thick) were sterilized by UV radiation for 30 min. For culture experiments, HBMSCs were cultured during 1 and 4 days in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with 10% (v/v) FCS. HBMSCs were seeded at  $15 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> within culture well plates, for the 2D culture, and  $4 \times 10^5$  cells/disk within the scaffolds, for the 3D culture. Cell viability in 2D and in 3D was assessed using the LIVEDEAD assay (Molecular Probes).

### **2.4 Cryo-sectioning of the cellularized 3D macroporous scaffolds**

At designated time points, cellularized matrices were rinsed four times with PBS (1X pH 7.4) and then fixed for 30 min with 4% (w/v) PFA at 4°C. The matrices were then included in gel freeze (Labonord). Sections of 10  $\mu$ m thickness were obtained using a cryostat (Leica CM 1850 UV).

### **2.5 Pannexin and Connexin43 immunocytochemistry**

HBMSCs cultured on 2D or within the 3D matrices, during 4 days, were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA), at 4°C for 30 min, and then permeabilized with Triton X 100 at 0.1% (v/v) for 30 min at 4°C. Then, samples were blocked during 1 hour in PBS 1X pH 7.4 (Gibco) containing 1% (w/v) BSA and then incubated with Pannexin1 antibody (1/100) (diluted in PBS 1X pH 7.4 with 0.5% (w/v) BSA, #sc-49695 Santa Cruz), or Pannexin3 antibody (1/100) (diluted in PBS 1X pH 7.4 with 0.5% (w/v) BSA, #433270 Invitrogen), or Connexin43 (1/250) (diluted in PBS 1X pH 7.4 with 0.5% (w/v) BSA, #MAB3068 Millipore) overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed in PBS 1X pH 7.4 and incubated with Alexa fluor 488-conjugated anti-goat (1/500) or anti-rabbit (1/500) or anti-mouse (1/500) IgG (#A-21222, #A-11070 and #A-21202, respectively; Molecular Probes) for 2 hours at room temperature. Cells were incubated with the nuclear probe DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, FluoProbes 5mg/ml, final dilution at 1:5000) for 30 min at room temperature to label the nucleus and were thereafter observed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i) equipped with a digital camera (Nikon Dxm 1200C).

### **2.6 Western Blot analysis**

Protein extracts we obtained by submitting cells, cultured for 1 and 4 days, in 2D or within the 3D scaffolds, to lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.7, 2 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 1% NP40 and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, for 45 min at 4°C. Samples were cleared by centrifugation (20 min at  $16\,000 \times g$ ) and the supernatant was assayed for protein concentration (BCA assay, Thermo Fisher Scientific). Protein extracts (20  $\mu$ g) were resolved by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10% (w/v) acrylamide) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P, Millipore). Membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline-Tween (TBS-T: 20 mM,

Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% FCS. Then, blots were probed with Connexin43 antibody (1/1000) (diluted in TBS-T pH 7.4 with 5% (w/v) BSA, #MAB3068 Millipore), or Pannexin1 antibody (1/100) (diluted in TBS-T pH 7.4 with 5% (w/v) BSA, #sc-49695 Santa Cruz) or Pannexin3 antibody (1/100) (diluted in TBS-T pH 7.4 with 5% (w/v) BSA, #433270 Invitrogen) or tubulin antibody (1/3000) (diluted in TBS-T pH 7.4 with 5% (w/v) BSA, #T5168 Sigma), overnight at 4°C. After washing, the secondary peroxidase-labeled anti-mouse antibody (1/15000) or anti-rabbit antibody (1/1000) or anti-goat antibody (1/1000) (diluted in TBS-T pH 7.4 with 5% (w/v) BSA, #115-035-146, #111-035-144 and #705-035-147, respectively; Jackson ImmunoResearch) was applied for 1 h at room temperature. Detection was performed by chemiluminescence (ECL Plus Western Blotting Chemiluminescent Substrate, GE Healthcare).

## **2.7 Quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR)**

Total RNA was extracted using the RNeasy Total RNA kit (Qiagen), as indicated by the manufacturer, and 1 µg was used as the template for single-strand cDNA synthesis, using the Superscript system (Invitrogen). cDNA diluted at a 1:80 ratio was loaded onto a 96-well plate. Real-time PCR amplification was performed using the SYBR-Green Supermix (Bio-Rad). Primers of the ubiquitarily ribosomal protein P0, ALP, Cbfa1/runx2, OCN, Cx43 as described previously [20] and Panx1 (5'-TTTATGTCCTGCTGGCTCCC-3'; 5'-TCCCCTGACCACTGCTCTTA-3'), Panx3 (5'-AGTGGCTACCTACCTCCTGA-3' ; 5'-GTCAGCCTGCATGTGATCAG-3'), calcium sensing receptor (CaSR) (5'-GACACACACCCATTGTCAAG-3' ; 5'-ATGCATGAGATGCAGAGCAC-3') and P2X7 (5'-TCTTCCGAGAAACAGGCGAT-3' ; 5'-AGTGTCGATGAGGAAGTCGA-3') were used at a final concentration of 200 nM. Data were analysed using the iCycler IQ software and compared by the  $\Delta\Delta CT$  method. Q-PCR was performed in triplicate. Results were expressed relative to gene expression levels on day 1. Data was normalized to P0 (ribosomal protein) mRNA expression for each condition and was quantified relative to Panx1, Panx3, Cx43, CaSR, P2X7, cbfa1/runx2, ALP and OCN gene expression in HBMSCs after 24hrs of culture in 2D, which was standardized to 1.

## **2.8 Pannexin1 inhibition by pharmacological inhibitor (Probenecid) and a mimetic peptide (10panx1)**

Pannexin1 was inhibited using the pharmacological inhibitor, Probenecid (Sigma) and the synthetic pannexin1 mimetic peptide, 10panx1 (WRQAAFVDSY; GeneCust, Dudelange, Luxembourg), whose dose and specificity was previously described [35, 36]. Cells cultured in 2D or 3D were treated with 200 µM of Probenecid and 200 µM of 10panx1 for 4 days. As the inhibitors were diluted in DMSO, respective controls were performed in the presence of vehicle alone.

## **2.9 Measurement of HBMSCs aggregates size**

Analysis of the aggregate area was performed using a Leica MacroFluo microscope with a Leica Z6 APO 6:1 objective. Digital images of each matrix (n=3) with numerous HBMSCs

aggregates cultured in control medium, or media containing Panx1 inhibitors, were taken at  $\times 6$  magnification and then analyzed, using ImageJ software, to calculate the aggregate area.

## **2.10 Statistical analysis**

Data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation, resulting from independent experiments. The GraphPad Prism software (GrapPad Inc., San Diego California USA) was used for the statistical analysis. Concerning aggregates size analysis, the test of Student was performed in order to compare the mean values between HBMSCs cultured with inhibitors and control. For the Q-PCR analysis the two modes of analysis of variance (ANOVA) was performed in order to compare the mean values between groups using the post-hoc Bonferroni test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## **3. Results**

### **3.1 Immunolabeling of Panx1, Panx3 and Cx43 in 2D and 3D cultures**

As previously showed [20], when HBMSCs are cultured in this polysaccharide-based macroporous matrix they form cellular aggregates, distributed within the pores of the matrix (Figure 1, 3D). As means to evaluate the impact of the HBMSCs culture on 3D on the expression of Panx1 we evaluated its expression by immunocytochemistry after 1 and 4 days of culture, and compared with cells cultured in 2D (Figure 1 A-D). Panx1 immunostaining can be detected in both 2D and 3D cultures, at both time points tested (days 1 and 4, Figure 1 A-D). One can observe in higher detail the localization of Panx1 in the cytoplasm of the HBMSCs in 2D culture (Figure 1 A, C), evidencing specific points on the filipodia of the cells. When in the 3D conformation, Panx1 immunostaining assumes the form of localized clusters (Figure 1 B, D).

Immunolabeling of Panx3 was equally detected in both 2D and 3D, at both time points tested (Figure 1 E-H). Panx3 shows a major nuclear localization in the 2D conformation, with comparable intensities at both time points (Figure 1 E, G), whereas in the 3D aggregates it is mainly located in the cytoplasm of cells, with an increased intensity at day 4 (Figure 1 F, H).

Cx43 immunolabeling (Figure 1 I-L) shows a punctuated staining, more evident in the 3D culture and within the cellular aggregates (Figure 1 J, L). The staining shows higher intensity in the 3D cultures, at 4 days, as compared to day 1 and 2D cultures (Figure 1 I-L).

### **3.2 Western Blot analysis of Panx1, Panx3 and Cx43 in 2D and 3D cultures**

Western blot analysis (Figure 2 A) confirms the expression of the Panx1 in 2D and 3D cultures. Panx1 resolves with two distinct bands at 41 and 48 kDa. These two bands have been previously shown to be the result of glycosylation of the protein [37, 38]. Quantitative analysis revealed that its expression (Figure 2, A1 and B) is significantly higher in 3D culture, compared to the 2D culture, at both time points. Panx3 was detected with a band at 45 kDa and shows a significant increase, at day 4, for the 3D culture when compared with 2D (Figure 2, A2 and C). Regarding Cx43 protein expression one can observe that it resolved with a band

at 43 kDa, consistent with previous reports [5]. Expression levels were shown to significantly increase, at day 4, when cells were cultured in 3D, in comparison with 2D cultures (Figure 2, A3 and D).

### **3.3 Role of Panx1 on cellular aggregate formation, in 2D and 3D cultures of HBMSCs**

To assess the exact function of Panx1, HBMSCs were cultured in the presence of two specific inhibitors of Panx1, the Probenecid (PBN) at 200  $\mu$ M [36] and a mimetic peptide (10panx1) at 200  $\mu$ M [36]. PBN is a pharmacologic specific gap junctional inhibitor that directly blocks Panx1 channel, whereas 10panx1 is a mimetic peptide for Panx1. Besides being a Panx1 antagonist, probenecid has recently been shown to block human P2X7 receptor-induced dye uptake, via a Panx1 independent mechanism [36]. Concerning the peptide, 10panx1 has failed to inhibit ATP-dye uptake into human monocytes [36].

At a first step we evaluated cell viability upon exposure to the two inhibitors, at the described conditions. 2D cultures of HBMSCs in the presence of the inhibitors, or with the vehicle alone, show no signs of compromised viability (days 1 and 4 for Figures 3 A, E, I and C, G, K, respectively). Similarly, in 3D, the inhibitors had no detrimental effect on cell viability or on the capacity to form cell aggregates (days 1 and 4 for Figures 3 B, F, J and D, H, L, respectively).

The macroscopic evaluation of the 3D cultured HBMSCs aggregates exposed to the inhibitors revealed an increase in size, compared to cells treated with vehicle alone. Following this observation we then quantified their size using imaging analysis, by measuring the surface of the aggregates, at 24 h, and normalizing this value to HBMSCs aggregates cultured in control medium, prior to any significant proliferation within the 3D matrix. HBMSC aggregates cultured with the control medium ( $100 \pm 15.85$  a.u) (Figure 4 A, D) were significantly smaller than those observed in HBMSCs cultured with the medium containing PBN ( $136.6 \pm 26.57$  a.u) (Figure 4 B, D) or the mimetic peptide 10panx1 ( $132.5 \pm 20.13$  a.u) (Figure 4 C, D). Using both inhibitors of Panx1 led to an increased size of the aggregates (>30%) in comparison with the vehicle alone.

### **3.4 The junctional protein expression in 2D and 3D culture**

To investigate the effect of Panx1 inhibitors (PBN and 10panx1) on the gene expression levels of Panx1, Panx3, Cx43 and P2X7, qPCR was performed in HBMSCs after 4 days of culture, in 2D and 3D, when exposed to the mentioned inhibitors (Figure 5 A-D). In the absence of the inhibitors, we show that the 3D culture of HBMSCs leads to the up-regulation of Panx1 at 1 and 4 days (Figure 5A), Panx3 at day 4 (Figure 5B) and Cx43 at day 4 (Figure 5C).

The treatment with the two inhibitors of Panx1, do not interfere with the gene expression of Panx1 or Panx3, in 3D conditions (Figure 5 A, B). Nonetheless, in 2D conditions both inhibitors showed to decrease the gene expression levels of panx1, after 4 days of culture (Figure 5 A). Cx43 gene expression was significantly up-regulated (5-fold increase) upon

treatment with Panx1 mimetic peptide (i.e. 10panx1) but not by BPN, after 4 days of 3D cultures (Figure 5 C).

Due to the described regulatory cross talk between Panx1 and P2X7 receptors [39] [35], we study the expression profiles of this gene in the described culture conditions. As for Panx1 and Panx3, P2X7 mRNA levels show an up regulation, at day 4, (3-fold increase) when in 3D, as compared to 2D cultures (Figure 5 D). Additionally, the treatment with the two Panx1 inhibitors, PBN or 10panx1, had no significant effect on relative expression of the P2X7 gene expression.

### 3.5 Role of Panx1 on osteoblastic differentiation of HBMSCs, in 2D and 3D cultures

In order to establish the influence of panx1 in the osteoblastic differentiation of HBMSCs, we evaluated the expression of the bone markers, i.e. ALP, CaSR, cbfa1/runx2 and OCN, by qPCR, in 2D and 3D conditions, at 1 and 4 days and in the presence of Panx1 specific inhibitors (PBN and 10panx1; Figure 6 A-D).

In absence of the inhibitors, and as expected, the culture after 4 days in 3D conditions, led to an increased gene expression of ALP (>2-fold), CaSR (>3 fold), cbfa1/runx2 (>2-fold) and OCN (>2-fold) (Figure 6A, B, C and D, respectively).

Both Panx1 inhibitors only impacted in ALP gene expression, in 2D cultures at day 4, where a significant gene expression decrease can be observed (>2-fold, Figure 6A).

## 4. Discussion

Here, and in order to attain a relevant 3D cell culture system, we used a macroporous hydrophilic matrix, composed of the natural polysaccharides pullulan and dextran, previously shown to be applicable in cell therapy [17]. Pullulan and dextran are hydrophilic, and their biochemical similarity with the ECM is the rationale for their use as scaffolds [40]. This 3D structure was prepared by cross-linking the biopolymers in the absence of organic solvents. A cross-linking process carried out in aqueous conditions provided a simple method of obtaining a polysaccharide-based scaffold [41]. In this work, the matrices exhibited an interconnected porosity of  $68 \pm 3$  % and pore sizes of  $243 \pm 14$   $\mu\text{m}$  [34]. These structure properties have shown to improve the cellular interactions between the resident cells through Cx43 activity [20].

Indeed, when cultured within these matrices, HBMCs shows increased expression of Cx43, when compared with 2D culture. Among the connexin gap junction proteins, Cx43 is the predominant connexin in osteoblasts [42-45], and its direct implication in osteoblast differentiation and mineralization was previously demonstrated [2, 3, 46, 47]. In vivo, Cx43 knockout mice showed cranial abnormalities and delayed ossification, whereas axial and appendicular elements were normal at birth [2]. Additionally, mice bearing conditional Cx43 deletion in osteoblasts displayed a normal appearance at birth but developed a low bone density osteopenia phenotype with age [46].

In an attempt to further understand the impact of other channels in the 3D complex communication of MSCs, we broaden the spectrum to other channel structures. Since its discovery 10 years ago, the pannexin family has received increasing attention, as it represents a unique class of channel proteins with diverse role in cellular functionality. To date, the majority of work has focused on Panx1 [26, 48], and only recently more detailed studies begun to explore the role of Panx2 [49, 50] and Panx3 [29, 51-54]. Indeed, in osteoblastic cells and other bone cell types several types of channels, permeable to molecules as large as 1 kDa, have been described [55]. Besides Cx43, other example is the channel formed by Panx1 coupled with P2X7 receptor. In terms of function, the association of Panx1 with P2X7R has shown to induce ATP permeabilization [35, 56]. Additionally, the permeability of the formed channels shown similarities to gap junctions channels [57, 58]. Besides Panx1, a number of reports have shown that Panx3 plays a role in the differentiation of osteoblastic cell types, such as murine calvaria-derived osteoblast MC3T3-E1 [59], and on murine or human cells lines [21, 29, 51, 60]. Hence, Panx3 may be one of the key pannexins in osteoblastic differentiation. However, the role of both Panx1 and Panx3 was not yet determined, particularly in primary cultures of human stem cells, in view of bone repair.

In that sense, here, we first demonstrated the expression of Panx1 and Panx3 (protein and mRNA) in human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs). Again, and consistent with the expression of Cx43, Panx1, Panx3 and P2X7 expression was shown to be induced when HBMSCs were cultured in 3D, even in the initial stages of culture for the first one.

Interplay between pannexins and Cx43 was already described. Indeed, Panx3 overexpression in differentiated C2C12 cells promoted Cx43 expression, whereas the suppression of endogenous Panx3, using specific shRNA, inhibited Cx43 expression [29], suggesting that Panx3 and Cx43 may play distinct roles in osteogenic differentiation and implying a regulation between both channels.

Multi-directional cell-cell connections are particularly relevant for cells in an aggregate configuration. In addition, cluster configurations have implications in the cell-cell connection numbers and cadherin-mediated binding, both of which have been shown to play important roles in stem cell fate decision [61, 62]. While over confluent adherent cultures can also be dominated by cell-cell interactions, the switch from cell-matrix to cell-cell dominated interactions may hinder data interpretation and alter differentiation kinetics.

In view of understanding the impact of pannexins in tridimensional cell arrangement we exposed the cultures, at an initial stage, to two specific inhibitors shown to block Panx1 function. Indeed, upon exposure to probenecid (PBN) or 10panx1, known to specifically block Panx1 channels [63, 64] and P2X7 (by PBN) [36], we show that one of the roles of Panx1 is related to the compaction of the multicellular aggregates of HBMSCs. This role is consistent to what previously described in glioma cell lines where the same effect was described [26]. However this is the first report regarding primary mesenchymal stem cells. These events were associated with an increase of expression in Panx1 into cellular aggregates, although the specific function of Panx1 in aggregate formation and actomyosin cytoskeleton regulation by

ATP remains unknown. Unfortunately, inhibitors to Panx3 are not available, hindering a further mechanism assessment of this molecule.

In a previous study, it has been shown that, rather than increasing cell proliferation, 3D culture conditions could alter cytoskeletal tension of MSCs, compared to 2D, leading to an osteogenic-specific lineage commitment [65]. Several studies have demonstrated the osteogenic/chondrogenic differentiation capacity, in vitro and in vivo, of MSCs cultured on 3D conditions, under specific differentiation culture medium/conditions [66, 67]. However, the implication of Panx1 or Panx3 on this differentiation process was not yet assessed. As such we focused on the evaluation of panx1, panx3, Cx43 and P2X7 during 3D differentiation of HBMSCs. Also, and due to the lack of specific inhibitors for panx3, as mentioned before, we focused on the use of Panx1 inhibitors and on their impact on HBMSCs osteoblastic differentiation in 3D.

Quantitative analysis performed by qPCR revealed an increased expression of the tested bone-specific markers (i.e. ALP, Cbfa1, OCN and CaSR) when cells were cultured in 3D conditions, showing the importance of an tridimensional conformation as a driving force towards the differentiation in the osteoblastic lineage. The use of inhibitors to panx1, PBN or the mimetic peptide 10panx1, shown to interfere with the size of cellular aggregates in 3D, suggests that Panx1 is not involved in the differentiation process of MSCs into the osteoblastic lineage. However, the up regulation of Cx43 observed in HBMSCs cultured in 3D in the presence of 10panx1, can probably compensate an eventual inhibitory effect of this specific inhibitor. Cx43 is known to be involved in the osteoblastic differentiation of MSCs [20, 68, 69] and its up regulation might stimulate the expression of the bone-specific markers, and therefore compensating any effect drawn by 10panx1.

The expression of bone markers exhibited the same kinetics of gene expression of those of Panx3 and P2X7 in HBMSCs, when cultured in 3D. However, the exact function played by Panx3 in the differentiation process of HBMSCs in 3D cultures remains unknown.

Taken together, our data indicate that Panx1 and Panx3, probably in conjunction with Cx43, may act on human mesenchymal stem cells cultured in a 3D microenvironment, by improving cellular communication within dense cellular aggregates, and then on osteoblastic differentiation. Our future studies will focus on the signaling pathways involved in interaction between Panx1 and actomyosin cytoskeleton in HBMSCs aggregates that might be interfere with bone cell differentiation. Additionally, the use of specific inhibitors to Panx3 will permit to identify the role of this pannexin in the intricate cell communication process. This study will open new avenues in the establishment of novel conditions to achieve an osteoblastic lineage commitment by multipotent MSCs without the addition of external stimuli (i.e. differentiation medium).

## **Acknowledgements**

This work was supported by Grants from INSERM (National Institute for Health and Medical Research), from University of Bordeaux, Universities of Paris 7 and Paris 13, and by Grants from the French Research National Agency (ANR-09-EBIO-001 3-D Cell; ANR-07-TecSan-

011, ITOV ANR-10-EMMA-009-01 MATRI+; ANR-12-TecSan-0011 INEOV). Thanks to the New Jersey Center for Biomaterials (NJCB), University of Rutgers, New Jersey, USA for all their help.

### **Disclosure of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

- [1] Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 2002;383:725-37.
- [2] Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol.* 2000;151:931-44.
- [3] Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1719:69-81.
- [4] Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818:1909-18.
- [5] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone.* 2008;42:1080-91.
- [6] Chaible LM, Sanches DS, Cogliati B, Menecier G, Dagli ML. Delayed osteoblastic differentiation and bone development in Cx43 knockout mice. *Toxicol Pathol.* 2011;39:1046-55.
- [7] Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol.* 2000;10:R473-4.
- [8] Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:15-22.
- [9] Panchin YV. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol.* 2005;208:1415-9.
- [10] Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, et al. Pannexin1 regulates alpha1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. *Circ Res.* 2011;109:80-5.
- [11] Chandrasekhar A, Bera AK. Hemichannels: permeants and their effect on development, physiology and death. *Cell Biochem Funct.* 2012;30:89-100.
- [12] Plotkin LI. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front Physiol.* 2014;5:131.
- [13] Rauh J, Jacobi A, Stiehler M. Identification of Stable Reference Genes for Gene Expression Analysis of Three-Dimensional Cultivated Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014.
- [14] Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2013;34:2947-59.

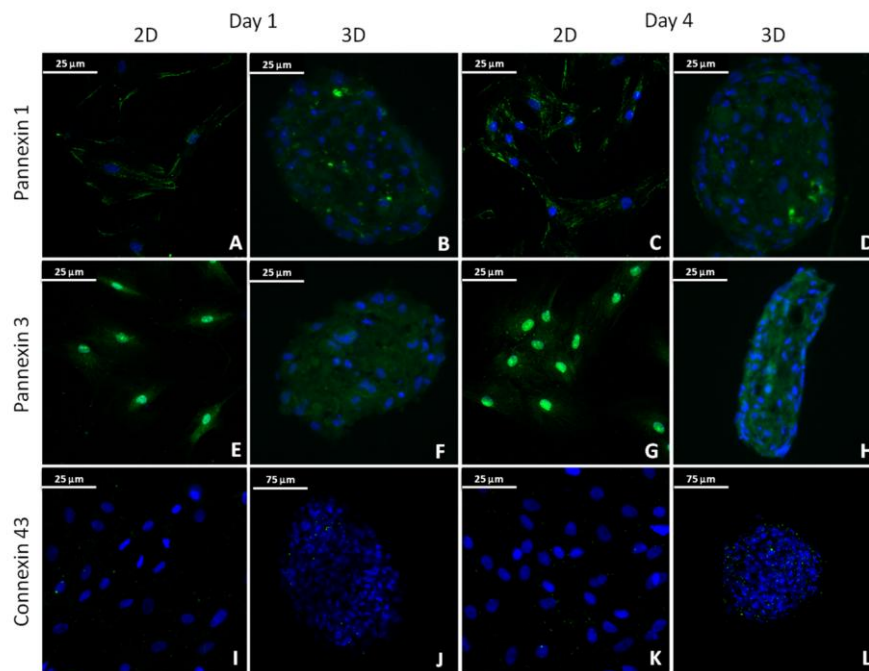
- [15] Khan F, Ahmad SR. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromol Biosci*. 2013;13:395-421.
- [16] Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 2007;82:336-42.
- [17] Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96:535-42.
- [18] Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:339-45.
- [19] Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2011;21:341-54.
- [20] Guerrero J, Catros S, Derkaoui SM, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater*. 2013;9:8200-13.
- [21] Penuela S, Celetti SJ, Bhalla R, Shao Q, Laird DW. Diverse subcellular distribution profiles of pannexin 1 and pannexin 3. *Cell Commun Adhes*. 2008;15:133-42.
- [22] Beral V. Cancer prevention. Other selected interventions. *IARC Sci Publ*. 1990:171-8.
- [23] Thi MM, Islam S, Suadican SO, Spray DC. Connexin43 and pannexin1 channels in osteoblasts: who is the "hemichannel"? *J Membr Biol*. 2012;245:401-9.
- [24] Boyce AK, Wicki-Stordeur LE, Swayne LA. Powerful partnership: crosstalk between pannexin 1 and the cytoskeleton. *Front Physiol*. 2014;5:27.
- [25] Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC. Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res*. 2007;67:1545-54.
- [26] Bao BA, Lai CP, Naus CC, Morgan JR. Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2012;287:8407-16.
- [27] Bhalla-Gehi R, Penuela S, Churko JM, Shao Q, Laird DW. Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *J Biol Chem*. 2010;285:9147-60.
- [28] Bond SR, Lau A, Penuela S, Sampaio AV, Underhill TM, Laird DW, et al. Pannexin 3 is a novel target for Runx2, expressed by osteoblasts and mature growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 2011;26:2911-22.
- [29] Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol*. 2011;193:1257-74.
- [30] Alvarez CL, Schachter J, de Sa Pinheiro AA, Silva Lde S, Verstraeten SV, Persechini PM, et al. Regulation of extracellular ATP in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2014;9:e96216.
- [31] Ohbuchi T, Takenaga F, Hohchi N, Wakasugi T, Ueta Y, Suzuki H. Possible contribution of pannexin-1 to ATP release in human upper airway epithelia. *Physiol Rep*. 2014;2:e00227.

- [32] Penuela S, Harland L, Simek J, Laird DW. Pannexin channels and their links to human disease. *Biochem J*. 2014;461:371-81.
- [33] Velasquez S, Eugenin EA. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol*. 2014;5:96.
- [34] Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater*. 2010;6:3640-8.
- [35] Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006;25:5071-82.
- [36] Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejrde M, Skarratt KK, Fuller SJ, et al. Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One*. 2014;9:e93058.
- [37] Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2007;282:31733-43.
- [38] Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, et al. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci*. 2007;120:3772-83.
- [39] Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, et al. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C752-60.
- [40] Gloria A, De Santis R, Ambrosio L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech*. 2010;8:57-67.
- [41] Lack S, Dulong V, Picton L, Le Cerf D, Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr Res*. 2007;342:943-53.
- [42] Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest*. 1993;91:1888-96.
- [43] Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM, et al. Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res*. 1997;76:1357-66.
- [44] Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, et al. Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res*. 2001;264:397-407.
- [45] Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci*. 2007;12:1450-62.
- [46] Chung DJ, Castro CH, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szejnfeld VL, et al. Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci*. 2006;119:4187-98.
- [47] Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:20794-9.
- [48] MacVicar BA, Thompson RJ. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci*. 2010;33:93-102.

- [49] Lai CP, Bechberger JF, Naus CC. Pannexin2 as a novel growth regulator in C6 glioma cells. *Oncogene*. 2009;28:4402-8.
- [50] Swayne LA, Sorbara CD, Bennett SA. Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. *J Biol Chem*. 2010;285:24977-86.
- [51] Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, et al. Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2010;285:18948-58.
- [52] Celetti SJ, Cowan KN, Penuela S, Shao Q, Churko J, Laird DW. Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2010;123:1363-72.
- [53] Turmel P, Dufresne J, Hermo L, Smith CE, Penuela S, Laird DW, et al. Characterization of pannexin1 and pannexin3 and their regulation by androgens in the male reproductive tract of the adult rat. *Mol Reprod Dev*. 2011;78:124-38.
- [54] Ishikawa M, Iwamoto T, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 inhibits proliferation of osteoprogenitor cells by regulating Wnt and p21 signaling. *J Biol Chem*. 2014;289:2839-51.
- [55] Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia*. 2006;54:758-73.
- [56] Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett*. 2007;581:483-8.
- [57] Flagg-Newton J, Simpson I, Loewenstein WR. Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction. *Science*. 1979;205:404-7.
- [58] Di Virgilio F, Ferrari D, Falzoni S, Chiozzi P, Munerati M, Steinberg TH, et al. P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Found Symp*. 1996;198:290-302; discussion -5.
- [59] Xiao Z, Camalier CE, Nagashima K, Chan KC, Lucas DA, de la Cruz MJ, et al. Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2007;210:325-35.
- [60] Wang XH, Streeter M, Liu YP, Zhao HB. Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *J Comp Neurol*. 2009;512:336-46.
- [61] Rodriguez JP, Gonzalez M, Rios S, Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2004;93:721-31.
- [62] Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8129-34.
- [63] Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C761-7.
- [64] Shoji KF, Saez PJ, Harcha PA, Aguila HL, Saez JC. Pannexin1 channels act downstream of P2X 7 receptors in ATP-induced murine T-cell death. *Channels (Austin)*. 2014;8:142-56.
- [65] Tseng PC, Young TH, Wang TM, Peng HW, Hou SM, Yen ML. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3D microcarriers through alteration of cytoskeletal tension. *Biomaterials*. 2012;33:556-64.
- [66] Moreau JL, Xu HH. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold. *Biomaterials*. 2009;30:2675-82.
- [67] Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng*. 2005;11:787-802.

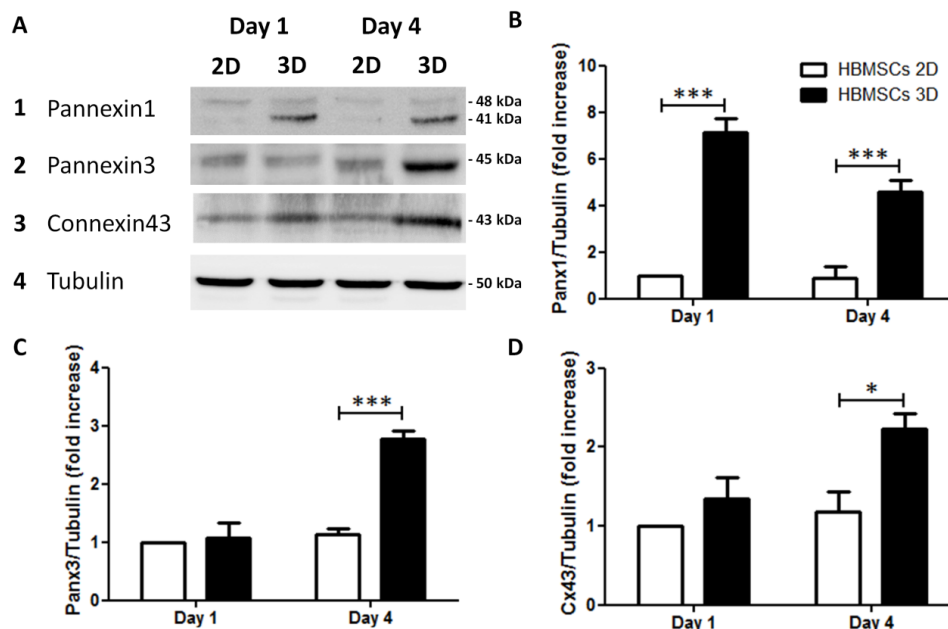
- [68] Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*. 2013;52:157-66.
- [69] Loiselle AE, Paul EM, Lewis GS, Donahue HJ. Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. *J Orthop Res*. 2013;31:147-54.

## Figures and Legends



**Figure 1. HBMSC immunolabeling for Panx1, Panx3 and Cx43.**

(A-D) Panx1 immunolabeling after 1 (D1) and 4 days (D4), of 2D and 3D cultures. (E-H) Panx3 immunolabeling after 1 (D1) and 4 days (D4), of 2D and 3D cultures. (I-L) Cx43 immunolabeling after 1 (D1) and 4 days (D4), of 2D and 3D cultures. In all cases the primary antibody was detected with Alexa 488- conjugated IgG (in green) and nuclei stained by DAPI (blue).

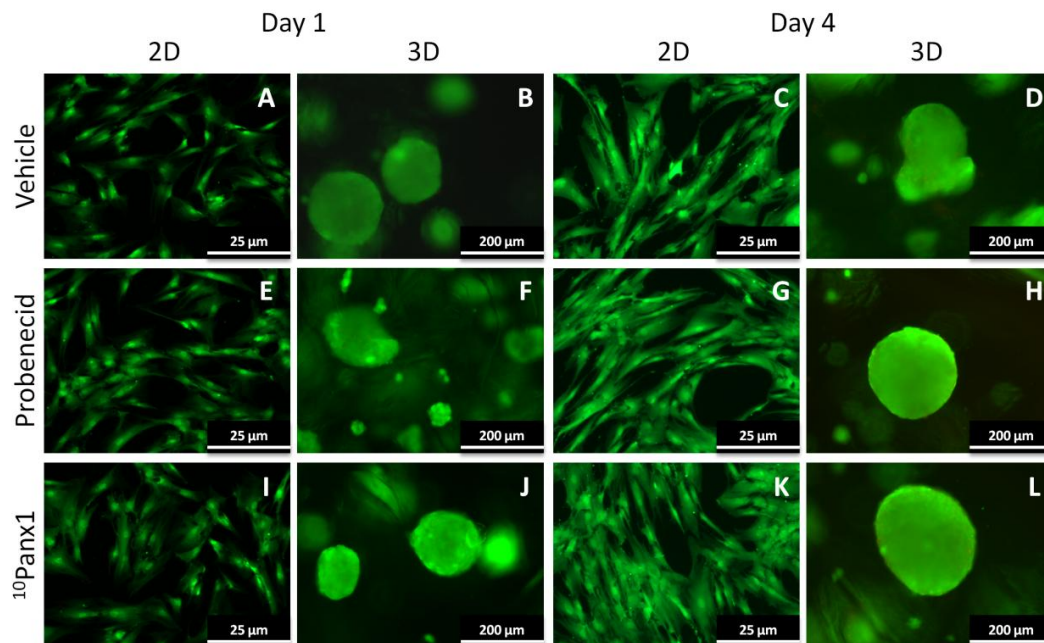


**Figure 2. Panx1, Panx3 and Cx43 protein expression evaluation in HBMSCs.**

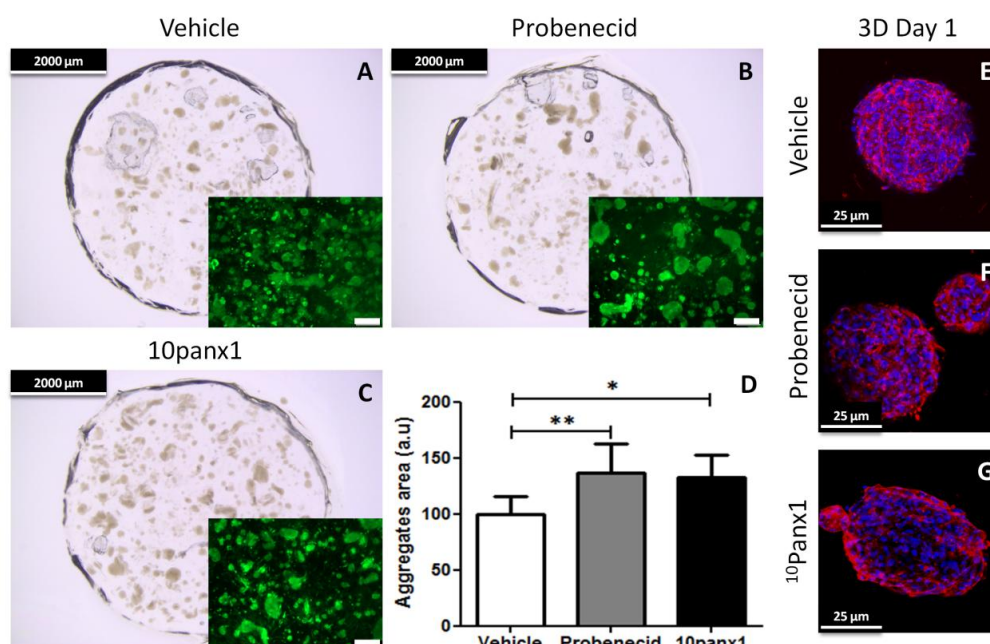
(A) HBMSCs cells were cultured under 2D or 3D conditions during 1 or 4 days. Panx1 (A1), Panx3 (A2) and Cx43 (A3) protein expression levels were evaluated by Western blot, using Tubulin (A4) as endogenous control. Relative quantification of Panx1 (B), Panx3 (C) and

# RESULTATS – I. Implication de la Pannexine 1 et 3 dans la communication et la différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine

Cx43 (D) proteins, relative to Tubulin protein content. Three independent experiments were performed. Symbols \*, \*\* and \*\*\*, indicate a significant difference with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. White columns, 2D culture; black columns, 3D culture.



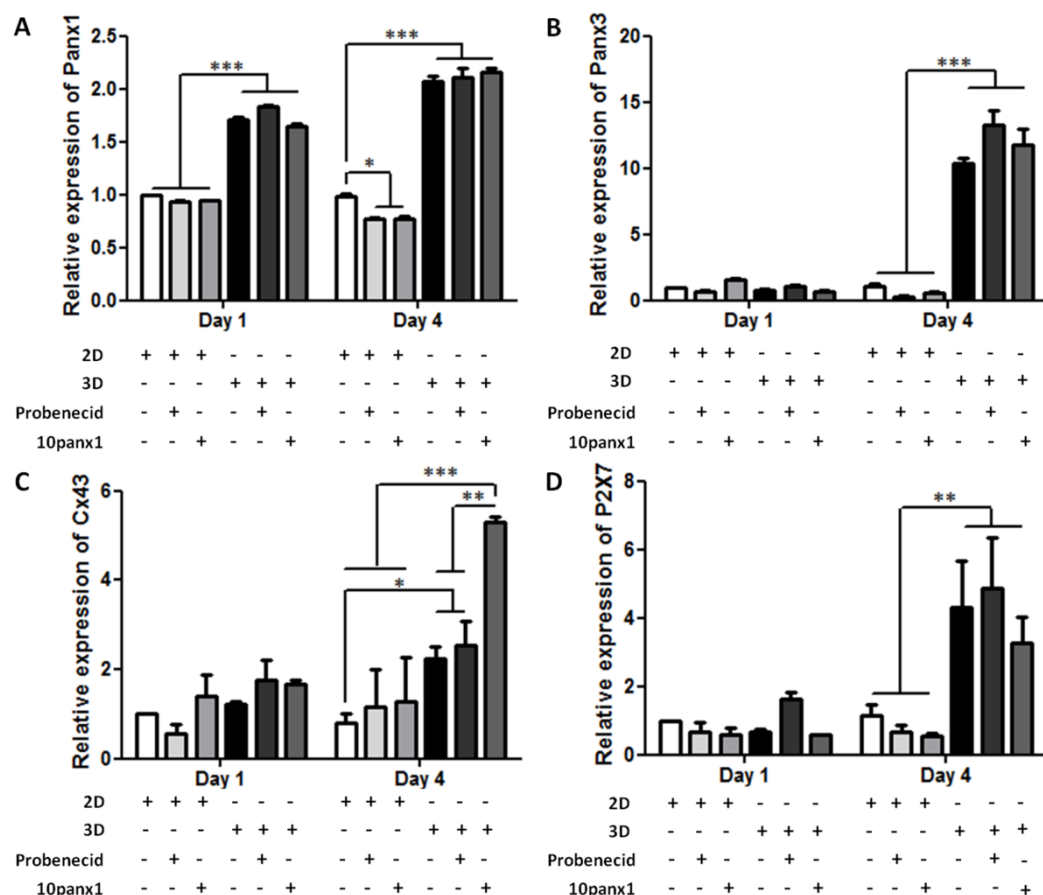
**Figure 3. HBMSCs viability assessment upon treatment with PBN and 10panx1.** (A-L) Fluorescence microscopic images of HBMSCs in 2D or 3D cultures after 1 (D1) and 4 days (D4), stained with Live/Dead assay. Viable cells are labeled with calcein (green) and non-viable cells are labeled with ethidium (red). (A-D) Control HBMSCs. (E-F) HBMSCs cultured in medium with PBN (200  $\mu$ M). (G-J) HBMSCs cultured in medium with 10panx1 (200  $\mu$ M).



**Figure 4. HBMSCs aggregates compaction: effect of Panx1 inhibitors.**

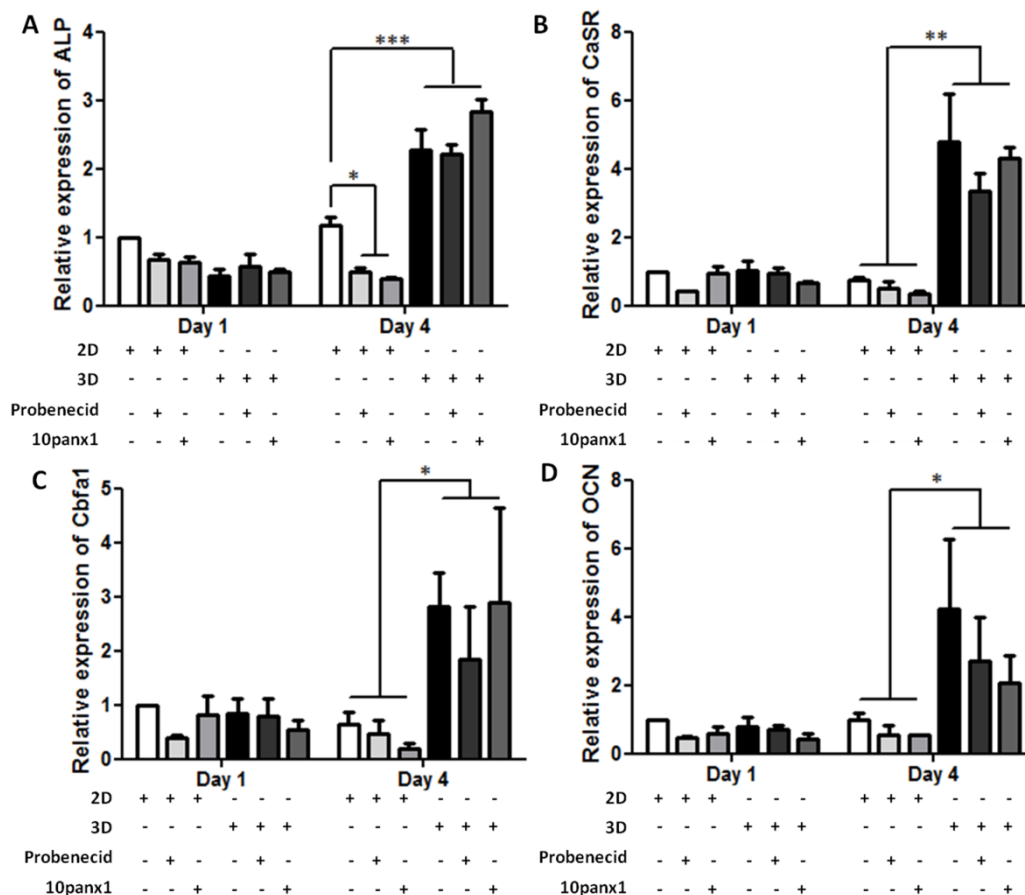
Bright field macroscopic images of 3D polysaccharide-based matrices, 24 hrs after seeding with HBMSCs and exposed to vehicle alone (A), probenecid (200  $\mu$ M, B) or 10panx1 (200

$\mu\text{M}$ , C). Evaluation of HBMSCs aggregate area in control medium, in medium with PBN (200  $\mu\text{M}$ ) and in medium with 10panx1 (200  $\mu\text{M}$ ) after 1 day of culture. Data is standardized relative to aggregate surface of HBMSCs cultured in control medium. Three independent experiments were performed. Symbol \*\*\* indicates a significant difference with  $p < 0.001$ .



**Figure 5. Quantitative analysis of Panx1, Panx3, Cx43 and P2X7 in HBMSCs: effect of Panx1 inhibitors.**

Quantitative gene expression of Panx1 (A), Panx3 (B), Cx43 (C) and P2X7 (D) in 2D and 3D culture treated or not with Panx1 inhibitors during 1 (D1) or 4 days (D4). Data are standardized to expression of each gene obtained after D1, relative to expression of housekeeping gene. Three independent experiments were performed. Symbols \*, \*\* and \*\*\*, indicate a significant difference with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.



**Figure 6. Relative gene expression analysis of bone specific expression in HBMSCs: effect of Panx1 inhibitors.**

Relative gene expression of ALP (A), CaSR (B), Cbfa1 (C) and OCN (D) in 2D and 3D cultures, treated or not with Panx1 inhibitors for 1 (D1) and 4 days (D4). Data is normalized to the gene expression of each gene at day1 and relative to expression of housekeeping gene. Three independent experiments were performed. Symbols \*, \*\* and \*\*\*, indicate a significant difference with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.

## C. Conclusions

Les principaux résultats issus de cet article sont les suivants :

Alors que les MSCs forment une monocouche cellulaire en 2D, ces mêmes cellules s'organisent très rapidement sous forme d'agrégats cellulaires en 3D. Cette conformation en sphéroïdes a pour conséquence de stimuler les interactions cellulaires et l'établissement de jonctions intercellulaires. Parmi ces jonctions nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux Connexines 43 et aux Pannexines 1 et 3.

Il n'a pas été possible de déterminer de façon précise le rôle de la Pannexine 3, en particulier sur la différenciation des cellules mésenchymateuses de moelle osseuse de par l'absence d'inhibiteur spécifique de cette Pannexine. Nous nous dirigeons vers l'utilisation de siRNA pour inhiber cette protéine de jonction.

RESULTATS – II. Interactions cellulaires entre les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse et des progéniteurs endothéliaux au sein d’une matrice tridimensionnelle de polysaccharides

La Pannexine 1 semble quant à elle agir sur l’agrégation des cellules sous forme de sphéroïdes, bien qu’il n’ait pas été possible de définir les voies de signalisation intracellulaires sollicitées par la Pannexine 1. Il semble néanmoins que cette protéine puisse agir au niveau des protéines du cytosquelette et du réseau d’actine.

Un élément important concerne les activités couplées entre la Connexine 43 et la Pannexine 1. L’expression de la Connexine 43 est également favorisée par un environnement 3D et son expression semble être régulée par la Pannexine 1.

Le dernier point porte sur la différenciation des cellules mésenchymateuses en 3D. Les marqueurs précoces et tardifs sont régulés positivement dans une matrice tridimensionnelle. Cette stimulation pourrait résulter des interactions cellule-cellule et de l’augmentation de l’expression des Connexines 43, connues pour favoriser la différenciation ostéoblastique.

## **II. Interactions cellulaires entre les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse et des progéniteurs endothéliaux au sein d’une matrice tridimensionnelle de polysaccharides**

### **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 (50).

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. L’une des stratégies pouvant être mise en place afin de pallier 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 les matrices utilisées dans ce travail permettaient la culture de cellules endothéliales (229). Enfin, des études *in vivo* chez le petit animal démontrent que ces matrices permettent la formation d’un néo-tissu vasculaire (230).

**Le deuxième article est consacré à l’étude de la communication entre des cellules mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse et des cellules progénitrices endothéliales issues de sang de cordon ombilical. Cette étude a porté sur le rôle des jonctions communicantes de type GAP et plus particulièrement sur la fonction de la Connexine 43 dans un modèle de culture en 3D au sein de la matrice macroporeuse de pullulane et de dextrane. Sa fonction sur la différenciation des MSCs en co-culture 3D avec les cellules progénitrices endothéliales a été plus particulièrement étudiée à l’aide d’un peptide mimétique de la Connexine 43.**

## **B. Article 2 :**

### **Abstract**

Several studies have reported the benefits of mesenchymal stem cells (MSCs) for bone tissue engineering. However, vascularization remains one of the main obstacles that must be overcome to reconstruct large bone defects. In vitro prevascularization of the three-dimensional (3-D) constructs using co-cultures of human progenitor-derived endothelial cells (PDECs) with human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs) appeared as a potential strategy. However, the crosstalk between the two lineages has been studied in two-dimensional (2-D), but remains unknown in 3-D. The aim of this study is to investigate the cell interactions between PDECs and HBMSCs in a porous matrix composed of polysaccharides. This biodegradable scaffold promotes cell interactions by inducing multicellular aggregates composed of HBMSCs surrounded by PDECs. Cell aggregation contributes to the formation of junctional proteins composed of Connexin43 (Cx43) and VE-cadherin, and an activation of osteoblastic differentiation of HBMSCs stimulated by the presence of PDECs. Inhibition of Cx43 by mimetic peptide 43GAP27 induced a decrease in mRNA levels of Cx43 and all the bone-specific markers. Finally, subcutaneous implantations for 3 and 8 weeks in NOG mice revealed an increase in osteoid formation with the tissue-engineered constructs seeded with HBMSCs/PDECs compared with those loaded with HBMSCs alone. Taking together, these results demonstrate that this 3-D microenvironment favored cell communication, osteogenesis and bone formation.

### **Keywords**

Mesenchymal stem cells; Endothelial cells; Differentiation; Tissue Regeneration; Co-culture.

## **1. Introduction**

Stem cells are used for regenerative medicine in a wide variety of disease states. In the field of bone tissue engineering, the potential of human mesenchymal stem cells (MSCs) has led to a large number of in vitro and preclinical studies based upon their capacity to differentiate into multiple cell types under biochemical stimuli or combined with three-dimensional (3-D) matrices or biomaterials as cell carriers. However, vascularization remains one of the main hurdles that must be overcome to reconstruct large bone defects, even with the help of biomaterials and autologous stem cells [1] and [2]. Insufficient vascularization after implantation of tissue-engineered constructs with MSCs leads to nutrient limitations, which then turn into cell death in the constructs [3] and [4]. Several strategies for improving the vascularization of tissue-engineered constructs have been studied extensively in recent years [5], [6] and [7]. Among them, in vitro prevascularization of the 3-D tissue constructs using co-cultures of vascular endothelial cells (ECs) with bone-forming cells or MSCs has received much attention [8] and [9]. In vitro studies have shown that these co-cultures contribute to the formation of a vascular network organized mostly into tube-like structures as well as to an increase in osteogenesis [10], [11], [12] and [13]. In vivo, implantation of these tissue-engineered constructs leads to the formation of an osteoid tissue exhibiting numerous vessels [14], [15] and [16], but the exact mechanism underlying the increase in bone formation and new tissue vascularization remains largely unknown. This gives rise to the hypothesis that co-culture of bone-forming osteoblasts (OBs) and ECs (or their progenitors) into a scaffold holds great promise in regenerative medicine [17]. This also means that bone vascular ECs

contribute to the intricate communication pathways that are operative in bone and that link different cell types through diffusible signaling molecules, as well as through cell contact-mediated mechanisms.

Among the modes of cell-to-cell communication, direct contacts between cells can be initiated on two-dimensional (2-D) surfaces [18] by spheroid co-culture systems [19] and within a 3-D scaffold designed for promoting cell interactions [20]. Two-dimensional studies have provided detailed data concerning the molecular basis of cell-to-cell contacts and knowledge of the cellular events governing the differentiation of OBs that are in contact with ECs [21]. In 3-D matrices, a number of studies using co-cultures of two lineages have been published, with cell lines from different sources (human and murine), including differentiated cells mixed with undifferentiated cells (MSCs or progenitors). Among the cell culture models used to develop these hybrid constructs, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [22], human outgrowth endothelial cells (OEC) [23], human microcapillary endothelial cells [24] and endothelial progenitor cells from cord blood have been used for co-cultures with human bone-derived cells [25], osteoblast-like MG63 cells [26], primary human osteoblast cells [27], human osteoprogenitor cells from bone marrow [28], MSCs from adipose tissue [29] or bone marrow [30]. However, combining differentiated cells with undifferentiated cells arising from different sources (mouse, human) in co-culture assay does not mimic the physiological situation that occurs in a clinical situation of bone repair. In this context, human MSCs from bone marrow provide several advantages, such as the potential to differentiate into OBs and to support the new vascularization process by release of pro-angiogenic factors [31]. However, the vascularization process can be actively supported by human endothelial progenitor cells arising from peripheral blood or cord blood [32].

Numerous actors involved in the crosstalk between endothelial and osteoblastic lineages have been identified using mainly 2-D co-culture assays. At least two cell signaling pathways have been described that could explain the reciprocal activities on both cell types described above: (i) signals that are allowed to diffuse freely in the extracellular environment and interact with the target cells through specific receptors, and (ii) signals that freely diffuse from the cytoplasm of one cell to that of another *via* gap junctions, which directly link the cytoplasm of adjacent cells [33]. However, there is a lack of systemic studies evaluating the mode of cell communication in a 3-D scaffold, which could support bone tissue engineering. Recently, the osteoinductivity of calcium phosphate as scaffolds, mediated by Connexin 43 (Cx43) has been demonstrated [34]. The authors showed that the scaffold had increased Cx43 expression and gap junction formation, which altered cell differentiation of dental pulp cells.

In this context and with regard to the literature, Cx43 mediated gap junctions are well known to play an important role in bone tissue formation [35]. Cx43 is most closely associated with the initiation of osteogenesis and bone formation. The role of Cx43 in osteogenesis and bone formation has been demonstrated *in vitro* using 2-D culture models of different osteoblastic cell lines [18] and *in vivo* using experimental models in mice [36]. *In vitro*, the present authors’ previous results provide evidence of the function of endothelial cell interactions *via* gap junctional communication for the development of bone-forming cells [18], [21] and [37]. In these experiments, the cell coupling and the functionality of the gap junctions were evidenced using specific inhibitors to Cx43 or gap junctions.

With regard to knowledge on the cell-to-cell communication [17], one of the objectives of this study will be to clarify the role of intercommunication between ECs and MSCs in an

appropriate scaffold able to favor cell interactions. This crosstalk could be critical to the coordinated cell behavior necessary for bone development, vascularization and remodeling.

To address this issue and to mimic a relevant 3-D microenvironment, biomaterials are needed to create favorable physicochemical macro- and microstructures for promoting cell interplay and cell differentiation. Among the scaffolds used for bone tissue engineering, besides the calcium phosphate-based matrices, polymers with high hydrophilic properties appear suitable for mimicking the aqueous *in vivo* environment [38]. They have great design flexibility, owing to their composition, and their structure can be tailored to a specific need [39]. Several studies on bone tissue engineering using polysaccharides such as alginate, carrageenan, chitosan, pullulan or cellulose [40], [41], [42], [43], [44] and [45] are in progress. These natural polymers hold promise for healing and regenerating damaged tissues, since they are highly permeable and facilitate the transport of nutrients and metabolites [46]. Here, a macroporous matrix was used, composed of the natural hydrophilic polysaccharides pullulan and dextran, which have already been used in cell therapy [47] and [48]. Their suitability has been proved for vascular cell growth [49] and for culturing MSCs from adipose tissue [50]. The matrix is highly flexible for numerous tissue engineering applications, in which variable macroporosity and/or composition are required [51].

This study investigates: (i) the cellular network induced within the polysaccharide-based scaffold by the co-cultures of human bone marrow stromal cells (HBMSCs) from bone marrow and human progenitor-derived endothelial cells (PDECs) isolated from cord blood; (ii) the cell interactions occurring between the two cell types in the 3-D scaffold that contribute to an increase in osteogenesis; (iii) the role of Cx43 in the 3-D crosstalk between human MSCs and human endothelial progenitor cells; (iv) the fate of the tissue-engineered constructs after subcutaneous implantation in NOG mice. Enhancing understanding of the cell interactions between HBMSC–PDEC co-cultures in 3-D is an important step towards developing a scaffold that supports bone growth and vasculature formation.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Preparation of 3-D macroporous scaffolds**

Macroporous scaffolds (6 mm in diameter, 2 mm thick, 20 mm<sup>3</sup>) were synthesized using a blend of pullulan/dextran 75:25 (pullulan, MW 200,000; Hayashibara Inc; dextran, MW 500,000; Sigma), prepared by dissolving 9 g of pullulan and 3 g of dextran in 40 ml of distilled water containing 14 g of NaCl, as previously described [52] and [53]. Chemical cross-linking was carried out using trisodium trimetaphosphate. Pores were created by a patented gas-foaming technique. The resulting scaffolds were cut into the desired shape, soaked in phosphate buffered saline (PBS) and then washed extensively with a 0.025% NaCl solution. After freeze-drying, scaffolds were stored at room temperature until use. The scaffolds described above were used for cell seeding. Regarding their characterization, pore size and pore area (by environmental scanning electron microscopy, and from confocal data using FITC-labeled dextran scaffolds), water content and swelling ratio were previously described by Autissier et al. [52]. One particular type of scaffold was used in this work (6 mm diameter, 2 mm thick, 20 mm<sup>3</sup>; porosity 37%, and average pore size ~150 µm).

### **2.2. Isolation and culture of HBMSCs**

HBMSCs were isolated from human bone marrow according to methods described previously [54]. Bone marrow was aspirated from the femoral diaphysis or iliac bone after obtaining consent from patients undergoing hip prosthesis surgery after trauma. Here, experiments were performed using 10 different samples of HBMSCs, with an average age of donors of  $66 \pm 11$  years. The study was approved by the local institutional review board. Cells were separated into a single suspension by sequential passages through syringes fitted with 16-, 18- or 21-gauge needles. After centrifugation for 15 min at 800g, the pellet was resuspended with  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM; Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS). The cells were plated into 75 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Falcon) at a density of  $5 \times 10^5$  cells cm<sup>-2</sup> and grew in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### 2.3. Isolation and culture of PDECs

PDECs were obtained according to methods described previously [55]. In brief, mononuclear cells (MNC) were isolated from 45 ml buffy coat obtained from human umbilical cord blood from healthy donors. The age of the donors for PDECs was between 20 and 35 years. After dilution with PBS, 2% (v/v) FCS and 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and density gradient centrifugation in 1.077 g ml<sup>-1</sup> Histopaque® solution (Sigma–Aldrich), the cell suspension was washed several times with PBS and cultured in endothelial cell growth medium-2 (EGM-2; Lonza-Verviers, France) with supplements from the kit and 5% (v/v) FCS (GIBCO Life Technologies, Karlsruhe, Germany), on collagen-coated 12-well plates (collagen type I; Rat Tail, BD Biosciences). A total of 107 cells well<sup>-1</sup> were seeded on a 24-well culture plate. At day 4, non-adherent cells were removed from the MNC cultures. The cells were fed with fresh medium every other day. Colonies with cobblestone-like morphology appearing after 2–3 weeks in culture were selected. The cells were harvested from the dishes using 0.25% (w/v) trypsin–EDTA (GIBCO) and were subcultured into fresh collagen-coated dishes. The cells were expanded over several passages, using standard cell culture procedures according to their morphology and endothelial phenotype.

### 2.4. Cell seeding within 3-D macroporous scaffold

Before cell seeding, dried scaffolds (6 mm in diameter, 2 mm thick) were submitted to UV radiation for 30 min. For co-culture experiments, HBMSCs and PDECs were co-cultured at a 1:1 ratio for 1, 3, 9 and 12 days in the co-culture medium  $\alpha$ -MEM and EGM-2 MV at a ratio 1:1 (v/v). The two cell types were seeded at  $4 \times 10^5$  cells/disk for phenotypic analysis or at  $2 \times 10^5$ , respectively:  $2 \times 10^5$  cells for proliferation assays per disk of matrices. Mono-cultures of HBMSCs seeded at the same cellular density as described above were used as control and were performed in the same co-culture medium. The cell viability within these matrices was demonstrated using the LIVEDEAD® assay [56]. For time-lapse video microscopy, HBMSCs and PDECs were co-cultured at a 1:1 and 1:4 ratio for 24 h.

### 2.5. Lentiviral transduction

A lentiviral vector was constructed to contain the TdTomato protein gene [57] under the control of the phosphoglycerate kinase promoter. For viral transduction,  $2 \times 10^5$  freshly trypsinized PDECs were mixed with  $6 \times 10^6$  viral particles (multiplicity of infection (MOI) = 30). After 24 h in culture, virus-containing medium was replaced with fresh medium, and the cells were allowed to grow. Medium was changed every day for 2 days. Expression of TdTomato was observed under a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert 25 CFL microscope; Zeiss, Oberkochen, Germany), with excitation and emission of 554 nm and 581 nm,

respectively. A second lentiviral vector contained the green fluorescent protein (GFP) gene under the control of the modified myeloid proliferative sarcoma virus promoter (MND), a synthetic promoter with the U3 region of a modified MoMuLV LTR with myeloproliferative sarcoma virus enhancer. For viral transduction,  $2 \times 10^5$  freshly trypsinized HBMSCs were mixed with  $6 \times 10^6$  viral particles (MOI = 30). After 24 h in culture, virus-containing medium was replaced by fresh medium, and cells were allowed to grow. Medium was changed every day for 2 days. Expression of GFP was observed under a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert 25 CFL microscope; Zeiss, Oberkochen, Germany), with excitation and emission of 489 nm and 535 nm, respectively.

## **2.6. Flow cytometry**

HBMSCs and PDECs expressing or not expressing GFP and TdTomato, respectively, were trypsinized, washed with PBS and incubated with antibodies against CD105, CD90, CD73, CD34 and CD45 (BD Biosciences, San Jose, CA) for 1 h at room temperature in PBS supplemented with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA), then with FITC-conjugated secondary antibodies to mouse (Invitrogen, USA). Two controls were performed, one assay with cells without the primary antibodies, but incubated with the FITC-conjugated secondary antibodies, and the second with cells alone. Assays were analyzed with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, USA).

## **2.7. Time lapse video-microscopy**

Video-microscopy experiments were done on an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a Quantem camera (Roper Scientific, Evry, France). Labeled cells seeded into the porous scaffolds were deposited 30 min later in a specific chamber set on a thermostable plate under the microscope at a constant temperature of 37 °C and constant CO<sub>2</sub> flux (10 l min<sup>-1</sup>). The lens used was a HC PL APO CS 20X dry 0.7 NA. Time-lapse images were recorded every 5 min during the first hour, and their migration was monitored every 10 min during the 24 h of the experiment in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO<sub>2</sub> at 37 °C. The resulting film was reconstructed using the LAS-AF (Leica Advanced Suite-Advanced Fluorescence) software. The time course of the formation of cellular aggregates within the matrix was measured by the extent of the total cell surface in pixels<sup>2</sup>, using the Image J software on the same plan of the Z-stack. A representation of surface occupied by the labeled cells, as a function of time was normalized to 100%, corresponding to the cell surface area at the beginning of the culture, and then studied during the first 24 h of culture, for HBMSCs–PDECs grown in co-culture with two different ratios of co-cultured cells, 1:1 and 1:4, as well as a monoculture of HBMSCs.

## **2.8. Quantitative real-time polymerase chain reaction (QPCR)**

Total RNA was extracted using the RNeasy Total RNA kit (Qiagen), and 1 µg was used as the template for single-strand cDNA synthesis by means of 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.5 mg oligo(dT)<sub>12–18</sub> and 200 U reverse transcriptase. After incubation at 42 °C for 50 min, the reaction was stopped at 70 °C for 15 min. cDNA (5 µl) diluted at a 1:80 ratio was loaded onto a 96-well plate. Real-time PCR amplification was performed with SYBR-Green Supermix (2 × iQ 50 mM KCl, 20 mM Tris–HCl, pH 8.4, 0.2 mM each dNTP, 25 U ml<sup>-1</sup> iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I and 10 nM fluorescein), stabilized in

sterile distilled water. Primers of ubiquitary ribosomic protein P0 (forward 5'-ATG CCC AGG GAA GAC AGG GC-3', reverse 5'-CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC-3'), ALP (forward 5'-AGC CCT TCA CTG CCA TCC TGT-3', reverse 5'-ATT CTC TCG TTC ACC GCC CAC-3'), COL1A1 (forward 5'-TGG ATG AGG AGA CTG GCA ACC-3', reverse 5'-TCA GCA CCA CCG ATG TCC AAA-3'), Cbfa1/runx2 (forward 5'-TCA CCT TGA CCA TAA CCG TCT-3', reverse 5'-CGG GAC ACC TAC TCT CAT ACT-3'), OCN (forward 5'-ACC ACA TCG GCT TTC AGG AGG-3', reverse 5'-GGG CAA GGG CAA GGG GAA GAG-3'), Cx43 (forward 5'-GGG CGT TAA GGA TCG GGT TAA GG-3', reverse 5'-GTT GGT GAG GAG CAG CCA TTG AA-3') and VE-cadherin (forward 5'-GGC TCA GAC ATC CAC ATA ACC-3', reverse 5'-CTT ACC AGG GCG TTC AGG GAC-3') were used at a final concentration of 200 nM. Data were analyzed using iCycler IQ software and compared by the  $\Delta\Delta CT$  method. QPCR was performed in triplicate for PCR yield validation. Results were expressed relative to gene expression levels on day 1. Each QPCR was performed in triplicate. Data were normalized to P0 (ribosomal protein) mRNA expression for each condition and quantified relative to cbfa1/runx2, ALP, VE-cadherin, Cx43, OCN and type I collagen (Col1A1) gene expression in HBMSCs cultured alone in the matrix after 24 h, which was standardized to 1.

## 2.9. Immunolabeling of proteins

The HBMSCs grown alone and co-cultured with PDECs in the 3-D matrix for 1, 3, 9 and 12 days were fixed with 4% (w/v) PFA at 4 °C for 30 min and permeabilized with Triton X-100 0.1% (v/v) for 30 min at 4 °C. Then they were incubated for 1 h in PBS 0.1 M, pH 7.4 (Gibco) containing 1% (w/v) BSA before incubation of primary antibodies mouse anti-VE-cadherin (diluted in PBS 1X with 0.5% (w/v) BSA at 1/500; Santa Cruz Biotechnology) or mouse pro-COL1A1 (diluted in PBS 1X with 0.5% (w/v) BSA at 1/500; TAKARA) overnight at 4 °C. Subsequently, cells were washed in PBS 0.1 M pH 7.4 (Gibco) and incubated with Alexa fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted at 1:4000 (molecular probes) for 2 h at 37 °C. Cells were incubated with the nuclear probe DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, FluoProbes 5 mg ml<sup>-1</sup>, dilution 1:5000) for 30 min at room temperature to label the nucleus and were thereafter observed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) equipped with a digital camera (Nikon Dxm 1200C, Japan). To localize Cx43, cells were incubated with primary mouse monoclonal antibody against Cx43 (Millipore) diluted 1:300 in PBS-BSA 1% (w/v). Subsequently, the cells were washed and incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (diluted at 1:300; Invitrogen) for Cx43. Cultures were examined with a fluorescence microscope (Leica DMi 3000 B) equipped with the appropriate epifluorescence filter sets described above.

## 2.10. Alkaline phosphatase (ALP) assay

Intracellular ALP activity was detected in cells 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 4% (v/w) PFA 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 on an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

## 2.11. Cryo-sections of tissue-engineered constructs for confocal microscopy

At the end of cell culture experiments, cellularized matrices were rinsed four times in PBS 0.1 M, pH 7.4, and then fixed for 30 min with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) at 4 °C. The matrices were then deposited on a glass slide, dried with a paper and then immersed in gel freeze for 1 min (Labonord SAS, Templemars, France) in isopentane at a temperature of -45 °C. Sections 10 µm thick were obtained using a cryostat (Leica CM 1850 UV) and were placed on glass slides previously covered with a layer of gelatin 2% (w/v) in order to allow their maintenance during the various stages of immunolabeling.

## **2.12. Von Kossa staining**

Von Kossa staining was performed to assess the level of calcium deposition by the HBMSCs and PDECs, cultured and co-cultured. After 1, 3, 9 and 12 days of culture, cells were fixed in 4% (w/v) PFA and incubated with 2.5% (w/v) silver nitrate for 30 min at room temperature in the dark. The silver nitrate was removed, and then the cells were rinsed with distilled water. Carbonate sodium/formalin solution (25 ml formalin, 5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 100 ml distilled water) was added to the cells for 1 min and the cells were rinsed with tap water. Extracellular matrix (ECM) staining was observed using an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

## **2.13. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9**

Matrix metalloproteinases (MMP) secreted by ECs are thought to play a key role in the processes of matrix remodeling and endothelial cell migration during angiogenesis [58]. In particular, the gelatinases MMP-9 and MMP-2 are involved in vascular cell migration [59]. Here, gelatinolytic activities of secreted MMP-2 and MMP-9 were analyzed by zymography on gelatin-containing polyacrylamide gels. Cells in mono- and co-cultures were seeded onto the matrices as previously described. The culture media previously collected and conserved after 1, 2, 7 and 24 h were used for these assays. The culture medium used for the cell culture of HBMSCs and PDECs was used as control. Briefly, samples were applied to 10% (w/v) polyacrylamide gels copolymerized with 1 mg ml<sup>-1</sup> gelatin. After electrophoresis, the gels were washed four times for 15 min in 2.5% (v/v) Triton X-100 to remove the SDS, followed by one wash of 10 min in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 M NaCl, and 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated in the same solution for 18 h. The gels were stained with 0.25% (v/v) Coomassie brilliant blue (50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) for 90 min at room temperature and destained in a water solution containing 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid, the gelatinase bands appearing as white on a blue background. The gels were scanned, and intensities were determined using the NIH 1.62 image analyzer software.

## **2.14. Gap junction inhibition with Cx43 mimetic peptide: 43 GAP27**

Gap junction communications involving Cx43 were inhibited using the synthetic connexin-mimetic peptide, 43 GAP27 (SRPTEKTIFII; GeneCust, Dudelange, Luxembourg), whose specificity was checked in a previous study [60] and [61]. Cells in mono-cultures and co-cultures were treated with 300 µM of 43 GAP27 during co-culture (from 1 to 12 days) before analysis of the cellular phenotype of the HBMSCs by QPCR.

## **2.15. Implantation of tissue-engineered constructs ectopically in mice**

The procedures and treatment of mice were based on the principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal

Care and Experiment Committee of University of Bordeaux Segalen. Experiments were carried out in accredited animal facilities according to European recommendations for laboratory animal care (directive 86/609 CEE of 24/11/86).

Scaffolds were preliminarily seeded with HBMSCs ( $4 \times 10^5$  cells) or with HBMSC–PDEC co-cultures (ratio 1:1) for 1 day before implantation. Matrices were implanted in dorsal subcutaneous sites of 12-week-old NOG mice weighing 25–30 g at 3 and 8 weeks. Five samples were used for histological analysis, for each condition and for each time of implantation. Five mice with two matrices were used for each condition. The animals were euthanized after 3 or 8 weeks. These times were chosen as an early and late time of ectopic implantation for providing data on biointegration and osteoinduction [62].

## **2.16. Histological analyses**

Three and eight weeks post-implantation, samples were retrieved, fixed in 4% (w/v) PFA for 4 h at 4 °C, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (4–5 µm thick) were de-paraffinized using toluene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100–50%), washed in distilled water and finally stained with Mayer’s hemalum and erythrosine Masson’s trichrome (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The samples were observed using a Nikon Eclipse 80i microscope. The osteoid tissue area on paraffin sections was quantified by ImageJ software. Two blades by sample, with 15 average fields were used for quantification.

## **2.17. Statistical analysis**

Data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation resulting from independent experiments. Two modes of analysis of variance were performed to compare the mean values between groups using the post hoc Bonferroni test. GraphPad Prism software (GraphPad Inc., San Diego California USA) was used for the statistical tests. Differences were considered significant when  $P < 0.05$  (\*); \*\* indicates a significant difference with  $P < 0.01$ ; \*\*\* indicates a significant difference with  $P < 0.001$ .

# **3. Results**

## **3.1. Cell culture of infected cells and phenotypic expression**

HBMSCs and PDECs infected by lentiviral transduction for expressing GFP and TdTomato were tested with flow cytometry for the presence or absence of lineage-specific markers and adhesion molecules (Fig. 1). Six independent samples of HBMSCs were analyzed, cultured in a basic culture medium (DMEM/F12) arising from the second subculturing for flow cytometry. HBMSCs, labeled with GFP, were positive for CD90, CD105 and CD73, and negative for CD34 and CD45, without significant differences from unlabeled HBMSCs (Fig. 1A). On three independent samples of TdTomato–PDEC, infected cells expressed as non-infected cells, von Willebrand factor and CD31 (Fig. 1B). Cells were negative for typical lymphocytic markers such as CD45 (Fig. 1B).

## **3.2. HBMSCs and PDECs form cellular aggregates within 3-D macroporous polysaccharide-based matrices**

Using GFP–HBMSCs (Fig. 1C) and TdTomato–PDECs (Fig. 1D), the present authors examined the behavior and distribution of HBMSCs co-cultured or not with PDECs, seeded within the 3-D porous polysaccharide-based scaffold. Time-lapse videomicroscopy revealed that HBMSCs in mono-culture, which had been initially dispersed within the 3-D structure after cell seeding (Fig. 2A), had migrated during the first 24 h of culture (Fig. 2C) to form well-organized cellular aggregates. These aggregates were  $150 \pm 50 \mu\text{m}$  on average and appeared homogeneously distributed within the pores of the matrix. The cell viability within these matrices was demonstrated using the LIVEDEAD® assay.

Cell aggregation within the matrix also occurred in co-culture of GFP–HBMSCs with TdTomato–PDECs (Fig. 2B, D). Strikingly, during the first 24 h of culture, the co-cultured TdTomato–PDECs migrated within the scaffold into a PDEC ring formed around the HBMSCs (Fig. 2D). The aggregates formed in the co-cultures were of comparable size to those observed in mono-cultures.

The time course of the formation of these cellular aggregates within the macroporous matrix was quantified in the GFP–HBMSCs mono-cultures and in the GFP–HBMSC/TdTomato–PDEC co-cultures (Fig. 2E). Co-cultures were performed in this experiment at two different cellular density ratios (HBMSC–PDEC 1:1 and HBMSC–PDEC 1:4). In mono-cultures, the cellular surface occupied by the cells within the matrix decreased with time of culture and became linear after 20 h (Fig. 2E). In the HBMSC–PDEC co-cultures, the surface occupied by the cells also decreased with time of co-culture and became linear before 17 h (Fig. 2E), whatever the ratio used for co-culturing the two cell types (1:1 or 1:4). These data suggest that cell migration occurred during this culture phase and that co-cultured cells exhibited a significant increase in cell migration from the dispersed cell state into aggregate formation in 24 h of 3-D co-culture.

### **3.3. MMP-2 and MMP-9 activities are increased in the 3-D co-cultures**

Zymography was used to check the activities of MMP-9 and MMP-2 secreted by cells in mono- and co-cultures in the 3-D polysaccharide-based matrix from 1 to 24 h of culture (Fig. 3). Zymography for MMP-9 (Fig. 3A) and quantitative data (Fig. 3B) evidenced a significant increase in MMP-9 activity in the HBMSC–PDEC co-culture after 24 h in 3-D compared with HBMSCs cultured alone in 3-D (Fig. 3A, B). For MMP-2, the ratio MMP-2a/MMP-2 was significantly increased after 7 h of HBMSC–PDEC co-culture (Fig. 3C, D).

### **3.4. HBMSCs and PDECs in 3-D co-cultures have cellular contacts**

The distribution of PDECs around the HBMSCs in 3-D co-culture, observed using TdTomato–PDECs (Fig. 4A), was confirmed by immunostaining of VE-cadherin after 1 day (D1) of co-culture (Fig. 4B). Confocal images observed at D1 revealed specific labeling at the periphery of the cellular aggregates, as shown by confocal images of co-cultured TdTomato–PDECs within the scaffold (Fig. 4A). Quantification of VE-cadherin mRNA levels from D1 to D12 in HBMSC–PDEC co-cultures demonstrated a substantial expression of this endothelial-specific marker molecule in the co-cultured PDECs after 3 days of co-cultures within the matrix (Fig. 4C). Thereafter, the expression of VE-cadherin decreased from D3 to D12.

Since a specific function of Cx43 that influences osteogenesis was evidenced in 2-D cultures between HBMSCs and ECs from umbilical vein (HUVEC), the expression of this junctional

protein in the 3-D co-cultured cells was studied. Immunolabeling of Cx43 was performed in HBMSCs and in 3-D HBMSC–PDEC co-cultures during 12 days of culture within the scaffold (Fig. 4D). Specific punctuated dots of Cx43 appeared mainly in the co-cultures from D1 to D12, well evidenced after 12 days of 3-D co-culture, although it was impossible to conclude about the nature of the labeled cells expressing this junctional protein within the 3-D matrix. However, some specific punctuated dots appeared at D12 in the periphery of the cellular aggregates where the PDECs are mainly located, as well as in the center of the aggregates composed mainly of HBMSCs (Fig. 4D).

QPCR revealed a significant increase in Cx43 mRNA level only in the 3-D HBMSC–PDEC co-cultures from D1 to D12 (Fig. 4E). After 12 days of co-culture, Cx43 mRNA level was 14-fold higher in the co-cultured samples than in the mono-culture groups.

### **3.5. Differentiation of HBMSCs in 3-D co-cultures within the matrix**

The phenotype of the HBMSCs–PDECs, co-cultured from 1 to 12 days (D1–D12) in the 3-D matrix, was first evaluated qualitatively by cytochemistry of ALP activity, immunostaining of type 1 collagen and Von Kossa staining, to assess the ability of these cells to undergo the osteoblastic phenotype within the 3-D scaffold in a cellular aggregate conformation. Both the aggregates formed in mono-cultures and co-cultures exhibited ALP activity (Fig. 5A) and were labeled for type I collagen, whatever the time of culture (Fig. 5B) from D1 to D12. Von Kossa staining (Fig. 5C) revealed calcium deposition within these cellular aggregates, which increased with time of culture, as evidenced after 12 days in both cultures.

### **3.6. Role of Cx43 in 3-D co-cultures within the polysaccharide-based matrix**

The level of expression of the bone-specific markers, i.e., *cbfa1/runx2*, ALP, *Col1A1* and OCN was quantified by QPCR in cells cultured in the 3-D scaffold for 12 days. Moreover, to investigate the role of gap junctions and the function of Cx43, over-expressed in the 3-D co-culture (Fig. 5), the mRNA levels of specific osteoblastic markers were quantified, as well as the junctional proteins, i.e., VE-cadherin and Cx43, in mono-culture and co-culture in the presence or not of the peptide 43 GAP27, a specific inhibitor of Cx43.

In the absence of inhibitory peptide, the direct contact of HBMSCs with PDECs within the polysaccharide-based matrix increased the expression of *cbfa1/runx2* (Fig. 6A) after 3 days of co-culture compared with mono-cultures. Their level of expression remained significantly higher over the course of the co-culture. Co-cultured HBMSCs also showed a higher level of ALP mRNA (Fig. 6B) after 3 days of co-culture. Their expression decreased after 9 and 12 days of co-culture, but the ALP mRNA level remained higher in the co-cultured cells than in the mono-cultured cells at all 3-D culture times. For *Col1A1* (Fig. 6C), it was significantly up-regulated in the co-cultures up to 9 days compared with HBMSCs alone (Fig. 6C). The maximal *Col1A1* expression was observed in the 3-D co-cultures after 12 days, where the level was at least 30-fold higher than in the HBMSCs group. The undifferentiated HBMSCs showed a low level of expression for *Col1A1*, irrespective of the time of culture.

With regard to the late osteoblastic-specific marker (Fig. 6D), the OCN mRNA level was also up-regulated by the 3-D co-culture, the expression starting at D3 and increasing with time of co-culture. The level of expression in HBMSCs alone remained unchanged by this 3-D culture over the time of culture.

The addition of the peptide mimetic 43 GAP27 significantly decreased the mRNA level of both early (cbfa1/runx2, ALP, Col1A1) and late (OCN) osteoblastic marker expression in the 3-D co-culture from D1 to D12, whatever the time of co-culture.

In mono-culture, inhibition of junctional activity with the peptide mimetic 43 GAP27 significantly decreased the mRNA level of cbfa1/runx2 in HBMSCs cultured alone, only from D3 to D12 (Fig. 6A). A substantial negative effect of the peptide 43 GAP27 was observed for OCN expression in HBMSCs cultured alone for 9 days. However, this inhibitory effect on OCN mRNA levels induced by the 43 GAP27 peptide occurred only at D9.

Addition of the peptide mimetic 43 GAP27 significantly decreased the mRNA level of the junctional protein Cx43 (Fig. 6E), both in HBMSC mono-culture and in HBMSC–PDEC co-cultures, whatever the time of 3-D culture. After 12 days of 3-D co-culture, the inhibition by the peptide mimetic 43 GAP27 was markedly evidenced.

The over-expression of VE-cadherin (only expressed in PDECs) in the co-cultured cells at D3 was significantly abolished by the 43 GAP27 peptides (Fig. 6F).

### **3.7. HBMSCs and PDECs in 3-D co-cultures induce osteoid formation ectopically**

After 3 weeks of implantation (Fig. 7A), scaffolds seeded with the two cell types (Fig. 7A4) showed macroscopically a vascular network around the implants connected with the vasculature of the host tissue compared with scaffold seeded with HBMSCs alone (Fig. 7A1). Histological analysis (Fig. 7A2–A6) revealed new osteoid formation in the implants seeded with stem cells in mono-cultures or in co-cultures. Quantitative data (Fig. 7C) showed that the osteoid surfaces of the HBMSC–PDEC co-cultures within the matrix increased significantly, as well as the fraction of osteoid surfaces in the implant, and remained higher than those quantified within the implant cellularized with HBMSCs alone.

After 8 weeks of implantation (Fig. 7B), the amount of osteoid tissue increased with time of implantation in the mono-culture and co-culture groups, and remained significantly higher after 8 weeks of implantation of scaffolds with HBMSCs–PDECs (Fig. 7C) compared with scaffolds with HBMSCs alone.

## **4. Discussion**

In bone tissue engineering, ensuring differentiation of seeded cells on scaffolds is important for successful transplantation, especially when MSCs are combined with a scaffold. In addition, current progress in bone tissue engineering has revealed the tremendous potential of vascularization strategies for the treatment of bone fracture and fracture non-union. Improvement in vascularization in tissue-engineered constructs by implementation of ECs or their progenitors may play a key role in engineering bone constructs of large dimensions. The process of angiogenesis and osteogenesis is thought to be dependent on a close interaction between the bone-forming cells and the ECs. This study demonstrates that the biodegradable natural scaffold composed of pullulan and dextran offers a 3-D microenvironment to promote cell interactions between human stem cells by inducing multicellular aggregates, the establishment of junctional proteins, and a resulting activation of osteoblastic differentiation of HBMSCs stimulated by the presence of PDECs within the scaffolds. Regarding the choice of this scaffold, the characteristics of bone, especially in regard to mechanical properties, are not the goals for the starting material, since a stimulation of bone formation by resident cells

and/or delivered cells with inducers is then expected. For the implanted biomaterials that should facilitate early mineralization and support new bone tissue formation, cell organization and differentiation are key steps in the neo-tissue formation. The biomaterials could thus favor these biological cell requirements (3-D organization, cell communication, adjustable scaffold degradation kinetics, local sequestration of biochemical cues). In this context, this matrix meets these specifications.

The macroporous hydrophilic matrix used in this study is composed of natural polysaccharides, pullulan and dextran, and has already been used in cell therapy [48]. Pullulan and dextran are hydrophilic, and their biochemical similarity with the ECM is the rationale for their use as biodegradable scaffolds for tissue engineering [63]. Pullulan is an attractive biomaterial, thanks to its good mechanical properties and biocompatibility, and it is neutral, linear and non-immunogenic [64]. This 3-D structure was prepared by cross-linking the biopolymers in the absence of organic solvents. A cross-linking process carried out in aqueous conditions provided a simple method of obtaining a polysaccharide-based scaffold [65]. Investigations combining cross-linking with a porogen agent and a salt-leaching technique allowed preparation of porous scaffolds of controlled porosity that could be colonized by various cell types, including MSCs [50] and [51]. In this work, the matrix exhibits an interconnected porosity of 37% and pore sizes between 40 and 200  $\mu\text{m}$ , but the porosity could be increased to  $> 50\%$  to improve tissue infiltration [66]. In addition, the chemical versatility of these scaffolds makes it possible to include other components in the 3-D structure to improve the cell responses as well a specific function [56].

One specification of this matrix is their ability to improve the cellular interactions between the resident cells through Cx43 activities. To the present authors’ knowledge, this is the first study to report the direct function of Cx43 in a co-culture of human MSCs and human endothelial progenitor cells within a macroporous scaffold to promote osteoblastic differentiation of MSCs. These events were associated with an increase in MMP-2a and MMP-9 activities, although the specific function of MMP-9 and MMP-2 in aggregate formation remains unknown.

The aggregate conformation of the co-cultured cells in the 3-D matrices was unexpected. Most of the scaffolds used for tissue engineering, such as polyurethane [22], polycaprolactone starch scaffold [67], polylactic acid [20] seeded with ECs and osteoblastic cells from different sources and different stages of cell differentiation, support the formation of tube-like structures and vessel-like formation. In contrast to these other tissue-engineered constructs or scaffolds used for co-culturing stem cells, the matrix of pullulan/dextran promoted the formation of multicellular aggregates, such as spheroids, distributed homogeneously within the matrix pores. These results may also originate from the cell source and the stage of cell differentiation used for the 3-D co-cultures. Previous studies showed that different osteoblastic cells (human, murine, differentiated or undifferentiated) combined with different endothelial cell types (microvascular ECs, macrovascular ECs, endothelial progenitors of differentiated cells) may possess different morphological organizations when combined within a 3-D scaffold. For example, Fuchs et al. [14] demonstrated that OEC from human peripheral blood are able to form an interconnected network of cord-like structures when co-cultured with the osteosarcoma cell line MG63. This study used human MSCs from bone marrow, which are non-hematopoietic cells (CD34-, CD45-) expressing the markers CD105, CD73 and CD90. Human PDECs used in the co-culture are positive for CD31 and von Willebrand factor and negative for CD45. Before using MSCs expressing GFP and PDECs

expressing TdTomato in co-cultures within the scaffold, it was checked that their phenotype was unchanged by lentiviral infection.

These labeled cells were used here to assess the distribution of the respective co-cultured cells within the matrix. After 24 h, most of the red-stained cells (PDECs) were located around the MSCs expressing GFP. This location was evidenced by confocal imaging of TdTomato–PDECs in the 3-D scaffold and was confirmed by VE-cadherin immunostaining. Spheroidal co-cultures of osteoprogenitor cells and ECs have been reported before [19], [64] and [65]. The assays were performed with a spheroid co-culture model by incorporating OB cells into the EC spheroids, which were seeded or not on a collagen matrix. The co-cultures led to the formation of a 3-D prevascular network inside the spheroids [68]. In contrast, Stahl et al. [19] reported that spheroid co-cultures differentiate spontaneously into a core of OBs and a surface layer of ECs. In the same context, the PDEC and HBMSC aggregates in the present work were formed inside the pores of the macroporous matrix, but the endothelial cell organization was not dependent on the ratio used for the 3-D co-culture. Matrices seeded with a higher percentage of PDECs (HBMSC–PDEC used at 1:4) showed a similar organization of endothelial cell structures.

Since the HBMSC–PDEC co-cultures were initiated from a dispersed cell population, time-lapse videomicroscopy performed during the first 24 h suggested that the cells were capable of migrating within the scaffolds, and that the combination of endothelial progenitor cells with MSCs increased the kinetic of formation of the cellular aggregates. Recently, Shah et al. [20] observed the migration patterns of primary osteoblast cells and endothelial cells (HUVEC) in co-culture within a composite scaffold composed of hydroxyapatite and polylactic acid. They demonstrated that the ECs did not migrate to the same extent in co-culture with osteoblastic cells as they did in mono-culture. The exact mechanism of this occurrence is still unknown, but it is thought to be due to VEGF secretion, an angiogenic factor produced by the MSCs. Previous work performed in 2-D and in 3-D alginate microspheres loaded with MSCs and HUVEC [28] demonstrated an increase in VEGF165 secretion by HBMSCs and an up-regulation of the VEGF-R1 and VEGF-R2 in the co-cultured HUVEC.

Among the other factors required for cell migration and angiogenesis, mesenchymal cell types are known to promote up-regulation of a different set of endothelial cell proteases used in vessel morphogenesis and endothelial cell migration, including the MMP [69]. HBMSCs and HUVEC in a 2-D co-culture have been shown to up-regulate MMP-2 expression in the self-assembled network formed when HUVEC and HBMSCs were co-cultured together on plastic culture dishes, although the active form MMP-2a was undetectable, even though the MMP-2 inhibitor I prevented the self-assembled network observed in 2-D co-culture [70]. In these 3-D cultures, MMP-2 was found in its active form. The PDEC–HBMSC co-culture in the matrix stimulates the activities of MMP-2a and MMP-9, as shown by zymographic analysis after 7 h and 24 h of co-culture compared with mono-cultures of HBMSCs, respectively.

The formation of these specific cellular organizations contributes to an increase in the cross-talk between the two cell types, which in turn influences the reciprocal activities of PDECs and HBMSCs [17]. These effects are thought to be due to junctional communications between the co-cultured cells, since they are observed only when the cells are touching each other. In this study, there was evidence of the formation of VE-cadherin between the PDECs in the cellular aggregates, a junctional protein that was up-regulated after 3 days of co-culture. The fact that VE cadherin expression decreased between D3 and D12, combined with a lower

TdTomato–PDEC signal after 3 days of co-culture, suggests the senescence of the PDECs in the long-term co-culture period. In turn, this suggests that they do not survive in these static culture conditions, since the diffusion of oxygen and nutrients was probably limited within the scaffolds. Similarly, Stahl et al. [19] showed that, when ECs and osteoblastic cells are co-cultured together, the senescence of ECs is rapidly induced in static co-culture conditions. More recently, MSCs have been shown to inhibit endothelial proliferation and angiogenesis after cell–cell contact through modulation of the VE-cadherin and -catenin signaling pathway [71]. In the present co-culture, the up-regulation of VE-cadherin after 3 days of co-culture, followed by a decrease in its expression and a decrease in immunostaining, may be the result of the disruption of the VE-cadherin/-catenin interaction, which could abrogate the functionality of the co-cultured ECs.

The present findings also demonstrate that gap junctions were formed between the MSCs and/or between the PDECs. As observed in 2-D co-cultures between HBMSCs and HUVEC [18], there was evidence that Cx43 was up-regulated from day 3 to day 12 in MSCs and HUVEC co-cultured in the scaffold. Immunostaining of Cx43 suggested the formation of gap junctions between HBMSCs. The evidence of Cx43 between PDECs and HBMSCs was interesting in the 3-D matrix, although specific labeling was observed in the periphery of the aggregates composed mainly of PDECs. The use of a specific inhibitor to Cx43, the 43 GAP27 peptide, directed against the extracellular domains of connexin, significantly decreased the cell communication occurring between the PDECs, between the HBMSCs or between the PDECs and HBMSCs, by a down-regulation of VE-cadherin, and strikingly reduced the Cx43 expression in the co-cultured cells. Various studies have indicated that gap junction formation is dependent on the assembly of the adherens junctions. This was first demonstrated by studies in which antibody-mediated disruption of cadherin-containing cell adhesion contacts was shown to block gap junction formation [72] and [73]. In the same context, when gap junction antibodies were injected into 2-cell mouse embryos, the latter failed to undergo compaction, a process regulated by cadherins [74]. In another study, treatment of cells with Fab fragments targeting Cx43 blocked gap junctions as well as adherens junction formation [75]. Together, these findings indicate that the processes of gap junction formation and adherens junction formation are intimately linked. The massive increase in Cx43 mRNA level in the 3-D co-cultures correlates with the osteoblastic differentiation of HBMSC when they were co-cultured with PDECs. Once the spheroid network was formed, there began the osteoblastic differentiation of HBMSCs co-cultured or not with PDECs, and cells formed a mineralized tissue inside the cellular aggregates within 1 week.

This phenomenon is in accordance with the role of the 3-D microenvironment to promote osteogenesis. As observed here, the spheroid configuration inside the scaffold promotes 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 has also been demonstrated in the literature with MSCs [76] and embryonic stem cells [77] cultured alone.

Quantitative analysis performed by QPCR confirmed the increased expression of all bone-specific markers in the co-cultured cells compared with mono-cultures, with a different kinetic of expression according to the bone markers. *Cbfa1*, an early bone-specific marker, was over-expressed from D3 to D9 in the co-cultures, then decreased at D12, but remained higher in the co-cultured cells, whatever the time of culture. The same pattern of expression was observed for ALP. The maximal stimulation of ALP mRNA occurred after 3 days of 3-D

co-cultures and then decreased. Regarding the late osteoblastic marker OC, which is involved in the mineralization matrix, its expression increased in the co-cultured cells from D3 to D12. The calcium deposition in the matrix confirmed the mineralization of the ECM. The mRNA expression profiles of these osteogenic markers are in agreement with other reports describing osteogenic differentiation of 3-D cultured MSCs in several bone substitutes, suggesting that the chemical nature and the 3-D structure of this scaffold can drive the fate of stem cell differentiation to osteoblastic lineage. In addition, the present results suggest that Cx43 is a critical parameter in the osteoblastic differentiation of MSCs in this 3-D matrix. Support for this concept is the massive increase in Cx43 in the 3-D HBMSC–PDEC co-culture as well the inhibitory effect of peptide 43 GAP27, which is specific to Cx43, on the osteoblastic differentiation of co-cultured HBMSCs induced by the cell–cell contact with PDECs. Such a peptide allows the treatment of 3-D cultures over 12 days and abolishes the expression of early and late osteoblastic markers in co-cultured cells and in mono-cultures. This finding also suggests that both homotypic and heterotypic junctions play a fundamental role in promoting osteogenesis and bone formation.

Finally, the fate after subcutaneous implantation of the tissue-engineered constructs exhibiting cellular aggregates confirmed that the 3-D co-cultures significantly increased osteoid formation compared with the scaffold loaded only with HBMSCs. This confirms the importance of the vascular environment for bone tissue engineering [78] and [79] and shows that the aggregate conformation of stem cells in a 3-D matrix can generate bone formation and mineralization.

Future studies should focus on the signaling pathways involved in the heterotopic communication produced by 3-D HBMSC–PDEC co-cultures and which act on bone formation. Taken together, the present results show that the use of cellular aggregates with cell–cell contact in an appropriate porous scaffold holds potential for optimizing therapeutic strategies involving MSCs and endothelial progenitor cells for bone tissue regeneration.

## Acknowledgements

This work was supported by Grants from INSERM (National Institute for Health and Medical Research), from University Bordeaux Segalen, Universities of Paris 7 and Paris 13, and by Grants from the French Research National Agency (ANR-09-EBIO-001 3-D Cell; ANR-07-TecSan-011, ITOV ANR-10-EMMA-009-01 MATRI+; ANR-12-TecSan-0011 INEOV). Thanks to the Bio Imaging Center (BIC) Bordeaux Segalen University, Bordeaux, France for the use of their Time Lapse Videomicroscopy. Thanks also to R. Cooke for editing the manuscript.

## References

- [1] Vail TP, Urbaniak JR. Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:204.
- [2] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005;4:518.
- [3] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering *Trends Biotechnol* 2008;26:434.
- [4] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:300.

- [5] Moon JJ, West JL. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials. *Curr Top Med Chem* 2008;8:300.
- [6] Das A, Botchwey E. Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:403.
- [7] Buschmann J, Welti M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, et al. 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* 2011;17:291.
- [8] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 2005;26:1857.
- [9] Rouwkema J, Westerweel PE, de Boer J, Verhaar MC, van Blitterswijk CA. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2015.
- [10] Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EH. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. *J Endod* 2012;38:454.
- [11] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2012;30:1507.
- [12] Fuchs S, Jiang X, Schmidt H, Dohle E, Ghanaati S, Orth C, et al. Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using outgrowth endothelial cells. *Biomaterials* 2009;30:1329.
- [13] Correia C, Grayson WL, Park M, Hutton D, Zhou B, Guo XE, et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One* 2011;6:e28352.
- [14] Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, et al. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on in vivo vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 2009;30:526.
- [15] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:284.
- [16] Seebach C, Henrich D, Kahling C, Wilhelm K, Tami AE, Alini M, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1961.
- [17] Grellier M, Bordenave L, Amedee J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2009;27:562.
- [18] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* 2008;42:1080.
- [19] Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bidirectional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in

a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:684.

[20] Shah AR, Shah SR, Oh S, Ong JL, Wenke JC, Agrawal CM. Migration of cocultured endothelial cells and osteoblasts in composite hydroxyapatite/ polylactic acid scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2011;39:2501.

[21] Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C775.

[22] Hofmann A, Ritz U, Verrier S, Eglin D, Alini M, Fuchs S, et al. The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3-D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials* 2008;29:4217.

[23] Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2199.

[24] Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time-dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif* 2012;45:320.

[25] Leszczynska J, Zyzynska-Granica B, Koziak K, Ruminski S, Lewandowska-Szumiel M. Contribution of endothelial cells to human bone-derived cells expansion in coculture. *Tissue Eng Part A* 2013;19:393.

[26] Paletta JR, Mack F, Schenderlein H, Theisen C, Schmitt J, Wendorff JH, et al. Incorporation of osteoblasts (MG63) into 3-D nanofibre matrices by simultaneous electrospinning and spraying in bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011;21:384.

[27] Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 2007;28:3965.

[28] Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 2009;30:3271.

[29] Zhao X, Liu L, Wang FK, Zhao DP, Dai XM, Han XS. Coculture of vascular endothelial cells and adipose-derived stem cells as a source for bone engineering. *Ann Plast Surg* 2012;69:91.

[30] Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y. Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrowderived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater* 2013;9:4906.

[31] Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors *Tissue Eng* 2001;7:679.

[32] Thebaud NB, Siadous R, Bareille R, Remy M, Daculsi R, Amedee J, et al. Whatever their differentiation status, human progenitor derived – or mature – endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6:e51.

- [33] Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, et al. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:325.
- [34] Syed-Picard FN, Jayaraman T, Lam RS, Beniash E, Sfeir C. Osteoinductivity of calcium phosphate mediated by connexin 43. *Biomaterials* 2013;34:3763.
- [35] Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:1909.
- [36] Chaible LM, Sanches DS, Cogliati B, Menecier G, Dagli ML. Delayed osteoblastic differentiation and bone development in Cx43 knockout mice. *Toxicol Pathol* 2011;39:1046.
- [37] Li H, Daculsi R, Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amedee J. Role of neuralcadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C422.
- [38] Dogan A, Yalvac ME, Sahin F, Kabanov AV, Palotas A, Rizvanov AA. Differentiation of human stem cells is promoted by amphiphilic pluronic block copolymers. *Int J Nanomedicine* 2012;7:4849.
- [39] Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:423.
- [40] Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, Hemmi H, Hayata T, Nakashima K, et al. Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. *J Cell Physiol* 2009;220:1.
- [41] Santo VE, Frias AM, Carida M, Cancedda R, Gomes ME, Mano JF, et al. Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2009;10:1392.
- [42] Tanase CE, Popa MI, Verestiuc L. Biomimetic chitosan–calcium phosphate composites with potential applications as bone substitutes: preparation and characterization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100:700.
- [43] Xia Y, Mei F, Duan Y, Gao Y, Xiong Z, Zhang T, et al. Bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and an injectable sodium alginate/gelatin scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2012;100:1044.
- [44] Aravamudhan A, Ramos DM, Nip J, Harmon MD, James R, Deng M, et al. Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering *J Biomed Nanotechnol* 2013;9:719.
- [45] Liu W, Zhang J, Weiss P, Tancrét F, Bouler JM. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. *Acta Biomater* 2013;9:5740.
- [46] Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:857.
- [47] Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:336.
- [48] Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Letourneur D. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels *J Biomed Mater Res A: Meddahi-Pelle A*; 2011.

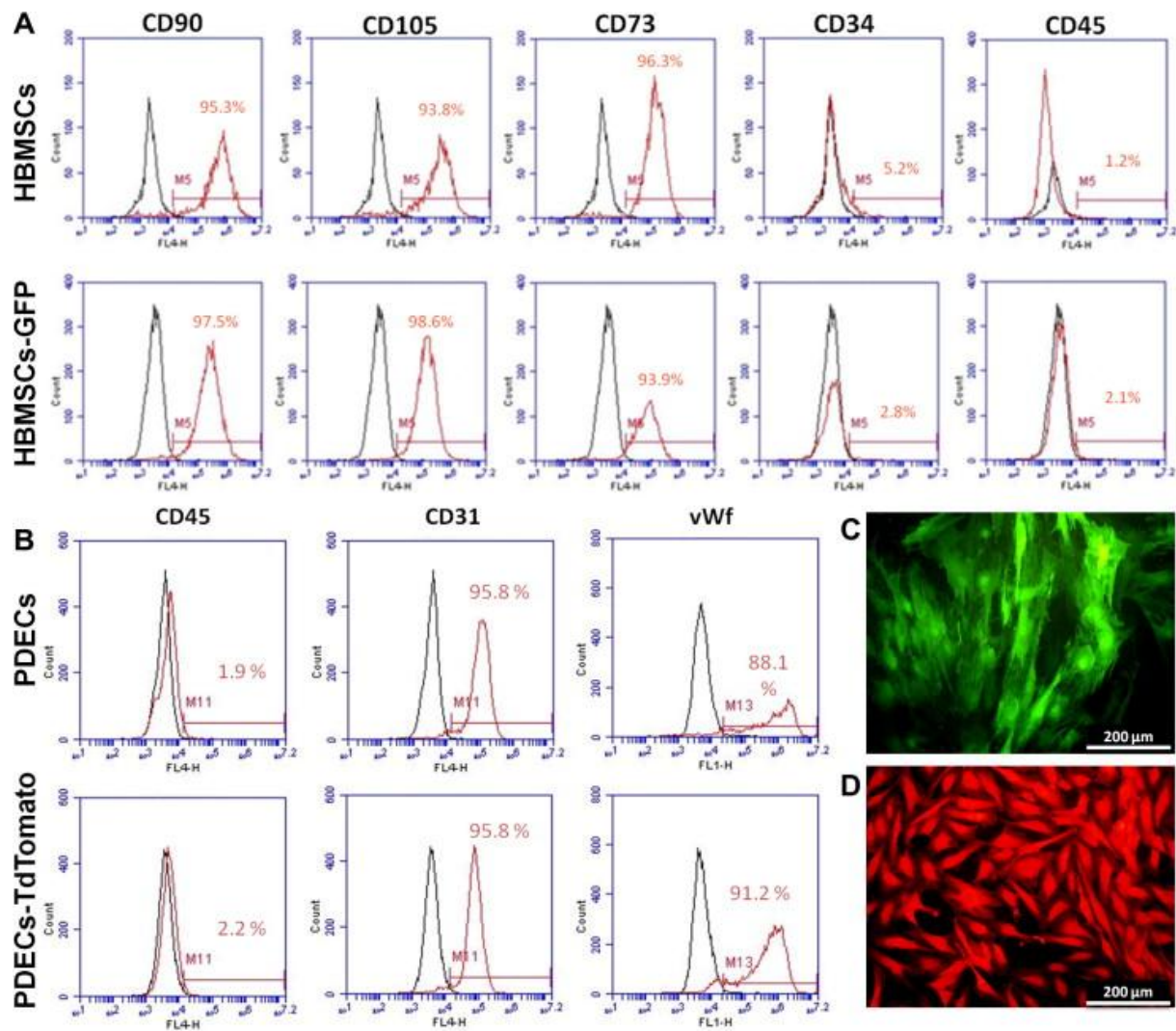
- [49] Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:339.
- [50] Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011;21:341.
- [51] Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L, Mougenot N, et al. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A* 2012;18:35.
- [52] Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/crosslinking process. *Acta Biomater* 2010;6:3640.
- [53] Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G, Le Visage C. Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci* 2012;12:901.
- [54] Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993;29A:699.
- [55] Thebaud NB, Bareille R, Remy M, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4:473.
- [56] Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite–pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013;34:2947.
- [57] Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004;22:1567.
- [58] Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D’Orazi G, Murphy AN, et al. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 1993;156:235.
- [59] Lieu S, Hansen E, Dedini R, Behonick D, Werb Z, Miclau T, et al. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis Model Mech* 2011;4:203.
- [60] Billaud M, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS One* 2009;4:e6432.
- [61] Evans WH, Leybaert L. Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Commun Adhes* 2007;14:265.
- [62] Prins HJ, Fernandes H, Rozemuller H, van Blitterswijk C, de Boer J, Martens AC. Spatial distribution and survival of human and goat mesenchymal stromal cells on hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *J Tissue Eng Regen Med* 2012.
- [63] Gloria A, De Santis R, Ambrosio L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering *J Appl Biomater Biomech* 2010;8:57.

- [64] Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr Res* 2004;339:447.
- [65] Lack S, Dulong V, Picton L, Le Cerf D, Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr Res* 2007;342:943.
- [66] Derkaoui SM, Labbe A, Purnama A, Gueguen V, Barbaud C, Avramoglou T, et al. Films of dextran-graft-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. *Acta Biomater* 2010;6:3506.
- [67] Fuchs S, Jiang X, Gotman I, Makarov C, Schmidt H, Gutmanas EY, et al. Influence of polymer content in Ca-deficient hydroxyapatite–polycaprolactone nanocomposites on the formation of microvessel-like structures. *Acta Biomater* 2010;6:3169.
- [68] Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue eng* 2006;12:2685.
- [69] Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9:267.
- [70] Li H, Daculsi R, Bareille R, Bourget C, Amedee J. UPA and MMP-2 were involved in self-assembled network formation in a two dimensional co-culture model of bone marrow stromal cells and endothelial cells. *J Cell Biochem* 2013;114:650.
- [71] Menge T, Gerber M, Wataha K, Reid W, Guha S, Cox Jr CS, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit endothelial proliferation and angiogenesis via cell–cell contact through modulation of the VE-Cadherin/beta-catenin signaling pathway. *Stem Cells Dev* 2013;22:148.
- [72] Hertig CM, Eppenberger-Eberhardt M, Koch S, Eppenberger HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell–cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J Cell Sci* 1996;109:1. Pt 1.
- [73] Hertig CM, Butz S, Koch S, Eppenberger-Eberhardt M, Kemler R, Eppenberger HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. II. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell–cell contact and communication. Formation of two distinct N cadherin/catenin complexes. *J Cell Sci* 1996;109:11. Pt 1.
- [74] Lee S, Gilula NB, Warner AE. Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development *Cell* 1987;51:851.
- [75] Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 1992;119:179.
- [76] Burns JS, Rasmussen PL, Larsen KH, Schroder HD, Kassem M. 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* 2010;16:2331.
- [77] Gothard D, Roberts SJ, Shakesheff KM, Buttery LD. Engineering embryonic stem-cell aggregation allows an enhanced osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:583.
- [78] Cai L, Wang Q, Gu C, Wu J, Wang J, Kang N, et al. Vascular and microenvironmental influences on MSC-coral hydroxyapatite construct-based bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011;32:8497.

RESULTATS – II. Interactions cellulaires entre les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse et des progéniteurs endothéliaux au sein d’une matrice tridimensionnelle de polysaccharides

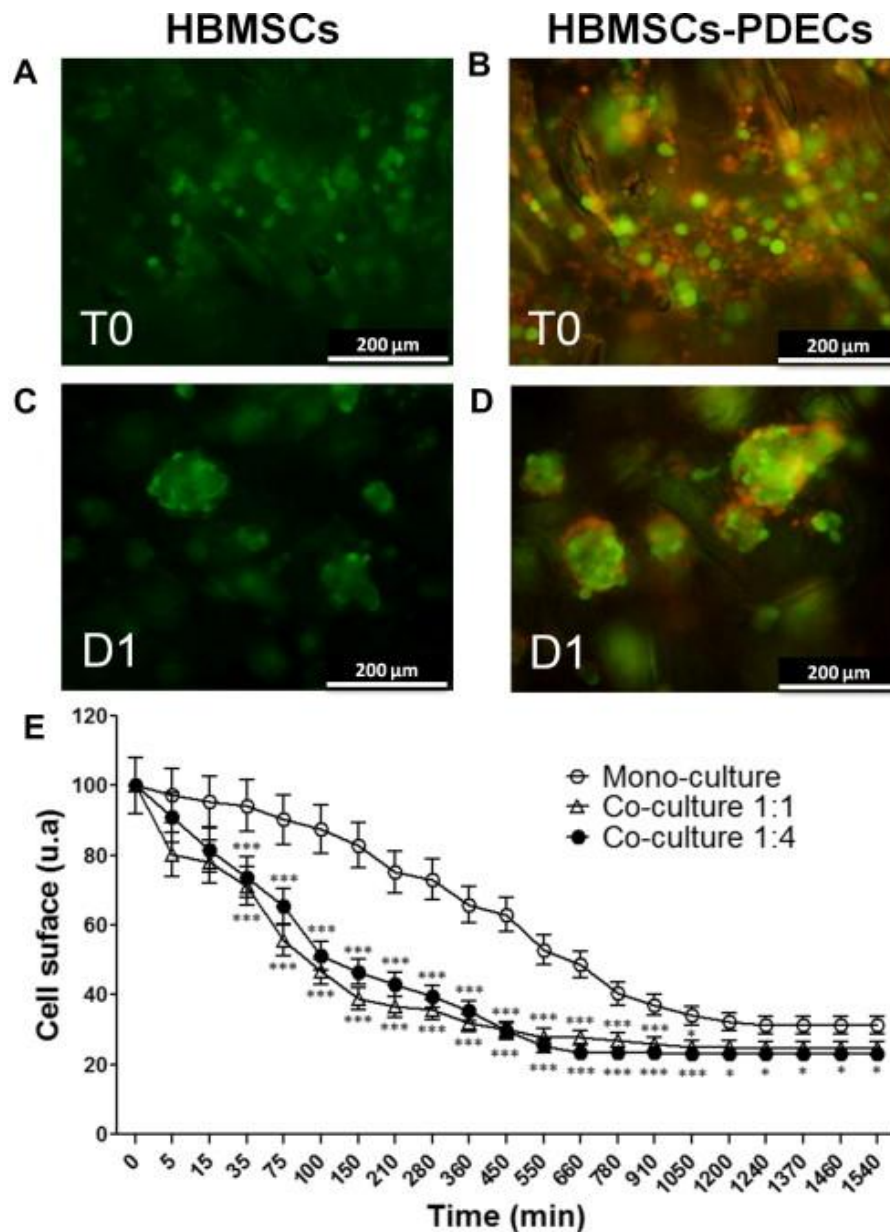
[79] Wang J, Ye Y, Tian H, Yang S, Jin X, Tong W, et al. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:143.

## Figures and Legends



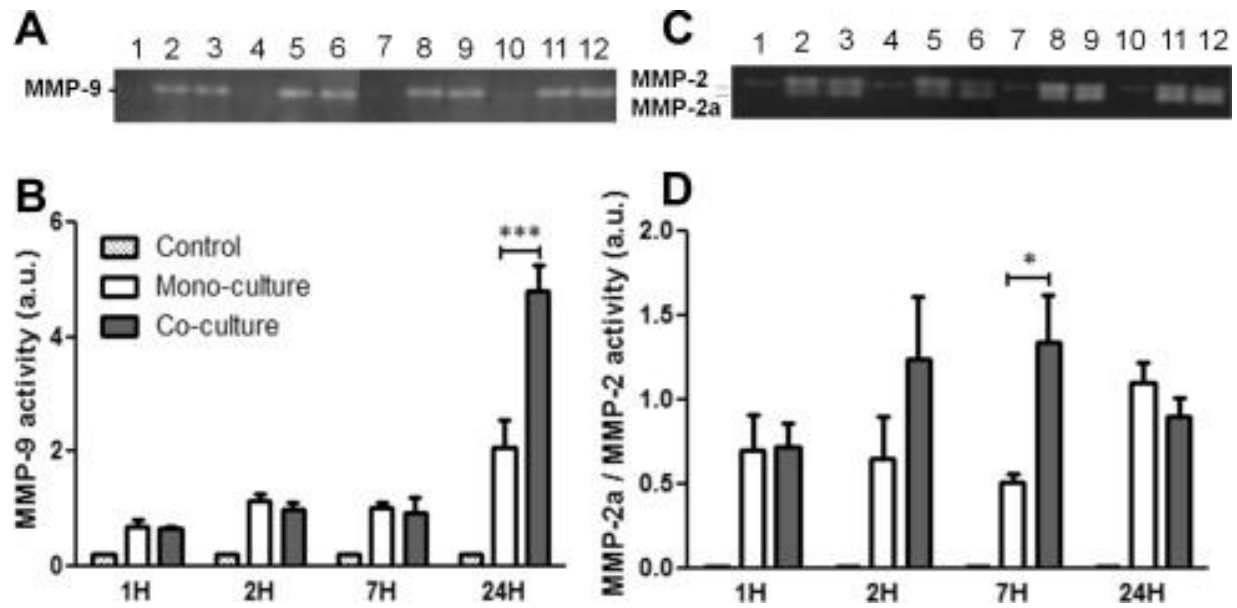
**Figure 1. Analysis of HBMSCs and PDECs expressing or not expressing GFP and TdTomato.**

(A) Characterization by flow cytometry of HBMSCs and GFP-HBMSCs stained with markers CD90, CD105, CD73, CD34 and CD45. (B) Characterization by flow cytometry of PDECs and TdTomato-PDECs stained with markers CD45, CD31 and von Willebrand factor (vWf). (C) Fluorescence microscopic analysis of GFP-HBMSCs. (D) Fluorescence microscopic analysis of TdTomato-PDECs.



**Figure 2. Time-lapse videomicroscopy of HBMSCs and PDECs in mono-culture and co-culture within scaffold.**

(A) Fluorescence microscopic analysis of GFP-HBMSCs (A, C) in co-culture with PDECs (B, D) after cell seeding (T0) (A, B) within polysaccharide-based scaffold or after one day of culture (D1) (C, D). (E) Time course of formation of multicellular aggregates in mono-culture of HBMSCs and in co-culture of HBMSCs-PDECs used at two different ratios (1:1 and 1:4). Time course was measured by extent of total labeled cell surfaces in pixels<sup>2</sup>, using Image J software. Data are expressed as representative surface as a function of time, normalized at 100% after cell seeding (T0). Three independent experiments were performed. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

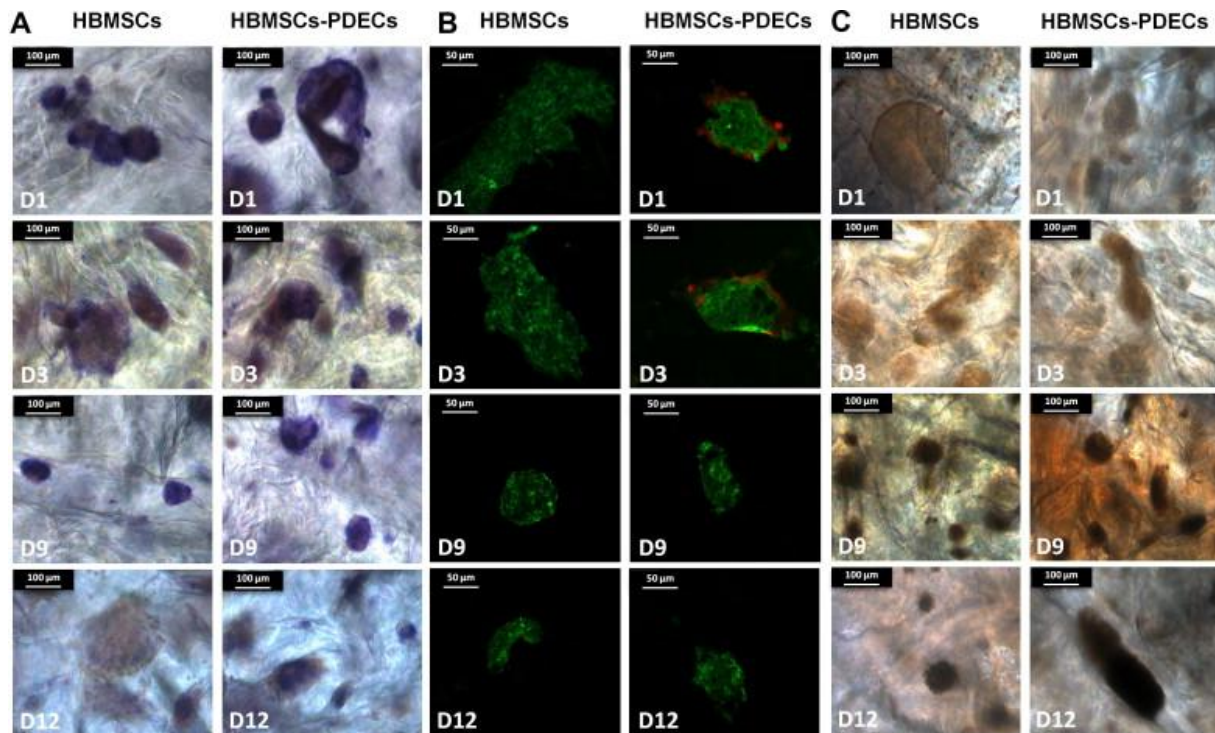


**Figure 3. Gelatin zymography analysis of MMP-9 and MMP-2.**

(A) Zymography of MMP-9 in culture media of HBMSCs in mono-culture or in HBMSC–PDEC co-culture after 1 h (1H, lanes 1–3), 2 h (2H, lanes 4–6), 7 h (7H, lanes 7–9) and 24 h (24H, lanes 10–12). (B) Quantitative analysis of gelatinase activities: culture medium used for cell culture of HBMSCs and PDECs was used as control (lanes 1, 4, 7, 10). (C) Zymography of MMP-2 in culture media of HBMSCs in mono-culture or in HBMSC–PDEC co-culture after 1 h (1H, lanes 1–3), 2 h (2H, lanes 4–6), 7 h (7H, lanes 7–9) and 24 h (24H, lanes 10–12). (D) Quantitative analysis. Three independent experiments were performed. \* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

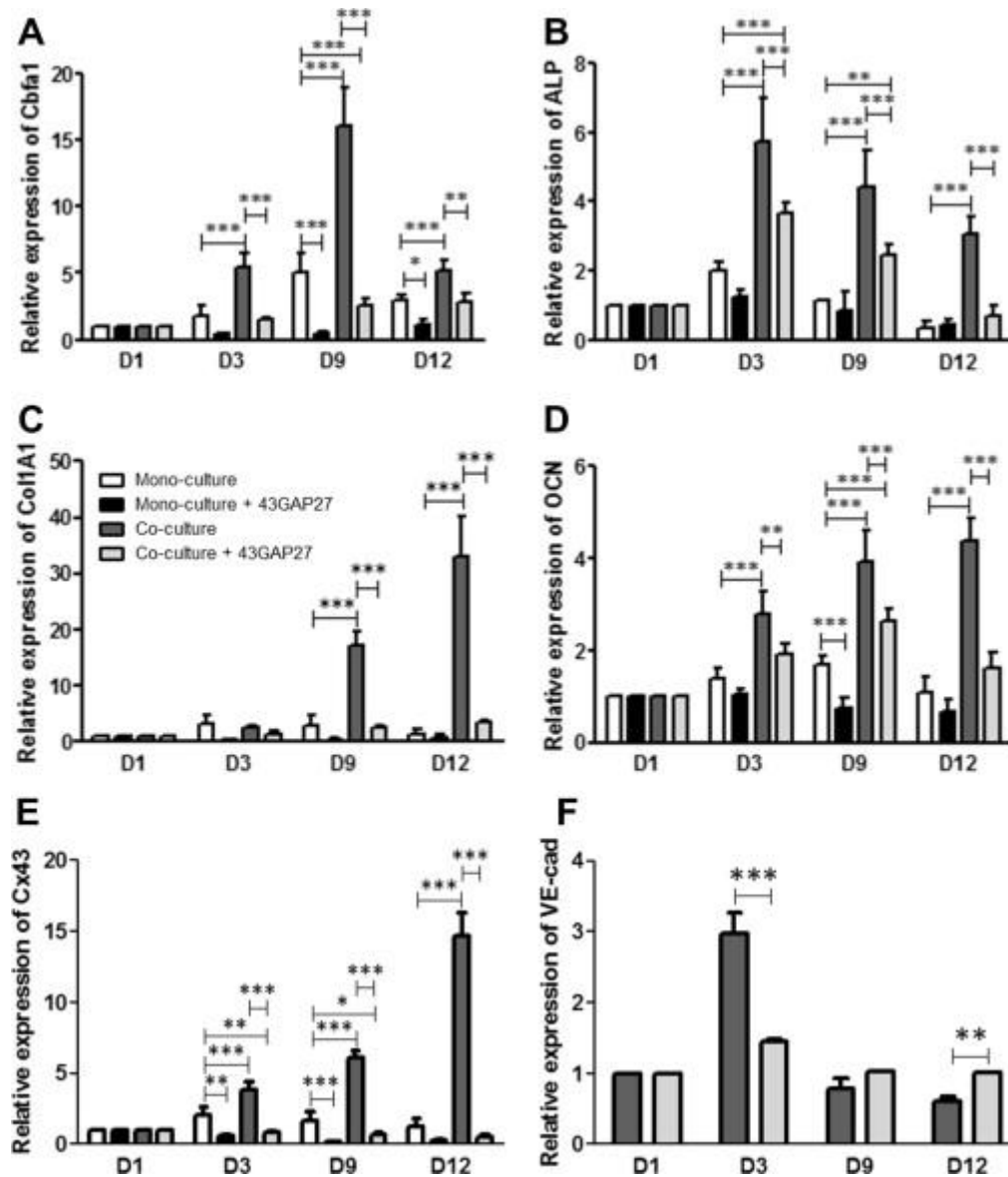


RESULTATS – II. Interactions cellulaires entre les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse et des progéniteurs endothéliaux au sein d’une matrice tridimensionnelle de polysaccharides



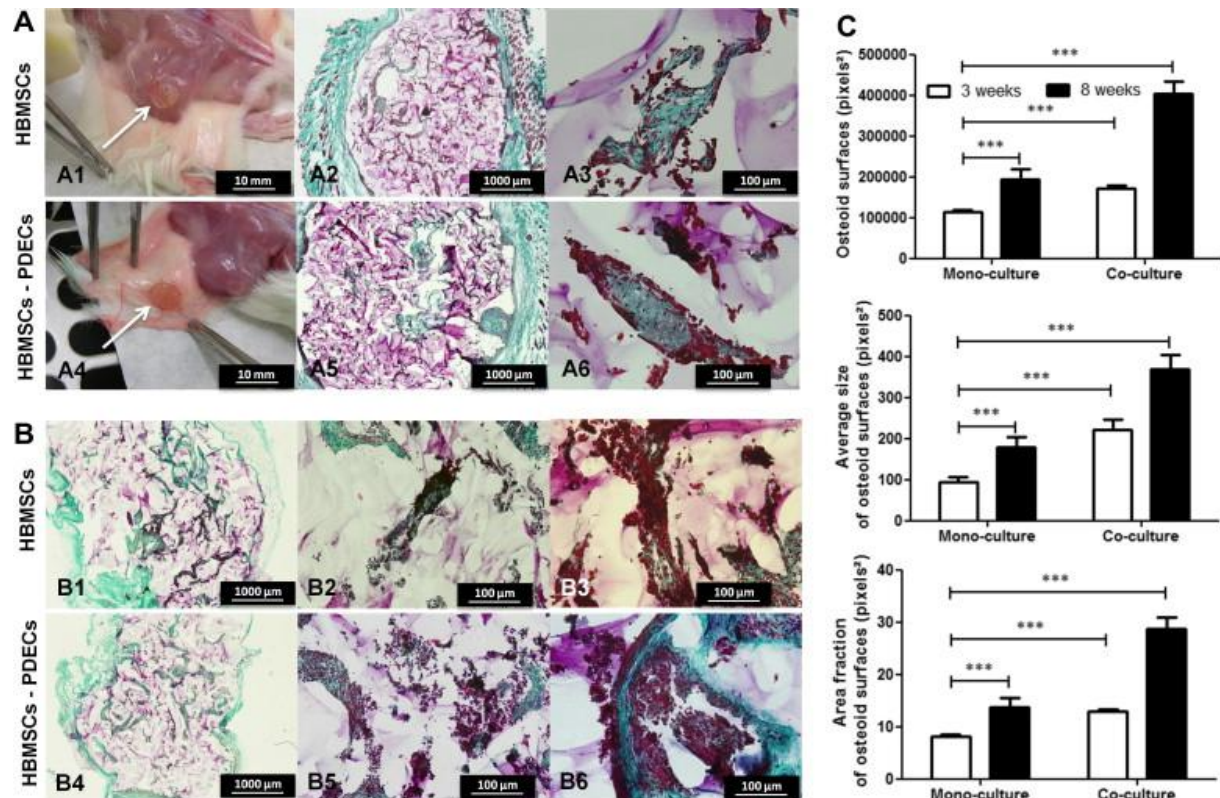
**Figure 5. Immunolabeling of bone-specific markers in HBMSCs or in HBMSCs-PDECs.**

(A) ALP cytochemistry detection after 1 day (D1), 3 days (D3), 9 days (D9) and 12 days (D12) of culture. (B) Immunocytochemistry of COL1A1 after 1 day (D1), 3 days (D3), 9 days (D9) and 12 days (D12) of culture. COL1A1 was detected with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (COL1A1 in green). TdTomato-labeled PDECs were detected in red. (C) Von Kossa staining was performed to assess level of calcium deposition (dark) in mono-culture of HBMSCs and in HBMSCs-PDECs after 1 day (D1), 3 days (D3), 9 days (D9) and 12 days (D12).



**Figure 6. Quantitative analysis of bone-specific expression and junctional proteins in HBMSCs or in HBMSCs-PDECs: effect of peptide 43GAP27.**

Quantitative gene expression of (A) Cbfa1, (B) ALP, (C) Col1A1, (D) OCN in mono-culture and co-culture treated or not with peptide 43GAP27 for I (D1) to 12 days (D12). Four independent experiments were performed. (E) Quantitative gene expression of Cx43 expressed in mono-culture and co-culture treated with peptide 43GAP27 from 1 (D1) to 12 days (D12). (F) Quantitative gene expression of VE-cadherin expressed in mono-culture and co-culture treated with peptide 43GAP27 from 1 day (D1) to 12 days (D12). Four independent experiments were performed. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 7. Subcutaneous implantation of matrices in mice seeded with mono-culture HBMSCs and with HBMSC-PDEC co-cultures: histological and quantitative analysis.**

(A) Three weeks of implantation: cylinders (white arrows) 4 mm in diameter and 4 mm thick loaded with cells in mono-cultures (A1–A3) and in co-cultures (A4–A6) were inserted into subcutaneous pockets in dorsum of 12-week-old NOG mice weighing 25–30 g. (A1, A4) Macroscopic images of implants. (A2, A3) Representative histological images of decalcified sections of subcutaneous implantation of matrix loaded with HBMSCs at two different magnifications. (A5, A6) Representative histological images of subcutaneous implantation of matrix loaded with HBMSCs-PDECs at two different magnifications (Masson trichrome staining). (B) Eight weeks of implantation: representative histological images of decalcified sections of subcutaneous implantation of scaffold loaded with cells in mono-cultures (B1–B3) and in co-cultures (B4–B6) (Masson trichrome staining). (C) Quantification of osteoid surface: average size of osteoid surface and average fraction of osteoid surface from images obtained with both matrices (□ 3 weeks of implantation; ■ 8 weeks of implantation). Data are presented as means ± standard deviation for  $n = 6$  samples for each group. \*\*\*Statistically significant difference compared with the other group with  $P < 0.001$ .

## C. Conclusions

Dans ce travail, les cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse humaine (HBMSCs) ont été associées à des progéniteurs endothéliaux issus de sang de cordon ombilical (PDECs) au sein d’une matrice macroporeuse de polysaccharides naturels, le dextrane et le pullulane.

RESULTATS – II. Interactions cellulaires entre les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse et des progéniteurs endothéliaux au sein d’une matrice tridimensionnelle de polysaccharides

Le but de cette étude était d’analyser la communication ostéo-endothéliale et de démontrer :

*In vitro* son rôle dans la différenciation ostéoblastique des HBMSCs au sein de cette matrice 3D en l’absence de facteurs ostéoinducteurs.

*In vivo* la capacité du produit cellularisé à promouvoir la formation d’un tissu osseux vascularisé.

De la même façon que précédemment, les HBMSCs en mono et en co-cultures avec les PDECs envahissent toute la structure, migrent et forment des agrégats multicellulaires intégrés dans les pores de la matrice. La vitesse de formation de ces agrégats varie en fonction du type de culture, la cinétique d’agrégation est plus rapide dans la co-culture cellulaire que dans la mono-culture.

Nos résultats démontrent que cette matrice est capable d’orienter la différenciation des HBMSCs en mono-culture ou en co-culture vers la voie ostéogénique sans adjonction de facteurs ostéoinducteurs au milieu de culture. De façon plus précise, la co-culture tridimensionnelle stimule l’expression des marqueurs ostéoblastiques par rapport à une mono-culture de HBMSCs. Après 12 jours de culture, les cellules cultivées en trois dimensions sont capables d’exprimer les marqueurs osseux spécifiques précoces (PAL, Col1A1) ou tardifs (Cbfa1, OCN) et présentent une minéralisation de la matrice extracellulaire.

Dans ce contexte, la Connexine 43, protéine constituant les jonctions communicantes de type GAP, connue pour stimuler la différenciation ostéoblastique en deux dimensions, semble jouer un rôle essentiel au sein de cette co-culture 3D.

L’inhibition de la Connexine 43 par un peptide mimétique spécifique (43Gap27) démontre le rôle de cette protéine dans la communication ostéo-endothéliale et dans la différenciation ostéoblastique. En présence de l’inhibiteur, nous observons une diminution de l’expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique dans les cultures cellulaires, mais de façon plus importante dans la co-culture entre les HBMSCs et les PDECs.

Dans cette étude, il apparaît évident que les cellules endothéliales ne survivent pas en co-culture au-delà de 3 à 9 jours en co-culture. La perte de ces cellules dans une culture tridimensionnelle peut expliquer la diminution observée dans l’expression génique des marqueurs endothéliaux au cours du temps. La diffusion en oxygène au sein de la matrice 3D de polysaccharides est une cause probable de l’absence de survie de ces cellules qui sont plus sensibles à la teneur en oxygène que les cellules mésenchymateuses. D’autre part, l’absence de contrainte mécanique peut également être un facteur de sénescence des cellules endothéliales en 3D (231).

RESULTATS – III. La moelle osseuse humaine comme unique source cellulaire endothéliale et mésenchymateuse pour l'ingénierie du tissu osseux

L'implantation en sous-cutané chez la souris Nog des matrices de polysaccharides cellularisées avec les HBMSCs seuls révèle la formation d'un tissu osseux faiblement vascularisé après 8 semaines. Dans le cas d'une co-culture de PDECs avec des HBMSCs, nous observons la présence d'un tissu osseux néoformé plus important et des vaisseaux sanguins plus nombreux, aussi bien en périphérie qu'au centre du matériau.

En conclusion, ces résultats montrent que la co-culture au sein de la matrice de polysaccharides permet d'augmenter la communication cellulaire par l'établissement de jonctions communicantes de type GAP (sans qu'il soit possible de définir si elles sont homotypiques ou hétérotypiques) et de les engager vers une voie de différenciation ostéoblastique sans facteurs ostéogéniques.

Ces produits d'ingénierie tissulaire sont actuellement en cours d'évaluation chez le rat dans un modèle d'implantation en site osseux (au niveau du condyle fémoral).

Enfin, il sera important d'introduire la culture dynamique de ces matrices précellularisées par les deux types cellulaires pour améliorer la survie des cellules endothéliales et la formation d'un réseau vasculaire.

### **III. La moelle osseuse humaine comme unique source cellulaire endothéliale et mésenchymateuse pour l'ingénierie du tissu osseux**

#### **A. Introduction**

En ingénierie tissulaire, l'utilisation de cellules de différentes sources et de stade de différenciation hétérogène induit une certaine complexité dans la fabrication de ces produits. L'identification d'une seule source de cellules réparatrices incluant les deux composantes vasculaire et osseuse représente donc un défi majeur pour le développement de produits d'ingénierie tissulaire osseuse utilisables en clinique.

**L'objectif de cette troisième étude a été de proposer l'utilisation de la suspension totale de moelle osseuse humaine sans une étape d'expansion préalable pour l'élaboration d'un produit d'ingénierie tissulaire. Les populations de cellules endothéliales de cellules mésenchymateuses ont été caractérisées au sein de cette suspension cellulaire. L'association directe de la suspension de moelle osseuse dans la matrice 3D permet d'obtenir *in vitro* et *in vivo* la formation d'un pseudo réseau vasculaire et d'une matrice osseuse minéralisée.**

#### **B. Article 3 :**

##### **Abstract**

Current approaches in bone tissue engineering have shown limited success, mostly owing to insufficient vascularization of the construct. A common approach consists in co-culture of

endothelial cells and osteoblastic cells. This strategy uses cells from different sources and differentiation states, thus increasing the complexity upstream of a clinical application. The source of reparative cells is paramount for the success of bone tissue engineering applications. In this context, stem cells obtained from human bone marrow hold much promise. Here, we analyzed the potential of human whole bone marrow cells directly expanded in a 3D polymer matrix and focused on the further characterization of this heterogeneous population and on their ability to promote angiogenesis and osteogenesis, *in vitro* and *in vivo*, in a subcutaneous model. Cellular aggregates were formed within 24 hours and over the 12-day culture period expressed endothelial and bone-specific markers and a specific junctional protein. Ectopic implantation of the tissue-engineered constructs revealed osteoid tissue and vessel formation both at the periphery and within the implant. This work sheds light on the potential clinical use of human whole bone marrow for bone regeneration strategies, focusing on a simplified approach to develop a direct 3D culture without 2D isolation or expansion.

## **Keywords**

Bone tissue engineering; Bone marrow; Mesenchymal stem cell; Endothelial cell; Osteogenesis; Angiogenesis.

## **1. Introduction**

In regenerative medicine, a major challenge of cell-based therapies is to identify the cell sources that can be implanted or attracted to the injury site and that will differentiate into the specific cell lineages required for functional tissue regeneration. The majority of bone tissue engineering approaches utilize mesenchymal stromal cells (MSCs) from various sources (e.g. adipose tissue, bone marrow) [1]. *In vitro*, these cells can differentiate into chondrocytes and osteoblasts so they are a potential autologous cell source [2-9]. In addition to stromal cells, the important role played by vascular endothelial cells in bone tissue regeneration is now largely recognized. Even with the use of biomaterials and autologous stromal cells, vascularization remains one of the main hurdles that must be overcome in order to achieve successful reconstruction of large bone defects [10, 11]. Insufficient vascularization of implanted tissue-engineered constructs containing MSCs leads to a limited access of nutrients to the implanted cells, thereby compromising their viability [12, 13]. In recent years, several strategies aiming at improved vascularization of tissue-engineered constructs have been developed [14-16]. Among those, the *in vitro* pre-vascularization of three-dimensional tissue constructs has received much attention by using co-cultures of vascular endothelial cells (ECs) and bone-forming cells or mesenchymal stromal cells [17, 18]. *In vitro* studies have shown the potential of these co-culture systems to improve osteogenesis and to form a vascular network organized mostly into tube-like structures [19-21]. In some cases, the *in vivo* implantation of these tissue-engineered constructs leads to the formation of an osteoid tissue exhibiting vessels [22-24].

A large number of co-culture studies using two different lineages from different sources and including differentiated cells mixed with undifferentiated cells (e.g. mesenchymal stem cells or progenitors) have been reported. Among these, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [25], human outgrowth endothelial cells (OECs) [26], human microcapillary

endothelial cells (HDMECs) [27], and endothelial progenitor cells from cord blood have been studied for co-culture with human bone-derived cells (HBDCs) [28], osteoblast-like MG63 cells [29], primary human osteoblast cells (HOS) [30] human osteoprogenitor cells from bone marrow [31], MSCs from adipose tissue [32] and bone marrow [33]. However, the co-culture of these two different lineages from different sources involves limitations with a view to clinical applications.

In this context, human bone marrow is promising as it contains both MSCs and microvascular endothelial cells (MECs) that are able to support both osteogenesis and angiogenesis, respectively. Indeed, this approach has already been reported and although bone healing was improved, the hypothesized increase in vascularization and the impact on MSC differentiation towards the osteoblastic lineage was not determined [34]. In a recent clinical trial, it was also shown that the direct injection of concentrated bone marrow cells could successfully accomplish the regeneration of non-union fractures [35], supporting the potential of this cell source.

Several strategies have been used to achieve the local delivery of stem to in the injured site in order to promote tissue regeneration. To address this issue and to mimic a relevant 3D microenvironment, scaffolds are needed to create physicochemical macro- and microstructures that can promote cellular interplay and differentiation. A wide range of scaffolds have been used for bone tissue engineering, including inorganic, calcium-based phosphate matrices and polymeric structures. The latter can be considered suitable as they can mimic the aqueous in vivo environment [36]. Moreover, the macroporous interconnectivity provided by the polymeric scaffold favors the migration of cells within the material and the invasion/integration of the host cells [37]. Owing to their composition and structure, they have inherent design flexibility and can thus be tailored to a specific need [38] such as the promotion of angiogenic events. The use of polysaccharides such as alginate, chitosan, pullulan or cellulose [39-44] has been extensively reported and numerous studies are in progress focusing on bone tissue engineering. These natural polymers hold promise as matrices for tissue regeneration strategies since they are highly permeable, facilitating the transport of nutrients and metabolites [45]. Here, we focused on a macroporous matrix composed of the naturally occurring hydrophilic polysaccharides pullulan and dextran. These biodegradable matrices have already been shown suitable for cell therapy [46, 47], as attested by their capability to sustain vascular cell growth [48] and the culture of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue [49]. In addition, these matrices have recently been shown to favor the co-culture of human MSCs and human EPCs, promoting cell communication and improved bone formation [50].

Here, we investigated the potential of human whole bone marrow cells (hWBMCs) as a unique source of reparative cells for regenerating bone tissue and vasculature directly within polysaccharide-based macroporous matrices, without preliminary selection or 2-dimensional (2D) expansion. We characterized i) the population formed by the multicellular components of human whole bone marrow cells in two-dimensional assays and thereafter in three-dimensional matrices; ii) its contribution to promote bone and endothelial cell specific markers in 3D culture; iii) the fate of the tissue-engineered constructs after ectopic

implantation in a NOG mice model. Taken together, our findings provide new insights into the potential of this heterogeneous cell source within a 3D macroporous matrix for bone regeneration strategies that involve a limited ex-vivo culture and cell manipulation. This might help such strategies to move closer to the bedside.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Preparation of three-dimensional (3D) macroporous scaffolds**

Macroporous scaffolds (6 mm diameter, 2 mm thickness, 20 mm<sup>3</sup>) were produced using a blend of pullulan/dextran 75:25 (pullulan, MW 200,000, Hayashibara Inc; Dextran, MW 500,000, Sigma) prepared by dissolving 9 g of pullulan and 3 g of dextran into 40 mL of distilled water containing 14 g of NaCl, as previously described [51]. Chemical cross-linking was carried out using trisodium trimetaphosphate. Pores were created by a patented gas-foaming technique. Resulting scaffolds were cut into the desired shape, soaked in PBS, and then washed extensively with a 0.025 % NaCl solution. After freeze-drying, scaffolds were stored at room temperature until further use. Regarding their characterization, pore size and pore area were determined using Environmental Scanning Electron Microscopy and confocal microscopy (FITC-Labeled dextran scaffolds). Water content and swelling ratio were determined as previously described [52]. Scaffolds with 6 mm diameter, 2 mm thickness, 20 mm<sup>3</sup>, porosity  $68 \pm 3$  %, and pore size  $243 \pm 14$   $\mu$ m were used in this work.

### **2.2 Isolation and culture of whole bone marrow cell population**

Human Whole Bone Marrow Cells (hWBMCs) were isolated from human bone marrow samples as previously described [53]. Briefly, bone marrow was aspirated from the femoral diaphysis or iliac bone after obtaining consent from patients undergoing hip prosthesis surgery after trauma. Here, in the totality of this study 10 different samples of hWBMCs from different donors were used, with an average donor age of  $66 \pm 11$  years. For each independent experiment a different donor was used. The study was approved by the local institutional review board. Cells were separated by sequential passages through syringes fitted with 16-, 18- or 21-gauge needles. After centrifugation for 15 min at 800  $\times$  g, the pellet was resuspended in the following 50/50 culture medium containing 50% (v/v) of  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Gibco, Karlsruhe, Germany) and 50% (v/v) endothelial cell growth medium-2 (EGM-2; Lonza, Verviers, France) and 5% (v/v) FCS before flow cytometry analysis or cell seeding within the scaffolds.

### **2.3 Flow cytometry**

hWBMCs were isolated as previously described, red blood cells were lysed using FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA). Next, hWBMCs were washed with PBS 1X pH 7, and incubated with coupled antibodies against CD73 (cat#561254), CD34 (cat#555824), CD271 (cat#563451), CD105 (cat#561443) (markers for mesenchymal cells; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and CD31 (cat#55445), CD34 (cat#555824), CD146 (cat#560846), CD29 (cat# 563513) (markers for endothelial cells; BD Biosciences, San Jose,

CA, USA) during 1h at room temperature. 100 000 events were acquired and analyzed using a BD FACS Canto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

## **2.4 Immunolabeling of Microvascular Endothelial Cells in hWBMCs in 2D culture**

hWBMCs cultured on plastic culture plates during 5 days without medium change were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 30 min and permeabilized with Triton X 100 at 0.1% (v/v) for 30 min at 4°C. Then, samples were blocked during 1 hour in PBS 1X pH 7.4 (Gibco) containing 1% (w/v) BSA and then incubated with mouse anti-human VE-cadherin antibody (cat#sc-9989) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), or mouse anti-human CD31 antibody (cat#sc-13537) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), or rabbit anti-human Von Willebrand factor antibody (vWF) (cat#A0082) (Dako, Les Ulis, France) overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed in PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Karlsruhe, Germany) and incubated with Alexa fluor 568-conjugated rabbit anti-mouse IgG (cat#A11061) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) or Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (cat#A11008) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 2 hours at 37°C. Cells were incubated with the nuclear probe DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at room temperature to label the nucleus and were thereafter observed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) equipped with a digital camera (Nikon Dxm 1200C, Japan).

## **2.5 Cell seeding within a 3D macroporous scaffold**

Dried scaffolds (6 mm diameter, 2 mm thickness) were submitted to UV radiation for 30 minutes before cell seeding. For culture experiments, hWBMCs were cultured for 1, 6 and 12 days in the 50/50 culture medium ( $\alpha$ -MEM and EGM-2 MV at a ratio 1:1 (v/v)). The cells were seeded at  $4 \times 10^5$  cells/disk. Cells seeding into the 3D scaffold were detected after 24 hours by calcein staining, (cat#L3224) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and examined with modular stereo microscope (Leica MZ 10 F; Leica Microsystems, Nanterre, France).

## **2.6 Alkaline phosphatase (ALP) assay**

Intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity was assessed in cells cultured within scaffolds by using the conversion of a colorless p-nitrophenyl phosphate to a colored p-nitrophenol (Sigma diagnostic kit (85L-2), Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

## **2.7 Cryo-sections of tissue-engineered constructs for microscopy**

At designated time points, cellularized matrices were rinsed four times with PBS (1X pH 7.4) and then fixed for 30 min with 4% (w/v) PFA at 4°C. The matrices were then included in gel freeze (Labonord SAS, Templemars, France). Sections of 10  $\mu$ m thickness were obtained using a cryostat (Leica CM 1850 UV; Leica Microsystems, Nanterre, France).

## **2.8 Immunolabeling of endothelial marker proteins and connexin43 into the 3D scaffold**

After 1, 6 and 12 days of culture the matrices containing hWBMCs were fixed with 4% (w/v) PFA at 4°C for 30 min and permeabilized with Triton X 100 at 0.1% (v/v) for 30 min at 4°C. Then, they were blocked for 1 hour in PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Karlsruhe, Germany) containing 1% (w/v) BSA before incubation with primary antibodies: mouse anti-human CD31 (cat#sc-13537) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), or rabbit anti-human Von Willebrand factor (vWF) (cat#A0082) (Dako, Les Ulis, France) overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed in PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Karlsruhe, Germany) and incubated with Alexa fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (cat#A11061) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 2 hours at 37°C or Alexa fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (cat#A11008) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 2 hours at 37°C. To label the nucleus, cells were incubated with the nuclear probe DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at room temperature and were thereafter analyzed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) equipped with a digital camera (Nikon Dxm 1200C, Japan). For Connexin43 (Cx43) labeling, cells were incubated with a primary antibody mouse anti-human against Cx43 (cat#MAB3068) (Millipore, Billerica, MA, USA). Subsequently, they were washed and incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (cat#A11001) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Cultures were examined with a fluorescence microscope (Leica DMI 3000 B; Leica Microsystems, Nanterre, France).

## **2.9 Immunolabeling of bone marker proteins**

After 1, 6 and 12 days of culture the matrices containing hWBMCs were fixed with 4% (w/v) PFA at 4°C for 30 min and permeabilized with Triton X 100 at 0.1% (v/v) for 30 min at 4°C. Then, they were blocked for 1 hour in PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Karlsruhe, Germany) containing 1% (w/v) BSA before incubation with primary antibodies: mouse anti-human Osteocalcin (OCN) (cat#35-5400) (Takara, Otsu, Japan), or mouse anti-human COL1A1 (cat#M011) (Takara, Otsu, Japan) overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed in PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Karlsruhe, Germany) and incubated with Alexa fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (cat#A11061) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 2 hours at 37°C. For nuclear labeling, cells were incubated with the nuclear probe DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at room temperature and were thereafter analyzed using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) equipped with a digital camera (Nikon Dxm 1200C, Japan).

## **2.10 Alizarin Red staining**

Alizarin Red staining was performed in order to assess the level of calcium deposition induced by the hWBMC culture. After 1, 6 and 12 days of culture, cells were fixed in 4% (w/v) PFA. Next, cells were stained with alizarin red S (2%, pH 4.2; Millipore, Billerica, MA, USA) for 2 min. After aspiration of the overflow, cells were washed three times with water. Extracellular matrix staining was observed using an optical microscope (Zeiss, Axiovert 25).

## **2.11 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)**

Total RNA was extracted using the RNeasy Total RNA kit (Qiagen), as indicated by the manufacturer, and 1 µg was used as the template for single-strand cDNA synthesis, using the

Superscript system (cat#11904-018) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA diluted at a 1:80 ratio was loaded onto a 96-well plate. Real-time PCR amplification was performed using the SYBR-Green Supermix (Bio-Rad). Primers of the ubiquitary ribosomal protein P0, ALP, COL1A1, Cbfa1/runx2, OCN, Cx43 as previously described [50] and CD31 and vWF as previously described [54] were used at a final concentration of 200 nM. Data were analyzed using iCycler IQ software and compared by the  $\Delta\Delta CT$  method. Q-PCR was performed in triplicate. Results were expressed relative to gene expression levels on day 1. Data was normalized to P0 (ribosomal protein) mRNA expression for each condition and was quantified relative to cbfa1/runx2, ALP, CD31, vWF, OCN and COL1A1 gene expression in WHBMCs cultured alone in the matrix after 24 h, which was standardized to 1.

## **2.12 Ectopic implantation of tissue-engineered constructs in mice**

The procedures and animal handling followed the principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and Experiment Committee of the University of Bordeaux. Experiments were carried out in accredited animal facilities according to European recommendations for laboratory animal care (directive 86/609 CEE of 24/11/86). Scaffolds were seeded with hWBMCs (4x10<sup>5</sup> cells/scaffold) 1 day before implantation. Then, matrices were implanted in a dorsal subcutaneous site of 12-week-old NOG female mice weighing 25-30 g (from the central animal facility of the University of Bordeaux, Bordeaux, France). For each condition and for each time of implantation, five samples were used for histological analysis. Five mice with two matrices were used for each condition. Animals were euthanized at 3 or 8 weeks. These time points were chosen as early and late time points of ectopic implantation in order to provide data regarding biointegration and osteoinduction [55].

## **2.13 Histological analysis**

At three and eight weeks post-implantation, samples were retrieved, fixed in 4 % (w/v) PFA for 4 h at 4 °C, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (4-5 µm in thickness) were deparaffinized using toluene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100-50 %), washed in distilled water and finally stained with Mayer's Hemalum and Erythrosine Masson's trichrome (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The samples were observed with a Nikon Eclipse 80i microscope. The osteoid tissue area on paraffin sections was quantified using the ImageJ software. Two slides per sample with 15 average fields were used for quantification.

## **2.14 Immunohistochemistry**

At 3 and 8 weeks post-implantation, samples were retrieved and fixed in 4 % (w/v) PFA for 4 h at 4 °C, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (4-5 µm in thickness) were deparaffinized using toluene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100-50 %) and finally washed in distilled water. Antigen recovery was performed in TBS buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) at 100°C for 20 min. Then, endogenous peroxidase was quenched in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in PBS, for 5 min. After washing with PBS, slides were blocked using 3% goat serum in PBS for 30 min. For CD31 immunolabeling, incubation was

performed overnight with a rabbit polyclonal anti-human/mice CD31 antibody (cat#ab28364) (Abcam, Paris, France) at 4°. After two washes with PBS, the slides were incubated with the components of the anti-rabbit ABC kit (Vector Labs), as indicated by the manufacturer, and then revealed using DAB solution (Impact DAB; Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Staining was stopped in distilled water and samples were then counterstained in Mayer's hematoxylin and washed in running tap water for 10 min. Finally, samples were dehydrated and mounted using Entellan. Cell species identification was achieved by an overnight incubation at 4°C with a rat monoclonal anti-human HLA-1 antibody (cat#SM2012P) (Acris, Herford, Germany). After two washes with PBS, the slides were incubated with the components of the anti-rat ImmPRESS kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), as indicated by the manufacturer, and then revealed using DAB solution (Impact DAB; Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Counterstaining and mounting were performed as previously described.

### 2.15 Statistical analysis

Data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation resulting from independent experiments. The GraphPad Prism software (GrapPad Inc., San Diego California USA) was used for statistical analysis. For the Q-PCR analysis, the two modes of analysis of variance (ANOVA) were performed in order to compare the mean values between groups using the post-hoc Bonferroni test. For the histological analysis, the t test was used to compare the mean values between groups. Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## 3. Results

### 3.1 Characterization of freshly-isolated human whole bone marrow cells and two-dimensional in vitro expansion: evidence for microvascular endothelial cells

hWBMC characterization in terms of endothelial and mesenchymal cell-specific markers was performed to establish further the components of this heterogeneous population. Six independent samples of freshly isolated hWBMCs were processed for immunostaining and analyzed by flow cytometry. FACS analysis showed that 9.5 $\pm$ 1.0% of hWBMCs were positive for CD73 and negative for CD34, 10.0 $\pm$ 0.5% for CD105, 12.0 $\pm$ 1.5% for CD271 (Figure 1A). Additionally, 6.3 $\pm$ 0.2% of the population was double-positive for CD31/CD34 and 5.0 $\pm$ 1.5% positive for CD146 and 8.0 $\pm$ 1.5% for CD29 (Figure 1B).

The expression of these endothelial cell-specific markers was further confirmed by the immunolabeling of CD31, vWF and VE-Cadherin in two-dimensional hWBMC cultures, after 5 days of culture (Figure 1C, D and E). Additionally, CD31 staining revealed that labeled cells formed a specific tubular-like network within the monolayer of hWBMC culture (Figure 1C).

### 3.2 Three-dimensional hWBMC cultures: evidence for spheroid formation

To establish the behavior and distribution of the hWBMCs once seeded within the 3D porous polysaccharide-based scaffold (Figure 2A), we analyzed their fate after 24 hours of culture.

Optical microscopy after calcein staining revealed that hWBMCs, which had been initially seeded within the 3D structure (Figure 2B), migrated during the first hours of culture to form well-organized spheroids (Figure 2, C-F) distributed within the pores of the material. The aggregates measured  $150 \pm 50 \mu\text{m}$  and appeared homogeneously distributed within the pores of the matrix.

### **3.3 hWBMCs develop a network positive for endothelial markers within the spheroid formed in the 3D macroporous matrix**

To evaluate the expression and distribution of endothelial specific markers within the 3D hWBMC cultures, immunostaining for CD31 and vWF was performed after 1 day (D1), 6 days (D6) and 12 days (D12) of culture. A tube-like network was observed within the spheroids, as shown by the labeling for CD31 and vWF (Figure 3A and B), well evidenced at D6 and D12 in the cell aggregates for vWF labeling (Figure 3B and C). The presence of vascular endothelial cells was further confirmed by the quantification of CD31 and vWF gene expression from day 1 to day 12 in the 3D cultures (Figure 3D and E). Gene expression evaluation revealed a peak of expression of these two endothelial-specific markers after 6 days of culture within the matrices (Figure 3D and E).

### **3.4 hWBMC spheroid formation contributes to increased Cx43 expression**

Since the 3D culture of hWBMCs within the matrix revealed a specific organization in spheroids, we assessed the expression of Cx43, a major actor of cell-cell communication in GAP junction protein family, after 1, 6 and 12 days of the 3D culture. Specific punctuated labeling of Cx43 appeared after 6 days of culture and was further evidenced after 12 days of culture. Cx43-positive cells were found in close proximity to vWF-positive cells (Figure 3C, D12). The quantification of Cx43 gene expression within the 3D matrices over time indicated a significant increase in the expression of this GAP junction protein from days 1 to day 12. Indeed, a 5-fold over-expression of Cx43 mRNA was obtained after 12 days of culture as compared to day 1 (Figure 3F).

### **3.5 hWBMCs within spheroid conformation express bone-specific markers**

We then assessed the ability of hWBMCs to express osteoblastic markers and to undergo osteoblastic phenotype differentiation within the 3D scaffold. The analysis of bone-specific markers in hWBMCs cultured within the 3D matrices was first qualitatively evaluated by cytochemistry for alkaline phosphatase (ALP) activity, immunostaining for type 1 collagen and osteocalcin and alizarin red staining, on days 1 to 12 (D1 to D12), (Figure 4A, B, C and D, respectively). The spheroids formed within the 3D matrix exhibited ALP activity and were positive for type I collagen during the time of culture (i.e. from day 1 to day 12; Figure 4A and B). Osteocalcin (OCN) expression was shown at 1, 6 and 12 days of culture (Figure 4C). Alizarin red staining showed an increased calcium deposition over the time of culture that was associated with the cellular aggregates (Figure 4D). Additionally, the gene expression of bone-specific markers (i.e. *cbfa1/runx2*, ALP, *Col1A1* and OCN) was quantified in hWBMCs cultured within the 3D scaffold for 1, 6 and 12 days. *Cbfa1* (a master gene for bone differentiation), expression was shown to increase during time of culture, up to a 3 fold

increase at day 12, compared with day 1 (Figure 5A). Both ALP and Col1A1 gene expression showed a peak at day 6 of culture. A significant decrease at day 12 was observed for ALP and Col1A1, but still with levels remaining significantly higher compared to day 1 (Figure 5B and C). There was a significant steady increase in the gene expression of the late osteoblastic-specific marker OCN from day 1 until day 12 (Figure 5D).

### **3.6 3D cultures of hWBMCs promote osteoid formation ectopically**

The potential of these tissue-engineered constructs for promoting bone formation was evaluated after 3 and 8 weeks upon subcutaneous implantation in NOG mice by histological analysis using Masson's Trichrome staining. Empty scaffolds did not reveal any osteoid formation or vascularization inside the implants (Figure 6A-1 and 6A-2) both at 3 weeks and 8 weeks post-implantation. On the other hand, scaffolds seeded with hWBMCs (Figure 6B-1) presented a vascular network mainly around the implant (Figure 6B-2) and an osteoid tissue formation (Figure 6B-3) at 3 weeks post-implantation. After 8 weeks of implantation, the scaffolds seeded with hWBMCs (Figure 6C-1) exhibited vessels that invaded the scaffold (Figure 6C-2). Additionally, the amount of osteoid tissue formed increased in comparison with the 3-week time point (Figure 6C-3). Semi-quantitative image analysis showed a significant increase in the osteoid surfaces, the average size of the osteoid surfaces and the average fraction of the osteoid surfaces at 8 weeks as compared to 3 weeks (Figure 6D, 6E and 6F, respectively).

### **3.7 3D cultures of hWBMCs within the matrix promote formation of blood vessels and partially incorporated in autologous blood vessels**

To assess the angiogenic potential of this tissue-engineered construct, the number of blood vessels was assessed both outside and inside the region of the implanted materials (Figure 7A-1 to 7A-3) by CD31 immunostaining. The outside region corresponds to the tissue in the vicinity of the implanted scaffold. CD31 immunolabeling showed that blood vessels and capillary structures were formed in the vicinity and inside the matrix (Figure 7B-1 to 7C-2) at both time points. When quantified, more vessels were observed outside the materials than inside the scaffold (Figure 7D). Interestingly, the number of vessels significantly increased with time of implantation both outside and inside the matrix (Figure 7D).

The fate of the human cells after implantation was analyzed with human HLA-I specific immunolabeling. Cells positive for human HLA-I were observed in the vicinity of the material in structures resembling blood vessels (Figure 7E-1 and F-1, for 3 and 8 weeks, respectively). Additionally, the cellular aggregates were maintained for up to 8 weeks inside the scaffolds, as demonstrated by the HLA-I positive cells inside the materials (Figure 7E-2 and F-2, for 3 and 8 weeks, respectively).

## **4. Discussion**

In this work, we focused on a further characterization of whole bone marrow cells and tested their potential to induce bone and vessel formation when seeded within a 3D matrix, without selection and 2D cell expansion. We found that the biodegradable natural scaffold composed

of pullulan and dextran is an appropriate 3D microenvironment for promoting i) the maintenance of these human bone marrow cells, ii) a specific cellular organization in spheroids promoting cell interactions and the establishment of junctional communications, iii) the activation of endothelial and osteoblastic markers and iv) the formation of a microvascular network within the spheroids, observed *in vitro* and *in vivo*, after ectopic implantation in mice.

For many years, bone marrow extracts have been used for treating non-union gaps in orthopedic surgery. However, the understanding of the cellular interplay involved in the coupling between angiogenesis and osteogenesis remained elusive. Recently, the interplay between mesenchymal stem cells and endothelial cells was reviewed [56]. This study shed light into the underlying mechanisms whereby MSCs promote or inhibit neo-angiogenesis and into the interactions between MSCs and ECs in various physio-pathological conditions and in tissue regeneration. Endothelial cells derived from bone marrow have been shown to produce angiocrine factors that promote organ recovery and restore normal organ function, including bone tissue function [57].

Numerous studies have reported the use of multipotent MSCs as promising candidates to support bone formation and vascularization of tissue constructs. However, in tissue engineering applications, a common strategy consisted in the isolation of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow samples before their seeding within a scaffold [58]. Yet owing to the pre-selection of cells, these cultures were deprived of interactions with the other cell types present in the whole bone marrow suspension, such as cells from the hematopoietic compartment. In addition to MSCs, endothelial cells or their progenitors from different sources (e.g. peripheral blood, cord blood) have been shown to promote successfully the formation of vessels and thus directly contribute to the formation of an intrinsic microvasculature within the implants. However, their application in clinical practice is hampered owing to the difficulties of co-culturing both autologous cell types from different sources, after their respective isolation and amplification, as shown by the limited number of clinical trials reported in the literature for bone tissue regeneration.

In this work, we confirmed the potential of whole human bone marrow as a candidate for bone tissue engineering for promoting both vasculature and bone formation. The characterization of cells from bone marrow by flow cytometry revealed that they express typical MSC markers such as CD73, CD105, CD271 and are negative for CD45, the latter being a hematopoietic stem cell marker. Additionally, we also detected a population expressing CD31, CD34, CD146 and CD29, which are typical EC markers. These markers are commonly used for bone marrow characterization either by positive or negative selection [59]. Our flow cytometry results reflect the variable proportion of MSC cells detected among different patients and are consistent with previous reports [2, 60-62]. The existence of an endothelial microvascular population from human bone marrow (HBMECs) and their subsequent purification has already been described [63], but the corresponding quantification and characterization were not undertaken.

While hWBMCs formed a multilayer with time of 2D culture, they were organized in spheroids up to 24 hours of 3D culture that were distributed within the pores of the matrix when seeded in a polysaccharide-based scaffold. Here, we used a macroporous hydrophilic matrix composed of natural polysaccharides. Owing to their biochemical similarity with the extracellular matrix and inherent biocompatibility, pullulan and dextran are relevant candidates for the formation of tissue engineering constructs able to support cell viability and differentiation [47, 64]. Both have recently been used as a bioactive scaffold for human bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured or not with human endothelial progenitor cells [50]. This 3D macroporous structure was prepared in the absence of organic solvents by the cross-linking of the biopolymers. This matrix exhibited interconnected pores and different porosities, key factors for improving cell migration and allowing the formation of blood vessels inside the scaffold. One of the main features of these matrices is their ability to support cellular interactions and to promote the formation of cell clusters. Our previous work showed that human bone marrow stromal cells co-cultured with endothelial progenitor cells from cord blood also generated spheroids in the same scaffold [50].

3D spheroids have been extensively used in the field of angiogenesis [65-67]. In particular, when spheroid-based engineering of a human vasculature was performed in mice, endothelial cells (ECs) could be grafted as spheroids into a matrigel-fibrin matrix and gave rise to a complex three-dimensional network of human neovessels connected to the mouse circulation [66]. The authors developed a quantitative spheroid-based EC transplantation technique for the formation of durable vascular networks in vivo. Several approaches for generating cell spheroids have been described in the literature, including the hanging drop technique [68], the carboxymethylcellulose technique [66] and the liquid overlay method [69]. In this study, we used a simple biocompatible macroporous matrix that promotes the spontaneous formation of spheroids measuring 50 to 200  $\mu\text{m}$  homogeneously distributed through the pores of the matrix. Moreover, they led to the formation of CD31-positive vascular structures that were well evidenced after 12 days of culture. Von Willebrand factor staining confirmed the presence of differentiated endothelial cells, mainly in the periphery of the spheroids after 12 days of 3D culture.

Other scaffolds used for bone tissue engineering, such as polyurethane [25], polycaprolactone starch scaffold [70], polylactic acid [71] seeded with co-cultures of endothelial cells and osteoblastic cells from different sources and at different stages of cell differentiation, have been shown to support the formation of tube-like structures and vessel-like formation. Here, 3D culture with hWBMCs induced the conformation of aggregates, unlike the conformation observed with the two-dimensional monolayer cultures of hWBMCs, which led to a tubular-like network formed by CD31 or vWF positive cells. Indeed, within the 3D matrix, tubular structures were restricted to the spheroids, and in some cases networks between two or more spheroids could be observed.

In our study, spheroid aggregation allowed cell stabilization during the first day of culture and improved physiological conditions due to augmented cell-to-cell contact formation. Moreover, the spheroids formed exhibited an increasing expression of connexin43, a major protein involved in gap junctional communication that plays a key role in bone cell

differentiation [72]. Connexin 43-positive labeling was evidenced at day 12 and was found close to the CD31-positive vascular structures, strongly suggesting its effect in cell differentiation towards osteoblastic lineage. However, the identity of these labeled cells remains elusive. Cell-to-cell contacts observed with hWBMC cultures were also shown for co-cultures of MSCs and PDECs in the same scaffold. The key role of this protein in bone cell differentiation was previously demonstrated with the use of inhibitory peptides for Cx43 [50].

Cell-to-cell contact drives fundamental events for cell phenotype establishment. It is widely thought that the spheroid 3D microenvironment markedly influences the behavior and function of the incorporated stem cells. Our findings demonstrate that hWBMC cultures in 3D spheroids and within the matrix possess the ability to differentiate into microvascular endothelial cells. The fact that CD31 and vWF in vitro expression decreased between day 6 and day 12 could suggest a senescence of these human microvascular endothelial cells, which are present in the whole bone marrow fraction, over the long-term culture period in vitro. Although spheroidal aggregation may protect cells from apoptosis, they could not survive in static culture conditions, since the diffusion of oxygen and nutrients in static conditions is probably limited within the scaffolds and the spheroids [73, 74] in static cultures.

Regarding the fate of MSCs and their orientation to the osteoblastic lineage, quantitative analysis performed by q-PCR confirmed the increased expression of all bone-specific markers for hWBMCs cultured within the matrix, with expression profiles in accordance with the corresponding bone markers. *Cbfa1*, an early bone-specific marker, was over-expressed from day 1 to day 12 in the hWBMC culture. Maximal stimulation of ALP mRNA, an early bone marker, occurred after 6 days of 3D culture and then decreased. The same expression pattern was observed for *Col1A1*. Both genes are early markers for bone differentiation what might explain the gene expression peak at 6 days of culture and the subsequent decrease at day 12. The late osteoblastic marker *OCN* involved in matrix mineralization showed an increased expression from day 1 to day 12 in hWBMC cultured cells. The calcium deposition in the matrix confirmed the mineralization of the ECM. Cytochemical analysis, immunostaining of bone markers and their quantitative analysis confirmed that this tridimensional cellular conformation was able to sustain the expansion and differentiation of osteogenic cells arising from hWBMCs without the need for preliminary 2D selection or expansion cultures.

Ectopic implantation of the matrix loaded with hWBMCs validated the suitability of the spheroidal structures to support bone and vessel formation in vivo. Osteoid formation increased with time of implantation from 3 to 8 weeks. Importantly, we also demonstrated that hWBMC spheroid-seeded scaffolds supported an increased vascularization in the periphery of the scaffold and inside the matrix with time of implantation. The role of the hWBMCs loaded within the matrix and their impact in the neovascularization process of the implant was assessed by immunolabeling a specific human marker (i.e. HLA-I). Human cells were detected in the aggregates after 8 weeks of implantation inside the scaffold, suggesting their contribution to bone formation and/or the vascularization of the tissue. In addition, positive cells associated with vessels were observed in the periphery of the implants. However, the exact role of these human cells loaded in this scaffold for tissue regeneration and their potential interactions with the murine cells remain unknown. Scaffolds seeded with

hWBMCs may contribute to the vascularization of the implant by the release of growth factors, including chemoattractive factors and angiogenic factors, thereby facilitating the recruitment of cells inducing in vivo the formation of new vessels arising from the host cells. Additionally, further studies considering the use of this approach in a bone defect are underway, aiming to confirm the potential of this cell source, in combination with the selected biomaterial, to improve bone regeneration.

## **5. Conclusion**

This study demonstrates that the human whole bone marrow cell population, without preliminary isolation or two-dimensional expansion, can be used directly after extraction for the development of a bone regeneration and vascularization strategy, once seeded in an appropriate bioactive matrix. The ability of the 3D matrix to promote spheroids spontaneously contributes to the formation of a vascularized tissue. This approach is therefore suitable for improving the efficacy of MSC-based vascularization strategies in tissue-engineering applications without the need for preliminary 2D or 3D cultures, enabling a simplified approach with higher potential to reach the bedside.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from INSERM (National Institute for Health and Medical Research), from University of Bordeaux, Universities of Paris 7 and Paris 13, and by grants from the French Research National Agency (ANR-10-EMMA-009-01 MATRI+; ANR-12-TecSan-0011 INEOV). We thank Vincent Pitard and Santiago Gonzalez from the cytometry facility (University of Bordeaux, France). Thanks also to R. Cooke for editing the manuscript.

## **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

SM.D and D.L are shareholders of the company IMMATIS for the development and commercialization of the reported matrices.

## **References**

- [1] Caplan AI. New era of cell-based orthopedic therapies. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15:195-200.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
- [3] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-50.
- [4] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230-47.
- [5] Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001;414:118-21.
- [6] Viateau V, Guillemain G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res.* 2007;25:741-9.

- [7] Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. Transplantation. 1971;12:99-108.
- [8] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997;276:71-4.
- [9] Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood. 1994;84:4164-73.
- [10] Vail TP, Urbaniak JR. Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts. J Bone Joint Surg Am. 1996;78:204-11.
- [11] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater. 2005;4:518-24.
- [12] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2008;26:434-41.
- [13] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63:300-11.
- [14] Moon JJ, West JL. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials. Curr Top Med Chem. 2008;8:300-10.
- [15] Das A, Botchwey E. Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. Tissue Eng Part B Rev. 2011;17:403-14.
- [16] Buschmann J, Welti M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, et al. 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. 2011;17:291-9.
- [17] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. Biomaterials. 2005;26:1857-75.
- [18] Rouwkema J, Westerweel PE, de Boer J, Verhaar MC, van Blitterswijk CA. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009;15:2015-27.
- [19] Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EH. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. J Endod. 2012;38:454-63.
- [20] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. J Orthop Res. 2012;30:1507-15.
- [21] Fuchs S, Jiang X, Schmidt H, Dohle E, Ghanaati S, Orth C, et al. Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using outgrowth endothelial cells. Biomaterials. 2009;30:1329-38.
- [22] Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, et al. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on in vivo vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. Biomaterials. 2009;30:526-34.
- [23] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2010;400:284-91.

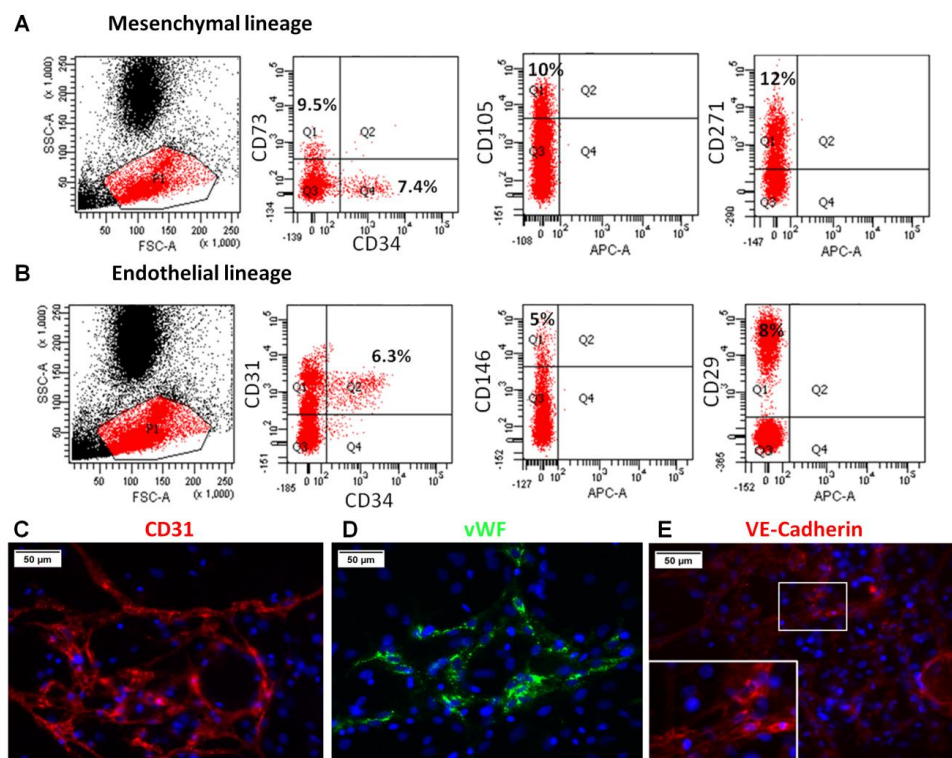
- [24] Seebach C, Henrich D, Kahling C, Wilhelm K, Tami AE, Alini M, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:1961-70.
- [25] Hofmann A, Ritz U, Verrier S, Eglin D, Alini M, Fuchs S, et al. The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29:4217-26.
- [26] Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:2199-212.
- [27] Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time-dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif*. 2012;45:320-34.
- [28] Leszczynska J, Zyzynska-Granica B, Koziak K, Ruminski S, Lewandowska-Szumiel M. Contribution of endothelial cells to human bone-derived cells expansion in coculture. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:393-402.
- [29] Paletta JR, Mack F, Schenderlein H, Theisen C, Schmitt J, Wendorff JH, et al. Incorporation of osteoblasts (MG63) into 3D nanofibre matrices by simultaneous electrospinning and spraying in bone tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2011;21:384-95.
- [30] Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials*. 2007;28:3965-76.
- [31] Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials*. 2009;30:3271-8.
- [32] Zhao X, Liu L, Wang FK, Zhao DP, Dai XM, Han XS. Coculture of vascular endothelial cells and adipose-derived stem cells as a source for bone engineering. *Ann Plast Surg*. 2012;69:91-8.
- [33] Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y. Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater*. 2013;9:4906-15.
- [34] Zhou J, Lin H, Fang T, Li X, Dai W, Uemura T, et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*. 2010;31:1171-9.
- [35] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87:1430-7.
- [36] Takami T, Ito H, Ishii K, Shimada K, Iwakura K, Watanabe H, et al. Adding thiazide to a rennin-angiotensin blocker regimen to improve left ventricular relaxation in diabetes and nondiabetes patients with hypertension. *Drug Des Devel Ther*. 2012;6:225-33.

- [37] Mastrogiacomio M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:277-84.
- [38] Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem.* 2011;58:423-38.
- [39] Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, Hemmi H, Hayata T, Nakashima K, et al. Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. *J Cell Physiol.* 2009;220:1-7.
- [40] Santo VE, Frias AM, Carida M, Cancedda R, Gomes ME, Mano JF, et al. Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules.* 2009;10:1392-401.
- [41] Tanase CE, Popa MI, Verestiuc L. Biomimetic chitosan-calcium phosphate composites with potential applications as bone substitutes: preparation and characterization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100:700-8.
- [42] Xia Y, Mei F, Duan Y, Gao Y, Xiong Z, Zhang T, et al. Bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and an injectable sodium alginate/gelatin scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100:1044-50.
- [43] Aravamudhan A, Ramos DM, Nip J, Harmon MD, James R, Deng M, et al. Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9:719-31.
- [44] Liu W, Zhang J, Weiss P, Tancret F, Bouler JM. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. *Acta Biomater.* 2013;9:5740-50.
- [45] Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9:857-79.
- [46] Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A.* 2007;82:336-42.
- [47] Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96:535-42.
- [48] Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:339-45.
- [49] Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2011;21:341-54.
- [50] Guerrero J, Catros S, Derkaoui SM, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* 2013;9:8200-13.
- [51] Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G, Le Visage C. Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci.* 2012;12:901-10.

- [52] Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* 2010;6:3640-8.
- [53] Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993;29A:699-707.
- [54] Thebaud NB, Bareille R, Remy M, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4:473-84.
- [55] Prins HJ, Fernandes H, Rozemuller H, van Blitterswijk C, de Boer J, Martens AC. Spatial distribution and survival of human and goat mesenchymal stromal cells on hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012.
- [56] Nassiri SM, Rahbarghazi R. Interactions of Mesenchymal Stem Cells with Endothelial Cells. *Stem Cells Dev.* 2013.
- [57] Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2010;12:1046-56.
- [58] Cao L, Liu G, Gan Y, Fan Q, Yang F, Zhang X, et al. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials.* 2012;33:5076-84.
- [59] Modder UI, Roforth MM, Nicks KM, Peterson JM, McCready LK, Monroe DG, et al. Characterization of mesenchymal progenitor cells isolated from human bone marrow by negative selection. *Bone.* 2012;50:804-10.
- [60] Marx RE, Tursun R. A qualitative and quantitative analysis of autologous human multipotent adult stem cells derived from three anatomic areas by marrow aspiration: tibia, anterior ilium, and posterior ilium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:e290-4.
- [61] Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, et al. In vivo comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet-rich plasma. *PLoS One.* 2012;7:e40833.
- [62] Hyer CF, Berlet GC, Bussewitz BW, Hankins T, Ziegler HL, Philbin TM. Quantitative assessment of the yield of osteoblastic connective tissue progenitors in bone marrow aspirate from the iliac crest, tibia, and calcaneus. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:1312-6.
- [63] Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, et al. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood.* 1994;84:10-9.
- [64] Gloria A, De Santis R, Ambrosio L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech.* 2010;8:57-67.
- [65] Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* 2001;15:447-57.
- [66] Alajati A, Laib AM, Weber H, Boos AM, Bartol A, Ikenberg K, et al. Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nat Methods.* 2008;5:439-45.
- [67] Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12:1347-60.

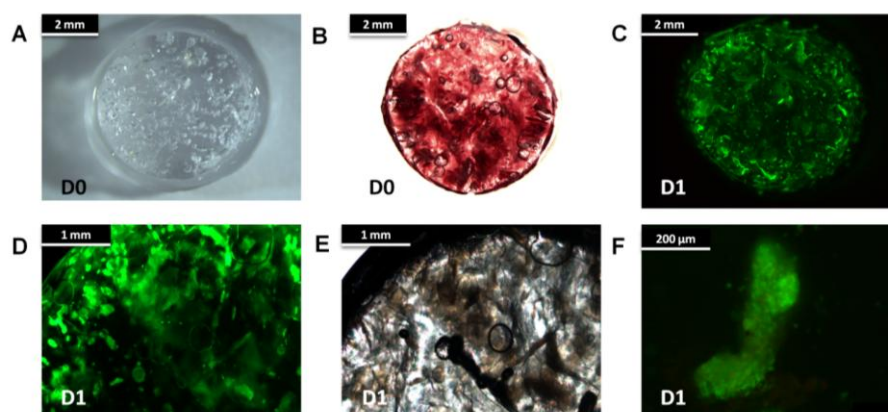
- [68] Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136:473-8.
- [69] Metzger W, Sossong D, Bachle A, Putz N, Wennemuth G, Pohlemann T, et al. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*. 2011;13:1000-12.
- [70] Fuchs S, Jiang X, Gotman I, Makarov C, Schmidt H, Gutmanas EY, et al. Influence of polymer content in Ca-deficient hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposites on the formation of microvessel-like structures. *Acta Biomater*. 2010;6:3169-77.
- [71] Shah AR, Shah SR, Oh S, Ong JL, Wenke JC, Agrawal CM. Migration of co-cultured endothelial cells and osteoblasts in composite hydroxyapatite/polylactic acid scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2011;39:2501-9.
- [72] Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C775-85.
- [73] Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:684-92.
- [74] Bae H, Ahari AF, Shin H, Nichol JW, Hutson CB, Masaeli M, et al. Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation. *Soft Matter*. 2011;7:1903-11.

## Figures and Legends



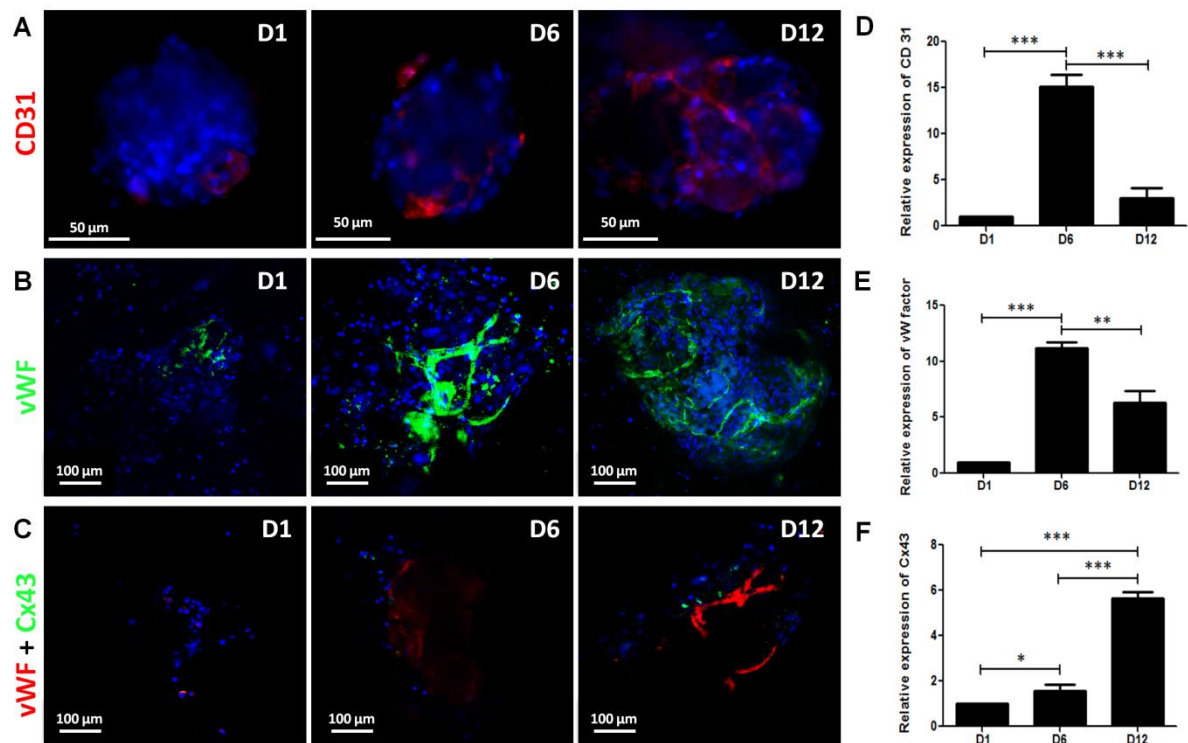
**Figure 1. Flow cytometry analysis and immunolabeling of hWBMCs in 2D culture.**

**(A)** Flow cytometry characterization of one freshly isolated hWBMC for mesenchymal lineage ( $CD73^+$  and  $CD34^-$  (9.5 $\pm$ 1.0%),  $CD105^+$  (10.0 $\pm$ 0.5%) and the  $CD271^+$  (12.0 $\pm$ 1.5%)) **(B)** Flow cytometry characterization of one freshly isolated hWBMC for endothelial lineage ( $CD31^+$  and  $CD34^+$  (6.3 $\pm$ 0.2%),  $CD146^+$  (5.0 $\pm$ 1.5%) and the  $CD29^+$  (8.0 $\pm$ 1.5%)). Six independent experiments were performed. **(C)** hWBMC immunocytochemistry for CD31 (in red), **(D)** Von Willebrand factor (in green) and **(E)** VE-cadherin (in red) at day 5 of 2D culture. Nucleus stained with DAPI.



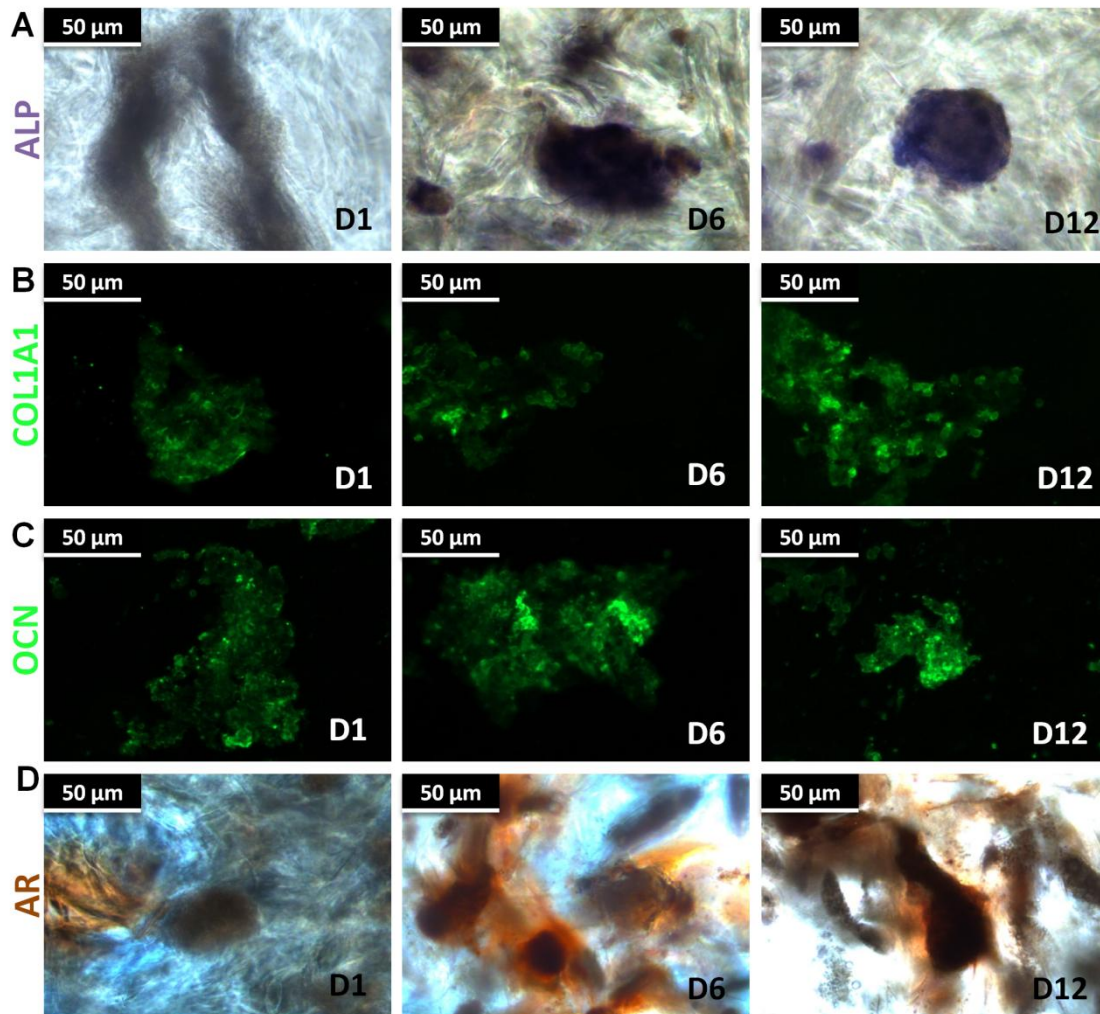
**Figure 2. Spheroid formation within 3D matrix.**

**(A)** Brightfield image of macroporous matrix after hydration with PBS at day 0 (D0). **(B)** Brightfield image of macroporous matrix after hWBMC seeding at day 0 (D0). **(C, D and F)** Calcein assay of hWBMCs after 1 day (D1) of culture within the macroporous matrix at different magnification. **(E)** Brightfield image of macroporous matrix after seeding with hWBMCs at day 1 (D1).



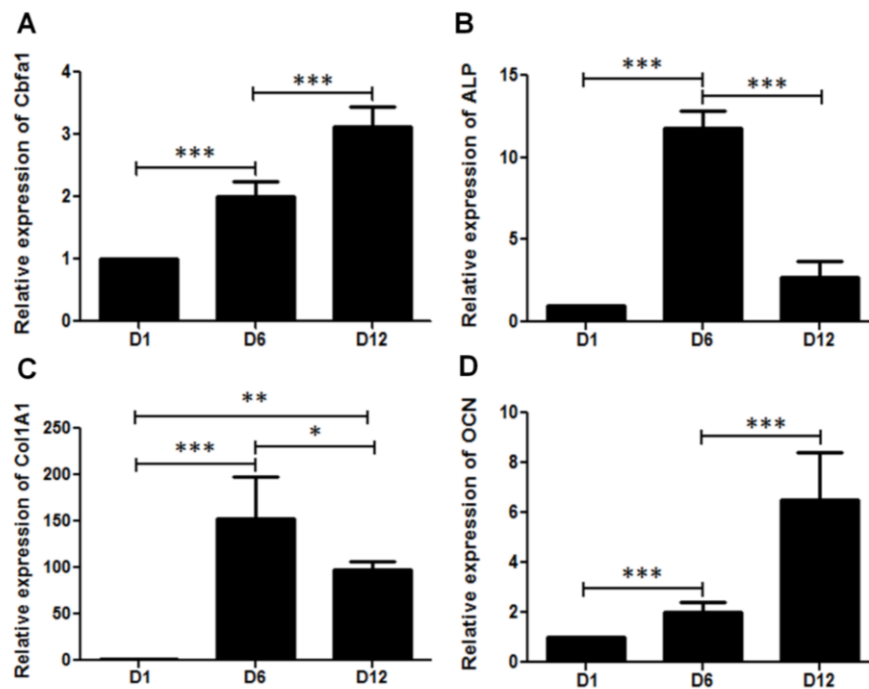
**Figure 3. Immunolabeling and quantitative gene expression for endothelial specific markers of hWBMCs. Connexin 43 immunolabeling and quantitative gene expression in hWBMCs.**

(A) CD31 (in red) and (B) Von Willebrand (vWF) factor (in green) immunolabeling after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture within the 3D polysaccharide-based scaffold. Nucleus stained with DAPI. (C) Von Willebrand factor (vWF, in red) and Connexin 43 (Cx43, in green) immunolabeling after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture, within the 3D polysaccharide-based scaffold. Nucleus stained with DAPI. (D) Quantitative gene expression of CD31 and (E) vWF in hWBMCs after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture within the 3D polysaccharide-based scaffolds. (F) Quantitative gene expression of Cx43 in hWBMCs after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture within 3D polysaccharide-based scaffolds. Four independent experiments were performed. \* and \*\*\* denotes  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively.



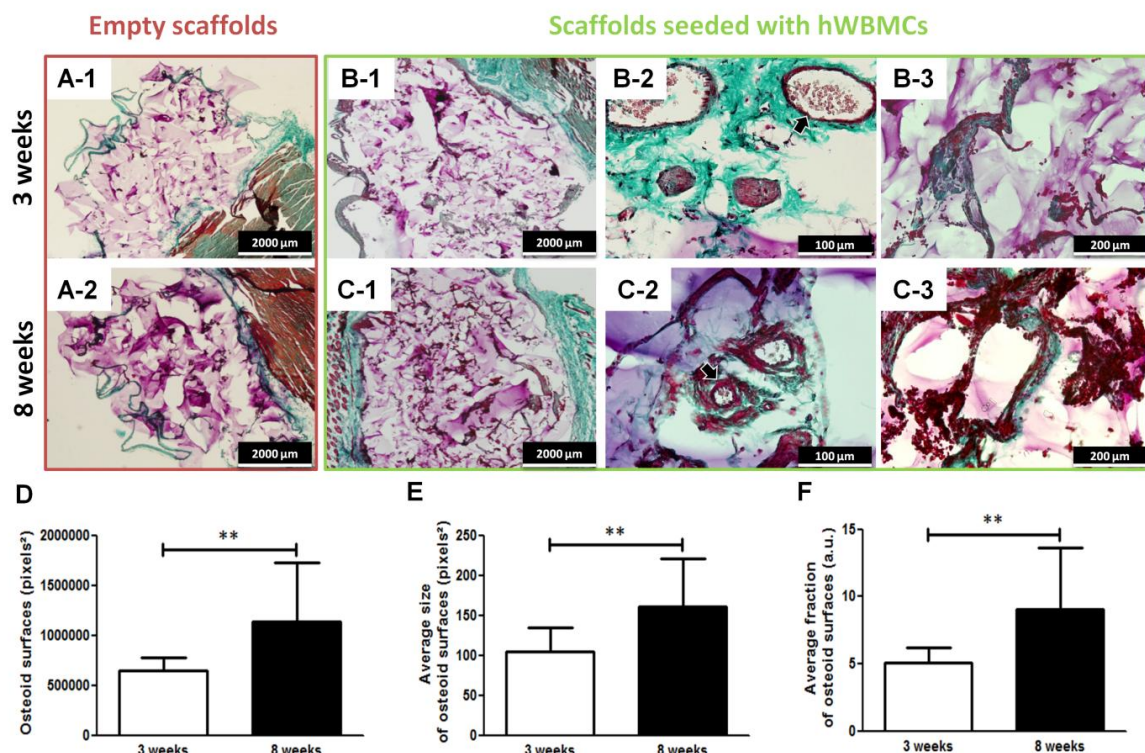
**Figure 4. Immunolabeling of bone-specific markers in hWBMC 3D cultures.**

**(A)** ALP cytochemistry detection after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture within the 3D polysaccharide-based scaffold. **(B)** Collagen type I (COL1A1, stained in green) and **(C)** osteocalcin (OCN, stained in green) immunolabeling after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture within the 3D polysaccharide-based scaffold. **(D)** Alizarin red staining of matrices after 1 (D1), 6 (D6) and 12 days (D12) of culture was performed to assess level of calcium deposition (in red).



**Figure 5. Quantitative analysis of bone-specific gene expression.**

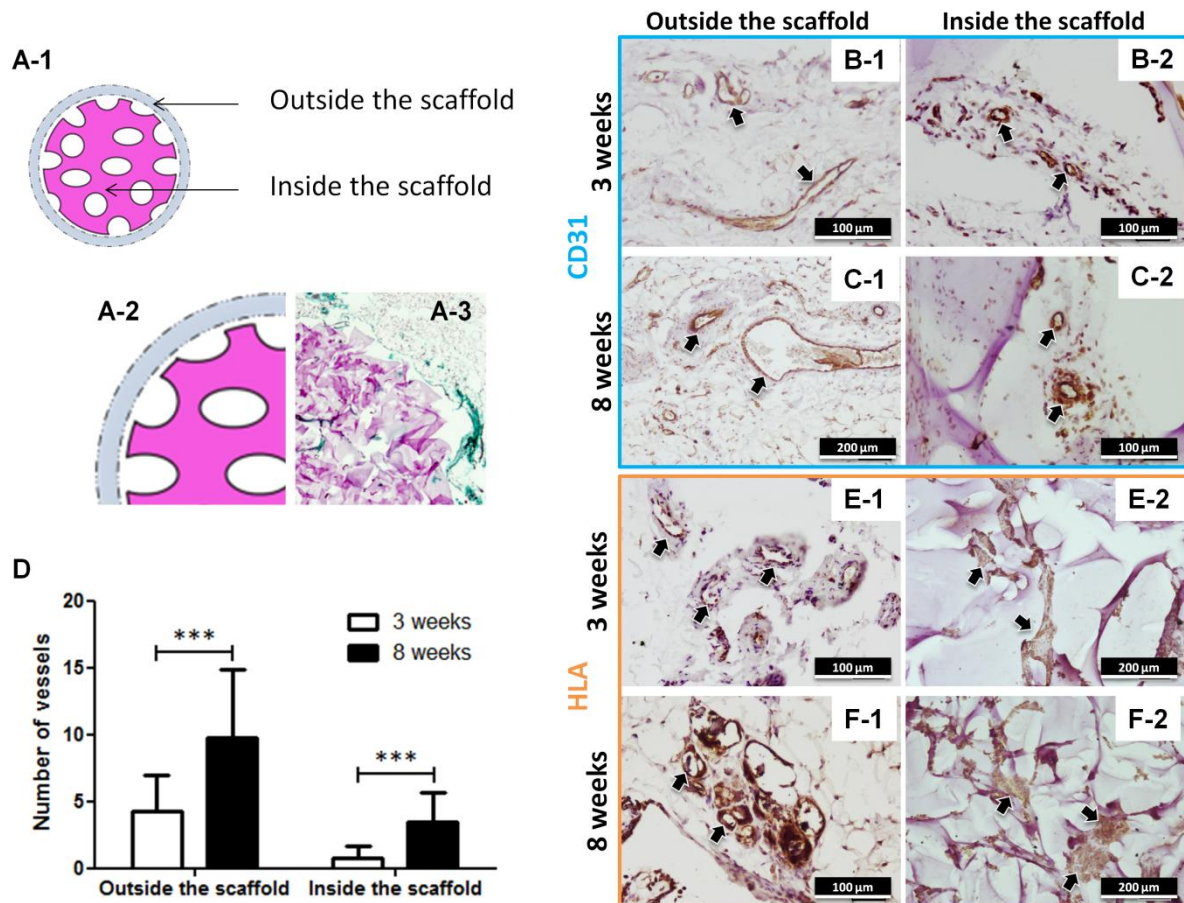
(A) Quantitative gene expression of Cbfa1, (B) ALP, (C) COL1A1, (D) OCN in 3D cultures of hWBMCs after 1 (D1), 6 (D6) to 12 days (D12). Four independent experiments were performed. \*, \*\* and \*\*\* denotes  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.



**Figure 6. Subcutaneous implantation in mice of matrices seeded with hWBMCs: histological and quantitative analysis.**

Masson's trichrome staining of histological sections at 3 and 8 weeks of implantation of cylinders without cells (A-1 and A-2, for 3 and 8 weeks, respectively) 6 mm diameter and 2

mm thickness, and at 3 (**B-1**) and 8 weeks (**C-1**) seeded with hWBMCs. Representative images of vascular structures (**B-2** and **C-2**, for 3 and 8 weeks, respectively) and osteoid tissue (**B-3** and **C-3**, for 3 and 8 weeks, respectively). Quantification of osteoid surface (**D**), average size of osteoid surface (**E**) and average fraction of osteoid surface (**F**) from images obtained at both time points (□: 3 weeks of implantation; ■: 8 weeks of implantation). Data presented as means  $\pm$  standard deviation for n=5 samples (scaffolds) for each group. \*\* denotes a statistically significant difference between groups,  $p < 0.01$ .



**Figure 7. Subcutaneous implantation in mice of matrices seeded with hWBMCs: immunohistochemistry for CD31 and HLA-I.**

(**A-1**) Schematic representation of the two areas defined for the immunohistochemistry analysis of the decalcified transversal sections of the subcutaneously implanted matrix loaded with hWBMCs: the interior and exterior are well defined as evidenced by comparison of the schematic representation (**A-2**) and matrix imaging (**A-3**). Representative zone of CD31 immunolabeling of sections after 3 weeks (**B-1** and **B-2**, for outside and inside, respectively) and 8 weeks (**C-1** and **C-2**, for outside and inside, respectively) of subcutaneous implantation of matrices loaded with hWBMCs. (**D**) Quantification of the number of vessels inside and outside the scaffold (□: 3 weeks of implantation; ■: 8 weeks of implantation). Data are presented as means  $\pm$  standard deviation for n=5 samples (scaffolds) for each group. \*\*\* indicates a statistically significant difference between groups,  $p < 0.001$ . Representative zone of human HLA-I immunolabeling of sections after 3 weeks (**E-1** and **E-2**, for outside and inside, respectively) and 8 weeks (**F-1** and **F-2**, for outside and inside, respectively) of

## C. Conclusions

Nous avons pu, dans ce travail, mettre en évidence, l'intérêt d'utiliser la fraction totale de moelle osseuse sans isolement et amplification cellulaire en 2D, pour favoriser l'angiogenèse et la formation osseuse en 3D.

Le but de cette étude a été dans un premier temps de caractériser les populations multicellulaires présentes dans cette suspension et principalement le lignage mésenchymateux et endothélial. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les capacités ostéogéniques et angiogéniques de la fraction totale de moelle osseuse dans une culture *in vitro*, puis *in vivo* après implantation en site ectopique.

La présence de ces deux lignages a été identifiée par cytométrie en flux. La population de cellules mésenchymateuses a été caractérisée à l'aide des marqueurs CD73, CD105 et CD271. La population des cellules du lignage endothéliale a été caractérisée à l'aide des marqueurs CD31, CD34, CD146 et CD29. Une foisensemencée au sein de la matrice de polymères décrite dans les deux premiers articles, la population multicellulaire s'organise sous forme d'agrégats multicellulaires intégrés dans les pores de la matrice de la même façon que dans les études précédentes (Article 1 et Article 2).

Ce microenvironnement 3D favorise la différenciation ostéoblastique des cellules de la moelle osseuse et permet la formation et le maintien d'un pseudo réseau vasculaire *in vitro* au cours du temps. De façon plus précise, cette culture tridimensionnelle stimule l'expression des marqueurs ostéoblastiques (PAL, Col1A1, Cbfa1, OCN) pendant les 12 jours de culture et la production d'une matrice extracellulaire minéralisée. De plus, nous avons pu observer la formation d'un pseudo réseau vasculaire au sein des agrégats cellulaires présents dans cette matrice. Le réseau vasculaire étant caractérisé par un marquage spécifique du CD31 et du vWF.

Par la suite, l'implantation en sous-cutané chez la souris Nog révèle la formation d'un tissu osseux vascularisé après 3 et 8 semaines. L'immunohistochimie du CD31 ainsi que le marquage de l'antigène humain HLA révèlent également la présence de cellules endothéliales humaines dans le réseau vasculaire formé en périphérie et au centre de l'implant.

En conclusion, ce travail met en lumière l'utilisation potentielle de la moelle osseuse humaine autologue pour les stratégies de régénération d'un tissu osseux vascularisé, en mettant l'accent sur une approche thérapeutique et chirurgicale simplifiée applicable en clinique.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'ensemble de nos résultats nous aura permis de mettre en évidence l'intérêt de la culture des cellules souches mésenchymateuses humaine de la moelle osseuse (HBMSCs) dans un environnement tridimensionnel (3D) et plus particulièrement au sein d'une matrice macroporeuse de polysaccharides par rapport à une culture « classique » en 2D.

Depuis des années, l'adhérence et l'étalement cellulaire était un pré-requis nécessaire à l'établissement de signaux cellulaires. Or, depuis peu, la culture de cellule dans des structures 3D, répond aux critères physiologiques d'un tissu. Dans ce travail, la culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse au sein de la matrice 3D combinant du pullulane et du dextrane, permet de créer un microenvironnement structural et biochimique propice aux HBMSCs et à l'orientation de leur phénotype vers le lignage ostéoblastique. Cette matrice peut ainsi servir de support à la culture des cellules en 3D mais également de vecteur cellulaire pour des applications précliniques en ingénierie tissulaire osseuse.

En ingénierie du tissu osseux, des cellules sont associées à des matériaux 3D servant de support aux cellules lors de leur culture.

Les cellules ensemencées et cultivées dans une culture dite « classique » en 2D forment généralement une monocouche cellulaire. Cette configuration peut limiter les interactions et les échanges cellule-cellule par l'établissement de jonctions adhérentes et/ou communicantes. La matrice 3D macroporeuse induit dans ce travail la formation de complexes multicellulaires, appelés agrégats, organisés en sphéroïdes distribués de façon homogène au sein des pores de la matrice de polysaccharides. Cet assemblage cellulaire tridimensionnel favorise les contacts entre cellules *via* des protéines jonctionnelles, comme le montre la surexpression protéique et génique de la Connexine 43 chez les HBMSCs, par rapport aux mêmes cellules en culture 2D.

De plus, la formation de ces agrégats cellulaires permet également de stimuler la différenciation ostéogénique, révélée par l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique précoces (ALP, COL1A1) et tardifs (OCN, Cbfa1/Runx2). Ces marqueurs de différenciation étaient absents dans la culture en 2D des HBMSCs durant la même période de culture. La configuration 3D permet également d'induire la production d'une matrice extracellulaire minéralisée, elle aussi absente dans la monocouche cellulaire de HBMSCs.

Cet environnement matriciel et cette conformation cellulaire sous forme d'agrégats activent dans tous les cas le dialogue intercellulaire, qu'il soit homotypique ou hétérotypique. Parmi les modes de communication cellule-cellule qui peuvent être sollicités, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude des Pannexines 1 et 3 dans les HBMSCs, en comparant une culture 3D et 2D au cours du temps. Dans un second temps, nous avons étudié principalement la communication des jonctions communicantes de type GAP, et plus particulièrement la fonction de la Connexine 43, pouvant intervenir entre les mêmes types cellulaires (entre HBMSCs) et/ou entre deux types cellulaires différents (entre HBMSCs et les

cellules du lignage endothéliale). L'un des aspects majeurs de ce travail a été d'identifier le rôle de la Cx43 dans la régulation de la différenciation ostéoblastique des HBMSCs au sein de la communication ostéo-endothéliale en 3D.

Nous avons décrit l'influence de la culture 3D des HBMSCs sur la surexpression des Pannexines par rapport à une culture en 2D. La Pannexine 1 est très majoritairement exprimée dans les agrégats cellulaires. D'autre part, nous avons observé une corrélation entre la surexpression de la Pannexine 3 et l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique chez les HBMSCs. Cette surexpression de la Pannexine 3 s'accompagne également de la surexpression de la Connexine 43. L'environnement 3D de cette matrice de polymères favorise ainsi les jonctions intercellulaires de type GAP et celles sollicitant l'activité des Pannexines.

Le rôle de la Pannexine 1 dans ce travail a été révélé par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette protéine, un inhibiteur pharmacologique et un peptide mimétique. Nous avons démontré que la Pannexine 1 était impliquée dans la compaction des agrégats cellulaires et que cette compaction n'avait a priori pas d'influence sur la différenciation des HBMSCs vers le phénotype ostéoblastique. Par ailleurs, l'inhibition de la Pannexine 1 par un peptide mimétique induit une surexpression de la Connexine 43 au bout de 4 jours de culture au sein de la matrice de polysaccharides. Cette surexpression pourrait être le reflet d'une compensation d'expression de la protéine des jonctions GAP en réponse à l'inhibition de la Pannexine 1. Il serait intéressant de définir les interactions entre ces deux jonctions communicantes ainsi que les voies de signalisation qui sont couplées dans ces deux types de jonctions intercellulaires.

Concernant la fonction de la Pannexine 3, une étude complémentaire semble nécessaire afin de déterminer plus précisément son rôle et son implication dans la différenciation des HBMSCs vers le lignage ostéoblastique en 3D. Nous aurons recours pour ce faire à une stratégie antisens.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons utilisé une stratégie de pré-vascularisation *in vitro* des matrices de polymères par des précurseurs ostéogènes et angiogènes. Les cellules endothéliales, utilisées comme composante endothéliale, sont des cellules progénitrices (PDECs) issues du sang de cordon ombilical. Ces cellules associées aux HBMSCs vont permettre de favoriser la formation d'un pré-réseau vasculaire.

Dans ce système *in vitro* de co-culture 3D, le phénotype ostéoblastique des HBMSCs est stimulé vers le lignage ostéoblastique par la présence de ces progéniteurs endothéliaux. De la même façon que dans les mono-cultures de HBMSCs en 3D, la communication entre les deux types cellulaires a été démontrée par l'inhibition de la Connexine 43 par un peptide mimétique spécifique (43GAP27).

Lors de cette inhibition, nous avons observé une diminution d'expression génique de la VE-Cadhérine, protéine responsable des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales.

La protéine composante des jonctions GAP pourrait donc avoir aussi un rôle dans la mise en place ou le maintien des jonctions adhérentes des cellules endothéliales. De même, l'inhibition de la Cx43 abolit l'effet positif de la co-culture et entraîne une diminution de tous les marqueurs de différenciation ostéoblastique.

Cependant, l'inhibition de la Cx43 sur la différenciation ostéoblastique n'est pas totale. Il existe donc probablement d'autres voies de communication qui permettent de contrôler la différenciation des HBMSCs en co-culture, telle que la production de facteurs de croissance ostéogène et angiogène. Leurs mécanismes précis restent donc à élucider.

Dans ce contexte d'ingénierie tissulaire et de thérapie cellulaire, l'idéal serait de disposer de la même source biologique pour les deux types cellulaires. Néanmoins, comme cela a pu être déjà décrit, l'utilisation de deux composantes cellulaires pour l'élaboration d'un produit d'ingénierie tissulaire soulève d'importantes limites pour une application clinique.

De nombreuses études publiées depuis de nombreuses années démontrent que la moelle osseuse contient à la fois des cellules microvasculaires, capables de former un pseudo réseau vasculaire dans une culture en 2D et des cellules mésenchymateuses.

La dernière partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude du devenir de la fraction totale de moelle osseuse humaine dans la matrice 3D de polysaccharides. Les principaux résultats ont montré *in vitro* la formation d'un pseudo réseau vasculaire (positif pour le CD31 et le facteur de von Willebrand) et l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique. Les structures vasculaires se développent et se ramifient au cours du temps dans les agrégats cellulaires formés au sein des pores de la matrice macroporeuse. Ces agrégats multicellulaires expriment tous les marqueurs du phénotype ostéoblastique (COL1A1, OCN, ALP, Cbfa1). La minéralisation de ces agrégats apparaît très précocement avec une matrice minéralisée positive à la coloration au rouge Alizarine.

Dans tous les cas, l'association de ces deux lignages cellulaires sans expansion ni amplification préalable, au sein d'une matrice pertinente, pourrait ouvrir d'importantes perspectives dans les techniques d'ingénierie du tissu osseux, principalement pour les pertes massives d'os où la vascularisation du tissu néoformé reste à ce jour la principale limite des techniques existantes.

Ces données *in vitro* et *in vivo* confirment l'intérêt d'utiliser extemporanément cette suspension de moelle osseuse humaine pour générer un tissu osseux vascularisé.

Une autre source cellulaire qui paraît jouer une fonction similaire est la fraction stromale vasculaire issues du tissu adipeux. Néanmoins, la suspension provenant de la moelle osseuse offre également la composante hématopoïétique qui n'a pas été étudiée dans ce travail et qui joue pourtant un rôle majeur dans les processus d'ostéoformation. De plus, la moelle osseuse est naturellement riche en facteurs de croissance, en facteurs ostéogéniques et en facteurs angiogéniques. Enfin, la fraction stromale vasculaire nécessite, avant son utilisation

une étape de digestion enzymatique du tissu adipeux afin de la séparer de la fraction adipocytaire.

L'une des perspectives de ce travail sera de placer les matrices de polymères cellularisées au sein d'un bioréacteur à perfusion afin de faciliter une meilleure circulation des nutriments, une oxygénation plus importante et l'élimination des déchets métaboliques cellulaires. La culture dynamique pourra également renforcer les interactions cellule-cellule, notamment par la transmission des contraintes mécaniques en signal biochimique par l'intermédiaire des jonctions communicantes et la Connexine 43.

En ce qui concerne les modèles expérimentaux utilisés dans ce travail, nos efforts se sont concentrés sur des modèles ectopiques chez la souris afin d'étudier le potentiel ostéoconducteur de la matrice cellularisée ainsi que le devenir des cellules humaines lors du processus d'ostéogénèse et de vascularisation.

Le modèle ectopique chez la souris Nude a permis de montrer que :

La co-culture de HBMSCs et d'EPCs améliore la cinétique de néoformation osseuse et la quantité de vaisseaux néoformés.

L'ensemencement extemporanément de la suspension totale de moelle osseuse humaine conduit à un résultat similaire de vascularisation et de régénération osseuse.

Un marquage des vaisseaux sanguins (CD31) ainsi qu'une détection de l'antigène HLA humain a permis de mettre en évidence la présence de structures vasculaires d'origine humaine à l'intérieur de la matrice ainsi qu'en périphérie de l'implant au bout de 8 semaines. Ceci démontre le maintien des cellules humaines au cours du temps dans le biomatériau ainsi que la participation des cellules humaines au processus de formation osseuse et de vascularisation en site ectopique.

La perspective de ce travail sera d'utiliser un modèle orthotopique chez le petit animal comme le modèle de lésion osseuse au niveau du condyle fémoral.

**En conclusion générale de ce travail, le succès des stratégies d'ingénierie cellulaires repose au moins sur les paramètres suivants :**

- **Disposer d'une matrice 3D capable de véhiculer les cellules ostéogéniques et vasculaires.**

- **Disposer d'une source cellulaire pertinente qui réponde au mieux aux aspects réglementaires en vu d'applications cliniques.**

- **Privilégier les mécanismes d'interactions cellulaires entre les cellules de différents lignages pour promouvoir la régénération tissulaire.**

Ce travail a été limité à l'ostéogenèse et la vascularisation ouvre d'importantes perspectives de recherche fondamentale et expérimentale sur le rôle du microenvironnement matriciel pour régénérer des tissus vascularisés et sur la fonction du tissu hématopoïétique sur l'ostéogenèse telles que :

- Disposer de modèles précliniques pertinents répondant aux besoins cliniques identifiés.

- Utiliser des techniques d'investigation à haute résolution permettant d'analyser de façon longitudinale les tissus néoformés.

Enfin, cette stratégie de régénération osseuse s'appuie en partie sur l'utilisation d'une composante cellulaire. La stratégie « sans cellules » peut offrir un intérêt potentiel pour l'ingénierie tissulaire pour des questions réglementaires, mais la condition requise sera de disposer d'une matrice structurée, modifiée, fonctionnalisée et qui devra répondre aux cahiers des charges d'un substitut osseux.

## **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

## Publications

- The use of total human bone marrow fraction in a direct 3D expansion approach for bone tissue engineering applications: focus on angiogenesis and osteogenesis.

**J. Guerrero**, H. Oliveira, S. Catros, R. Siadous, M. Derkaoui, R. Bareille, D. Letourneur, J. Amédée.

*Tissue Engineering Part A*, October 2014.

- Cell interactions between human endothelial cells and mesenchymal stem cells in a three dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold.

**J. Guerrero**, S. Catros, SM. Derkaoui, L. Lalande, R. Siadous, R. Bareille, N. Thebaud, L. Bordenave, O. Chassande, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*Acta Biomaterialia*, Septembre 2013.

- L'ingénierie tissulaire : reconstruire l'os.

**J. Guerrero**.

*Inserm Science et Santé*, N°16 Septembre-Octobre 2013

## Communications Orales dans des Congrès Nationaux ou Internationaux.

- Study of the interaction between endothelial progenitors and mesenchymal stem cells in a three-dimensional structure.

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

*JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Paris 2011, obtention d'un prix pour la communication orale.*

- Cells become from human bone marrow in a three-dimensional structure: osteogenesis and vascularization.

**J. Guerrero**, R. Siadous, R. Bareille, M. Derkaoui, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Bordeaux (France) 2012, obtention d'un prix pour la communication orale.*

- Study of the interaction between endothelial progenitors and mesenchymal stem cells in a polysaccharides matrix.

**J. Guerrero**, S. Catros, M. Derkaoui, R. Siadous, C. Lalande, R. Bareille, C. Bourget, N. Thebaud, L. Bordenave, O. Chassande, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amédée.

*Congrès Autour de la Cellule Souche, Bordeaux (France) 2013.*

- Regulation of 3D communication between osteogenesis and angiogenesis by connexin43.

**J. Guerrero**, C. Lalande, S. Ziane, R. Bareille, N. Thebaud, M. Derkaoui, L. Bordenave, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*IGJC (International Gap Junction Conference), Charleston, South Carolina (USA) 2013.*

- Study of the interaction between human progenitor endothelial cells and mesenchymal stem cells in a polysaccharide three-dimensional structure.

**J. Guerrero**, S. Catros, M. Derkaoui, R. Siadous, C. Lalande, R. Bareille, C. Bourget, N. Thebaud, L. Bordenave, O. Chassande, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Poitiers (France) 2013.*

- Human bone marrow as a single cell source of both endothelial and mesenchymal cell in bone tissue engineering.

**J. Guerrero**, H. de Oliveira, S. Catros, R. Siadous, R. Bareille, M. Derkaoui, D. Letourneur, J. Amedee.

*14ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale en Science de la Vie et de la Santé de Bordeaux, Arcachon (France), 2014.*

- Human bone marrow as a multicellular source for bone tissue engineering.

**J. Guerrero**, H. de Oliveira, S. Catros, R. Siadous, R. Bareille, M. Derkaoui, D. Letourneur, J. Amedee.

*JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés), Limoges (France) 2014, obtention d'un prix pour la communication orale.*

### **Communications affichées dans des Congrès Nationaux ou Internationaux.**

- The fate of human mesenchymal stem cells in 3d matrices for tissue engineering.

C. Lalande, S. Ziane, **J. Guerrero**, R. Siadous, R. Bareille, C. Bourget, J. Kalisky, D. Le Nihouannen, JC. Fricain, O. Chassande, J. Amedee.

GDR Mecanotransduction : Ecole thématique "Biomécanique et Bioingénierie du Vieillissement des Tissus", Marrakech (Maroc), 2011.

- Cell interactions between human endothelial cells and mesenchymal stem cells in a three dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold.

**J. Guerrero**, C. Lalande, S. Ziane, R. Bareille, N. Thebaud, M. Derkaoui, L. Bordenave, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society), Vienne (Autriche) 2012.*

- Cell interactions between human endothelial cells and mesenchymal stem cells in a three dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold.

**J. Guerrero**, C. Lalande, S. Ziane, R. Bareille, N. Thebaud, M. Derkaoui, L. Bordenave, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee.

*Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale en Science de la Vie et de la Santé de Bordeaux, Arcachon (France), 2013.*

- Development of an original model to investigate cell communication in bone tissue engineering.

A. Gremare, A. Aussel, R. Bareille, **J. Guerrero**, J. Amedee, D. Le Nihouannen.

*JFBTM (French Days for Biology of Mineralized Tissues), Limoges (France) 2014, obtention d'un prix pour la communication affichée.*

- Human bone marrow as a single cell source of both endothelial and mesenchymal cell in bone tissue engineering.

**J. Guerrero**, H. de Oliveira, S. Catros, R. Siadous, R. Bareille, M. Derkaoui, D. Letourneur, J. Amedee.  
*Assises Nationales de la Recherche en Biomatériaux, Autrans (France) 2014.*

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Marieb EN. Essentials of human anatomy & physiology. 10th ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings; 2012.
2. Maes C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif Tissue Int.* 2013 Apr;92(4):307-23.
3. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Jul;10(5):223-8.
4. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Jun;24(3):297-310.
5. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1195-201.
6. Wu JY, Scadden DT, Kronenberg HM. Role of the osteoblast lineage in the bone marrow hematopoietic niches. *J Bone Miner Res.* 2009 May;24(5):759-64.
7. Graneli C, Thorfve A, Ruetschi U, Brisby H, Thomsen P, Lindahl A, et al. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res.* 2014 Jan;12(1):153-65.
8. Cook D, Genever P. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 2013;786:213-29.
9. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci.* 2008;13:2001-21.
10. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1501-4.
11. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001 Jan;2(1):81-94.
12. Marom R, Shur I, Solomon R, Benayahu D. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):41-8.
13. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):29119-25.
14. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene.* 2006 Jan 17;366(1):51-7.
15. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):188-92.
16. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol.* 2003 Jun;38(6):605-14.
17. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jan;13(1):27-38.
18. Miyamoto T. Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *World J Orthop.* 2013;4(4):198-206.
19. Doan PL, Chute JP. The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2012 Jan;26(1):54-62.
20. Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Mar;24(1):37-47.
21. Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ. Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci.* 2002 Aug;17(4):435-47.
22. Guignandon A, Faure C, Neutelings T, Rattner A, Mineur P, Linossier MT, et al. Rac1 GTPase silencing counteracts microgravity-induced effects on osteoblastic cells. *FASEB J.* 2014 Jun 5.
23. Orwoll ES, Adler RA, Amin S, Binkley N, Lewiecki EM, Petak SM, et al. Skeletal health in long-duration astronauts: nature, assessment, and management recommendations from the NASA Bone Summit. *J Bone Miner Res.* 2013 Jun;28(6):1243-55.
24. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2009 Feb;9(2):108-22.

25. Hattersley G, Chambers TJ. Calcitonin receptors as markers for osteoclastic differentiation: correlation between generation of bone-resorptive cells and cells that express calcitonin receptors in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*. 1989 Sep;125(3):1606-12.
26. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med*. 2011;17(11):1473-80.
27. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep*. 2012;1:183.
28. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597-602.
29. Fleischmajer R, Perlsh JS, Olsen BR. Amino and carboxyl propeptides in bone collagen fibrils during embryogenesis. *Cell Tissue Res*. 1987 Jan;247(1):105-9.
30. Jabalee J, Hillier S, Franz-Odenaal TA. An investigation of cellular dynamics during the development of intramembranous bones: the scleral ossicles. *J Anat*. 2013 Oct;223(4):311-20.
31. Jiang Z, Von den Hoff JW, Torensma R, Meng L, Bian Z. Wnt16 is involved in intramembranous ossification and suppresses osteoblast differentiation through the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Physiol*. 2014 Mar;229(3):384-92.
32. Rubin R, Strayer DS, Rubin E. Rubin's pathology : clinicopathologic foundations of medicine. Sixth Edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
33. Lee JS, Ryu CH, Moon NH, Kim SJ, Park SY, Suh KT. Changes in serum levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, IL-6 and TNF-alpha in patients with a concomitant head injury and fracture. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009 May;129(5):711-8.
34. Padilla F, Puts R, Vico L, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound: A review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics*. 2014 Jul;54(5):1125-45.
35. Schwarz C, Wulsten D, Ellinghaus A, Lienau J, Willie BM, Duda GN. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1-2):247-54.
36. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, et al. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone*. 2010 Aug;47(2):219-28.
37. Liu Y, Cao L, Ray S, Thormann U, Hillengass J, Delorme S, et al. Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model. *Injury*. 2013 Jul;44(7):923-9.
38. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, Duerselen L, Kampschulte M, Lips K, et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. 2014 Mar;45(3):487-93.
39. Carulli C, Innocenti M, Brandi ML. Bone vascularization in normal and disease conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:106.
40. Eastlund T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant*. 1995 Sep-Oct;4(5):455-77.
41. Friedlaender GE. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1987 Dec(225):17-21.
42. Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Basle MF, Rebel A. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*. 1993 Jun;14(7):507-12.
43. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar(324):66-74.
44. Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K, Stachowicz W, Michalik J, Grzesik W. 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*. 1991 Nov(272):30-7.
45. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2000 Jun;45(3):346-53.

46. Pelissier P, Boireau P, Martin D, Baudet J. Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Jun;111(7):2223-9.
47. Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*. 2011 Jun;42(6):591-8.
48. Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct(355 Suppl):S239-46.
49. Vinatier C, Bordenave L, Guicheux J, Amedee J. [Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering]. *Med Sci (Paris)*. 2011 Mar;27(3):289-96.
50. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*. 2008 Jul;213(1):66-72.
51. Van Blitterswijk C. Tissue engineering.
52. Davison NL, Gamblin AL, Layrolle P, Yuan H, de Bruijn JD, Barrere-de Groot F. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2014 Jun;35(19):5088-97.
53. Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Habibovic P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomater*. 2014 Jan 17;4(1).
54. Zein I, Huttmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(4):1169-85.
55. Guarino V, Ambrosio L. Temperature-driven processing techniques for manufacturing fully interconnected porous scaffolds in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010 Dec;224(12):1389-400.
56. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005 Nov 18;310(5751):1139-43.
57. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):677-89.
58. Timmer MD, Ambrose CG, Mikos AG. In vitro degradation of polymeric networks of poly(propylene fumarate) and the crosslinking macromer poly(propylene fumarate)-diacrylate. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(4):571-7.
59. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Muller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Sep 1;70(3):370-9.
60. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2405-12.
61. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.
62. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014-7.
63. Kretlow JD, Mikos AG. Review: mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007 May;13(5):927-38.
64. Zijdeveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 May-Jun;20(3):432-40.
65. Jell G, Stevens MM. Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):997-1002.
66. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 15;80(4):837-51.
67. Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AM, de Ruiter A, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 3;107(31):13614-9.

68. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3565-75.
69. Granja PL, De Jeso B, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Barbosa MA. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels induced by human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater*. 2005;10:31-7; discussion 7-9.
70. Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Aug;82(2):336-42.
71. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*. 2006 Aug 7;6(8):623-33.
72. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Mar Drugs*. 2010;8(8):2252-66.
73. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*. 2008 May;63(5):492-6.
74. MacIntosh AC, Kearns VR, Crawford A, Hatton PV. Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Mar-Apr;2(2-3):71-80.
75. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Jun;14(2):199-215.
76. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3413-31.
77. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004 Mar;32(3):477-86.
78. Lubiawski P, Kruczyński J, Gradyś A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 2006 Jan-Feb;38(1):320-2.
79. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May 30;59(4-5):339-59.
80. Akman AC, Tigli RS, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. bFGF-loaded HA-chitosan: a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Mar 1;92(3):953-62.
81. Tigli RS, Akman AC, Gumusderelioglu M, Nohutcu RM. In vitro release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2009;20(13):1899-914.
82. Leal D, Matsushiro B, Rossi M, Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res*. 2008 Feb 4;343(2):308-16.
83. Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, et al. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials*. 2007 Sep;28(25):3644-55.
84. Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials*. 2009 Jul;30(19):3271-8.
85. Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater*. 2010 Sep;6(9):3640-8.
86. Park JB. The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jan;16(1):e115-8.
87. Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, et al. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*. 2002 Dec;23(24):4739-51.
88. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 Jul;4(7):518-24.
89. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):863-6.
90. Cushing MC, Anseth KS. Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1133-4.

91. Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Muller R, et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol.* 2003 May;21(5):513-8.
92. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2010 Jul 1;47(1):1-4.
93. Chen L, Hu J, Ran J, Shen X, Tong H. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2014 Apr;65:1-7.
94. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
95. Handschel J, Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich RA, Ommerborn MA, et al. Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2010 Aug;16(8):2475-83.
96. Rutledge KE, Cheng Q, Pryzhkova M, Harris G, Jabbarzadeh E. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells on ECM-containing osteomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 Mar 18.
97. Taiani JT, Buie HR, Campbell GM, Manske SL, Krawetz RJ, Rancourt DE, et al. Embryonic stem cell therapy improves bone quality in a model of impaired fracture healing in the mouse; tracked temporally using in vivo micro-CT. *Bone.* 2014 Apr 26.
98. Jukes JM, Both SK, van Blitterswijk CA, de Boer J. Potential of embryonic stem cells for in vivo bone regeneration. *Regen Med.* 2008 Nov;3(6):783-5.
99. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011 Apr;15(4):718-46.
100. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001;19(3):180-92.
101. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.
102. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 2005 May-Jun;11(5-6):787-802.
103. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
104. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999 Oct;181(1):67-73.
105. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials.* 2008 Oct;29(29):3973-82.
106. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001 Feb 1;344(5):385-6.
107. Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs.* 2006 Feb;30(2):115-8.
108. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):72-84.
109. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008 Jun;45(2):115-20.
110. Tapp H, Hanley EN, Jr., Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009 Jan;234(1):1-9.

111. Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010 Dec;5(6):062001.
112. Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells.* 2007 Jul;25(7):1823-9.
113. Scherberich A, Muller AM, Schafer DJ, Banfi A, Martin I. Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol.* 2010 Nov;225(2):348-53.
114. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 14;342(3):902-8.
115. Hao W, Pang L, Jiang M, Lv R, Xiong Z, Hu YY. Skeletal repair in rabbits using a novel biomimetic composite based on adipose-derived stem cells encapsulated in collagen I gel with PLGA-beta-TCP scaffold. *J Orthop Res.* 2010 Feb;28(2):252-7.
116. Muller AM, Mehrkens A, Schafer DJ, Jaquiere C, Guven S, Lehmiche M, et al. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater.* 2010;19:127-35.
117. Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012 Apr;30(4):634-42.
118. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. *J Orthop Res.* 2012 Sep;30(9):1507-15.
119. Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. *Stem Cell Rev.* 2011 Sep;7(3):608-15.
120. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2813-23.
121. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
122. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005 Aug;20(8):1394-402.
123. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J.* 2008 Aug;34(2):52-67.
124. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1:e79.
125. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166-71.
126. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):39-49.
127. Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):518-29.
128. Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell.* 2011 Feb 4;144(3):439-52.
129. Fu Y, Deng S, Wang J, Chen Z, Zhang S, Wu S, et al. Potential replication of induced pluripotent stem cells for craniofacial reconstruction. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014 May;9(3):205-14.

130. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):313-5.
131. Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, Ross AM, Lahann J, Parent JM, et al. Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells.* 2012 Jun;30(6):1174-81.
132. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct(355 Suppl):S66-72.
133. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(6):CD006950.
134. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Mar 18;220(2):366-71.
135. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Jan;2(1):1-13.
136. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaïli MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2008 Jul 25;283(30):20948-58.
137. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):80-6.
138. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov Today.* 2004 Sep 15;9(18):803-11.
139. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng.* 2004 Jan;32(1):112-22.
140. Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 3;101(31):11203-8.
141. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials.* 2001 Jun;22(11):1279-88.
142. Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *Tissue Eng.* 2003 Dec;9(6):1205-14.
143. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, et al. 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.* 2002 Oct 1;99(20):12600-5.
144. Robling AG, Bellido T, Turner CH. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006 Oct-Dec;6(4):354.
145. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.
146. Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One.* 2014;9(7):e102359.
147. Hirt C, Papadimitropoulos A, Mele V, Muraro MG, Mengus C, Iezzi G, et al. "In vitro" 3D models of tumor-immune system interaction. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 May 9.
148. Di Maggio N, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials.* 2011 Jan;32(2):321-9.
149. Guven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials.* 2011 Sep;32(25):5801-9.

150. Das A, Botchwey E. Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 Dec;17(6):403-14.
151. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jul;86-A(7):1541-58.
152. Buschmann J, Welti M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, et al. 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.* 2011 Feb;17(3-4):291-9.
153. Li H, Xue K, Kong N, Liu K, Chang J. Silicate bioceramics enhanced vascularization and osteogenesis through stimulating interactions between endothelial cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2014 Apr;35(12):3803-18.
154. Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008 Dec;3(4):254-64.
155. Joensuu K, Paatero I, Alm JJ, Elenius K, Aro HT, Heino TJ, et al. Interaction between marrow-derived human mesenchymal stem cells and peripheral blood mononuclear cells in endothelial cell differentiation. *Scand J Surg.* 2011;100(3):216-22.
156. Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2011 Sep;17(17-18):2199-212.
157. Yu H, Vandevord PJ, Gong W, Wu B, Song Z, Matthew HW, et al. Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells. *J Orthop Res.* 2008 Aug;26(8):1147-52.
158. Kaigler D, Pagni G, Park CH, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV. Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2010 Sep;16(9):2809-20.
159. Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA, Knight KR. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg.* 2002 Dec;55(8):603-10.
160. Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K, Morrison WA. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plast Reconstr Surg.* 2003 Nov;112(6):1636-44.
161. Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009 Sep;15(3):353-70.
162. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol.* 2003 Nov-Dec;12(6):295-310.
163. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol.* 2001 Nov;19(11):1029-34.
164. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005 Jan 7;307(5706):58-62.
165. Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, et al. Cell-demand release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2260-2.
166. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, et al. Cell-demand liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res.* 2004 Apr 30;94(8):1124-32.
167. Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, et al. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 12;105(32):11099-104.
168. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 2005 May;20(5):848-57.

169. Marie PJ, Hay E, Saidak Z. Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Jul 14.
170. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17;278(42):41227-36.
171. Ferrari SL, Traianedes K, Thorne M, Lafage-Proust MH, Genever P, Cecchini MG, et al. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):198-208.
172. Lemonnier J, Hay E, Delannoy P, Lomri A, Modrowski D, Caverzasio J, et al. Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis. *J Bone Miner Res.* 2001 May;16(5):832-45.
173. Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R. Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment. *J Bone Miner Res.* 2006 Dec;21(12):1821-7.
174. Castro CH, Shin CS, Stains JP, Cheng SL, Sheikh S, Mbalaviele G, et al. Targeted expression of a dominant-negative N-cadherin in vivo delays peak bone mass and increases adipogenesis. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1;117(Pt 13):2853-64.
175. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):836-41.
176. Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol.* 1992 Oct;119(1):179-89.
177. Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2516-24.
178. Bond SR, Naus CC. The pannexins: past and present. *Front Physiol.* 2014;5:58.
179. Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, et al. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *J Biol Chem.* 2010 Aug 6;285(32):24420-31.
180. Shin CS, Her SJ, Kim JA, Kim DH, Kim SW, Kim SY, et al. Dominant negative N-cadherin inhibits osteoclast differentiation by interfering with beta-catenin regulation of RANKL, independent of cell-cell adhesion. *J Bone Miner Res.* 2005 Dec;20(12):2200-12.
181. Loisel AE, Paul EM, Lewis GS, Donahue HJ. Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. *J Orthop Res.* 2013 Jan;31(1):147-54.
182. Li Z, Zhou Z, Yellowley CE, Donahue HJ. Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone.* 1999 Dec;25(6):661-6.
183. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, et al. Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res.* 2001 Apr 1;264(2):397-407.
184. Geneau G, Lamiche C, Niger C, Strale PO, Clarhaut J, Defamie N, et al. Effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexin43: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43<sup>-/-</sup> and Cx43<sup>+/+</sup> mice. *Cell Tissue Res.* 2010 Apr;340(1):103-15.
185. Zappitelli T, Aubin JE. The "Connexin" Between Bone Cells and Skeletal Functions. *J Cell Biochem.* 2014 May 12.
186. Schajnovitz A, Itkin T, D'Uva G, Kalinkovich A, Golan K, Ludin A, et al. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol.* 2011 May;12(5):391-8.
187. Rossello RA, Wang Z, Kizana E, Krebsbach PH, Kohn DH. Connexin 43 as a signaling platform for increasing the volume and spatial distribution of regenerated tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13219-24.
188. Milsom MD, Trumpp A. Bridging the information gap. *Nat Immunol.* 2011 May;12(5):377-9.
189. Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res.* 2000 May;15(5):919-26.

190. Ilvesaro J, Tavi P, Tuukkanen J. Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord*. 2001;2:10.
191. Matemba SF, Lie A, Ransjo M. Regulation of osteoclastogenesis by gap junction communication. *J Cell Biochem*. 2006 Oct 1;99(2):528-37.
192. Plotkin LI. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front Physiol*. 2014;5:131.
193. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*. 2000 Feb;15(2):209-17.
194. Minkoff R, Rundus VR, Parker SB, Hertzberg EL, Laing JG, Beyer EC. Gap junction proteins exhibit early and specific expression during intramembranous bone formation in the developing chick mandible. *Anat Embryol (Berl)*. 1994 Sep;190(3):231-41.
195. Iovine MK, Higgins EP, Hindes A, Coblitz B, Johnson SL. Mutations in connexin43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins. *Dev Biol*. 2005 Feb 1;278(1):208-19.
196. Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 8;106(49):20794-9.
197. Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 20;1719(1-2):69-81.
198. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):408-18.
199. Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol*. 2011 Jun 27;193(7):1257-74.
200. Bond SR, Lau A, Penuela S, Sampaio AV, Underhill TM, Laird DW, et al. Pannexin 3 is a novel target for Runx2, expressed by osteoblasts and mature growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 2011 Dec;26(12):2911-22.
201. Penuela S, Celetti SJ, Bhalla R, Shao Q, Laird DW. Diverse subcellular distribution profiles of pannexin 1 and pannexin 3. *Cell Commun Adhes*. 2008 May;15(1):133-42.
202. Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC. Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1545-54.
203. Bao BA, Lai CP, Naus CC, Morgan JR. Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2012 Mar 9;287(11):8407-16.
204. Conn PM. Sourcebook of models for biomedical research. Totowa, N.J.: Humana Press; 2008.
205. Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):665-7.
206. Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G, Yang B. In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed Eng Online*. 2007;6:41.
207. Geuze RE, Wegman F, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Influence of endothelial progenitor cells and platelet gel on tissue-engineered bone ectopically in goats. *Tissue Eng Part A*. 2009 Nov;15(11):3669-77.
208. Luo F, Hou TY, Zhang ZH, Xie Z, Wu XH, Xu JZ. Effects of initial cell density and hydrodynamic culture on osteogenic activity of tissue-engineered bone grafts. *PLoS One*. 2013;8(1):e53697.
209. Kim SS, Park MS, Cho SW, Kang SW, Ahn KM, Lee JH, et al. Enhanced bone formation by marrow-derived endothelial and osteogenic cell transplantation. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jan;92(1):246-53.
210. Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z, Finkenzeller G. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A*. 2011 Feb;17(3-4):311-21.
211. Kaigler D, Krebsbach PH, Wang Z, West ER, Horger K, Mooney DJ. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration. *J Dent Res*. 2006 Jul;85(7):633-7.

212. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol*. 2006 Dec;33(12):922-8.
213. Levengood SL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2014 Jun 7;2(21):3161-84.
214. Yu D, Li Q, Mu X, Chang T, Xiong Z. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Oct;37(10):929-34.
215. Yu H, VandeVord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(4):508-17.
216. Zhou J, Lin H, Fang T, Li X, Dai W, Uemura T, et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1171-9.
217. Huang J, Zhang L, Chu B, Peng X, Tang S. Repair of bone defect in caprine tibia using a laminated scaffold with bone marrow stromal cells loaded poly (L-lactic acid)/beta-tricalcium phosphate. *Artif Organs*. 2011 Jan;35(1):49-57.
218. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Jul;80(7):985-96.
219. Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater*. 2013 Aug;9(8):7874-84.
220. Barbetta A, Bedini R, Pecci R, Dentini M. Role of X-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(1):10-8.
221. Bolland BJ, Kanczler JM, Dunlop DG, Oreffo RO. Development of in vivo muCT evaluation of neovascularisation in tissue engineered bone constructs. *Bone*. 2008 Jul;43(1):195-202.
222. Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, et al. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology*. 2005 Jun;235(3):959-67.
223. Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amedee J, et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication*. 2010 Mar;2(1):014101.
224. Ventura M, Sun Y, Cremers S, Borm P, Birgani ZT, Habibovic P, et al. A theranostic agent to enhance osteogenic and magnetic resonance imaging properties of calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2014 Feb;35(7):2227-33.
225. Buie HR, Bosma NA, Downey CM, Jirik FR, Boyd SK. Micro-CT evaluation of bone defects: applications to osteolytic bone metastases, bone cysts, and fracture. *Med Eng Phys*. 2013 Nov;35(11):1645-50.
226. Ziane S, Schlaubitz S, Miraux S, Patwa A, Lalande C, Bilem I, et al. A thermosensitive low molecular weight hydrogel as scaffold for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2012;23:147-60; discussion 60.
227. Dong Z, Li B, Zhao J, Ma Q, Bai S, Yang W, et al. Prefabrication of vascularized bone grafts using a combination of bone marrow mesenchymal stem cells and vascular bundles with beta-tricalcium phosphate ceramics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Nov;114(5 Suppl):S153-9.
228. Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(31):7822-30.
229. Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Feb;18(2):339-45.
230. Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(32):5546-53.

231. Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 17;322(2):684-92.