



Etude de l'environnement 3D du tissu osseux :
Applications en thérapies
régénératrice et anti-tumorale

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie-Santé
Ingénierie Tissulaire Osseuse

Présentée

et soutenue publiquement par

Anne Laure GAMBLIN

Le 30 Octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M. PETITE Hervé, Directeur de recherche INSERM, Paris

M. PRALORAN Vincent, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier CHU, Bordeaux

Examineurs

Mme. CHEVALLIER Nathalie, Chargée de recherche EFS, Paris

M. ROSSET Philippe, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier CHU, Tours

Directeurs de thèse

M. LAYROLLE Pierre, Directeur de recherche INSERM, Nantes

Mme. TRICHET Valérie, Maître de conférences des Universités, Nantes

ETUDE DE L'ENVIRONNEMENT 3D DU TISSU OSSEUX :

APPLICATIONS EN THERAPIES
REGENERATIVE ET ANTI-TUMORALE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et Thérapie des tumeurs osseuses primitives, et financé par une bourse INSERM Région Pays de la Loire et par le programme européen REBORNE.

Je tiens à remercier le directeur de laboratoire, Dominique HEYMANN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie Hervé PETITE et Vincent PRALORAN de me faire le grand honneur en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Nathalie CHEVALLIER et Philippe ROSSET pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs qui ont encadré cette thèse : Valérie TRICHET et Pierre LAYROLLE, pour l'aide qu'ils m'ont apportée, pour leur patience et pour leur soutien pendant ces quatre dernières années. Votre parfaite compatibilité m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Merci Valérie pour tes nombreux conseils, pour tes encouragements, pour m'avoir expliqué encore et encore les symboles qu'il faut mettre sur un graphique de PCR ou de FACS (parce que ça ne rentre pas la 1ere, ni la 2eme, ni la 50eme fois...) Merci pour ta vision de la thèse et de l'après thèse qui nous permet de si facilement discuter de tout et de rien, du plus important comme du plus insignifiant.

Merci Pierre pour votre confiance lors de mon stage de M2 et par la suite pendant la thèse. Merci pour vos conseils et votre compétence, pour votre enthousiasme et votre impatience qui m'ont fait penser que mes manips et mes résultats étaient aussi intéressants pour moi que pour les autres.

La team de bureau : Bérengère, Rachel et Pierre. Merci de m'avoir supporté... parfois pendant 3 ans. Merci pour les délires, pour les pétages de cable.

Merci Bérengère, pour avoir été là pour les pauses clopes même si je fume plus mais que c'est très difficile de ne pas reprendre ;) Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés au fil de ces années. Merci pour ma petite plante chérie qui a survécu à ton départ (bon, faut être réaliste, elle a eu du mal à s'adapter les premiers mois mais c'est juste parce que tu lui manquais, je suis sûre :D).

Merci Rachel, pour avoir pris merveilleusement le relais de Bérengère en étant toujours tout sourire quand le moral diminuait. Merci pour ton excellent travail. Merci pour les pringgles le matin qui me font exploser de rire! ben quoi, c'est bon les chips à 8h :D Merci pour les innombrables discussions sur tout et sur rien et surtout sur tout !

Et enfin Pierre, Merci à mon super voisin de bureau pour nos pauses thé, nos pauses musique... si t'as besoin de quelqu'un pour te mettre une chanson dans la tête à 8h du matin, n'hésite pas je serais toujours là. Merci pour ce merveilleux week end à belle-île.

A la meilleure des meilleurs, Merci milles fois à Audrey R. Merci de m'avoir formée à mon travail, de m'avoir tout appris, les complexes, les intra-musculaires, les calvarias. Je sais pertinemment que cette thèse, il faudrait nos 2 noms dessus parce qu'elle ne serait pas là sans toi. Merci pour ces 4 années à me supporter, à me faire des MSC quand j'arrivais plus à gérer tous les projets. Merci pour les délires, pour le bac de glace (t'inquiètes j'aurais ma revanche, aujourd'hui ou un jour, mais t'inquiètes je n'oublie pas), et enfin pour les sourires qui veulent tout dire.

Régis, l'incontournable. Merci de répondre toujours présent pour nous, d'être un soutien indéfectible du labo. Merci de m'avoir aidée et de t'être creusé la tête pour tout un tas de manips. Ah ben oui ! Elles étaient franchement sympas les manips de MSC de sang de cordon. RRRRRRhhhhh. Et les facs qui marchent pas, on en parle pas assez de ces...facs qui marchent pas !!! Merci aussi pour être toujours là même en dehors du labo.

Aude !!! Ma petite Audette !!! Avant toute chose, 1) j'étais super contente de pouvoir assister à ta thèse 2) si je n'ai pas eu le courage de sortir de ma tanière et d'assister à ta thèse, je suis vraiment désoléeeee. Merci pour ces 3 années, pour les délires, pour les soirées, pour les « Anne Laure, je vais manger, tu viens » à 11h50... et je ne parle pas de tes envies toutes les 5 secondes d'aller aux toilettes (ah ben si en fait). Merci pour les innombrables conversations dans les bureaux. Merci pour tes confidences. Je sais que tout se passera bien pour vous. Faudra que tu me donnes ton adresse pour notre prochain voyage aux états unis :D

Merci à la petite team histo : Julie C, Kévin, Marie et (encore) Rachel pour le soutien indéfectible, pour tous les questionnements qu'on a eu sur tel ou tel anticorps, sur tel ou tel marquage que je n'arrive pas à faire marcher mais que je suis sûre que j'y suis presque. Merci pour les moments « coupes » qui permettent de papoter et qui donnent de supers résultats.

L'une des meilleurs aussi, Céline. Merci de m'avoir autant aidé en 142 et ailleurs, pour les poches de sang, pour la culture, pour l'extraction d'ARN (bon faut dire que j'étais un bon boulet). Merci pour le soutien quand tout n'allait pas fort, merci d'avoir été là discrètement et d'avoir dit les mots parfaits.

Merci à la team Reborne, Meadhbh, Eric et Annie pour l'aide que vous m'avez apporté chacun à votre tours. Merci Meadhbh pour m'aider à faire illusion que je parle un peu anglais (merci pour les corrections de reverso), pour avoir corrigé mes 2 articles. Merci Eric, pour toute l'aide apportée pour le brevet, merci de ton excellent travail dans tes manip vivo et vitro. Moi qui avais du mal à laisser mon bébé, c'était vraiment super finalement. Et merci Annie pour tout le soutien dans l'organisation de mes congrès, dans les commandes et dans tout ce qui ne marche pas mais que tu remets en place en un claquement de doigts (un appel en plein vol pour me dire que la grève est toujours en cours en France mais que tu as déjà anticipé et changé mon train :D).

Et enfin, juste pour rigoler, merci à François, Benjamin, Marco pour leur ~soutien~ vraiment extraordinaire. Merci d'être venu nous dire quasiment tous les jours que le temps avançait et qu'il allait être temps d'écrire. Merci d'avoir essayé de nous stresser jours après jours, de m'avoir embêtée parce que je rédige, eh oui, en regardant un film. Vous m'avez permis d'apprendre à le faire en écoutant la musique :D

François, merci d'avoir discuté de pleins de choses, de la rédaction, des articles et de l'après thèse. Ca m'a vraiment aidé.

Je remercie évidemment tous les membres du laboratoire pour leur aide mais aussi pour le plaisir d'avoir travaillé avec vous. Merci à Lidia, Luis (pour les discussions sur les ostéomacs et tout ce qui n'en est pas mais qui y ressemble), Romain (pour l'AMG, pour les discussions politico-religieuses et pour les pauses thé), Kévin, Marta (pour les HOSeGFP que j'ai la flemme de maintenir en culture et que tu mes redonnes tous les 4 matins), Camille (pour la luciférase, pour t'être occupée des stagiaires quand je connaissais pas la manip), Audrey L, Frédéric B, Audrey G, Clothilde, Marguerite, Sandrine, Benjamin (pour les discussions tôt le matin et tard le soir), Mathias (pour ton expertise des anticorps, j'aimerais vraiment un jour, m'y connaître autant que toi), Bénédicte, Françoise, Marie-Hélène, Séverine, Nathalie, Frédéric L (pour

l'aide dans l'entreprise MAFIA et anti-RANKL et les discussions pendant la rédaction),
Bénédicte, Florian, Stéphania, Thibault, Jérôme, Laurent, Franck et Guylaine (merci pour
toute l'aide et pour les innombrables discussions).

Merci à ma famille, mamie, papy, tata, tonton, aline et charlotte.

Merci à mes parents, pour avoir sacrifié absolument toute leur vie à leurs 2 filles. Merci pour nous avoir donné confiance en nous.

Merci papa d'avoir développé notre esprit de questionnement (ou plus de contradiction dans mon cas) qui m'ont dirigés vers la recherche. Tu vas pouvoir faire péter le champagne...ya pas que les gens très intelligents finalement qui peuvent faire une thèse.

Merci maman, pour les années passées au téléphone à juste dire « bonjour » et que tu me répondes « qu'est ce qu'il ne va pas ? ». Merci pour m'avoir toujours poussée à vouloir plus, et à donner plus de moi-même. Merci d'avoir surtout toujours cru que j'étais capable de plus. Et Merci d'avoir corrigé cette thèse (et ne regardes pas les fautes qu'il y a dans les seules pages que tu n'as pas corrigées.

Merci à ma soeurette chérie, ma mimi... Merci pour ces 26 années ou plutôt 31 à me supporter, m'écouter, me faire grandir (même si bon, faut le dire j'étais gauchère [juste la petite pic pour te faire enrager]), prendre toutes les engueulades à ma place. Merci d'être toujours là quand j'appelle en disant « Je veux juste gueuler !!! Parce que j'en ai trop marre !!!). Merci pour mon merveilleux filleul, le plus beau bébé du monde (et non je ne suis pas du tout partiale). Merci de me faire croire que mon boulot est aussi passionnant pour les autres que pour moi, et de ne pas te moquer quand je suis un peu trop enthousiaste à propos de ce que je fais.

Merci aux potes de Guingamp, Toto, Petit Louis, Anais, Julie, pour ces 7 dernières années. J'espère qu'on restera toujours ainsi malgré les divergences, les coups de gueule et l'éloignement. Merci de m'avoir supporté pendant les soirées où je n'en finissais pas avec mes quantifs. Eh oui, ca a servi !! Merci de rester notre refuge en dehors de la maison et du boulot.

And the last but not the least, un merci tout particulier à mon amoureux, Mickael. Merci pour ces 7 dernières années pas à pas, étape par étape et coup de gueule par coup de gueule. Merci de supporter mes coups de stress quotidiens, de les gérer et de comprendre de mieux en mieux que tu ne les gèreras pas mais que c'est pas le plus important :D Merci d'être ma bouée de secours. Merci pour le soutien à l'extérieur mais aussi à l'intérieur du labo.

Aujourd'hui, Demain, Après demain...

Et maintenant...Vacanceeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Brevet

Inventeurs : **Gamblin Anne Laure**, Trichet Valérie, Layrolle Pierre.

Bone regenerating biomaterials with selected cells from peripheral blood.

Brevet EP 70906 D32968.

Déposants : Université de Nantes, Inserm

Date de dépôt : 18/07/2014

Publications

Gamblin Anne-Laure, Brennan Meadhbh A, Renaud Audrey, Hideo Yagita, Lézot Frédéric, Heymann Dominique, Trichet Valérie, Layrolle Pierre

Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages

Accepté par Biomaterials en Aout 2014, sous presse

Gamblin Anne Laure, Renaud Audrey, Charrier Céline, Hulin Philippe, Louarn Guy, Heymann Dominique, Trichet Valérie, Layrolle Pierre

Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturised three-dimensional culture with mineral granules

Accepté par Acta Biomaterialia en Aout 2014, sous presse

Gamblin Anne Laure, Devine Eric, Renaud Audrey, Heymann Dominique, Trichet Valérie, Layrolle Pierre

Bone formation with bicalcium phosphate particles in unison with monocytes CD14+

En cours de rédaction

Gamblin Anne Laure, Renaud Audrey, Charrier Céline, Hulin Philippe, Louarn Guy, Heymann Dominique, Trichet Valérie, Layrolle Pierre

Miniaturized 3-dimensional model of bone tissue by co-culturing mesenchymal stem cells, monocytes and mineral granules

En cours de redaction

Publications en collaboration

Davison Noel L, **Gamblin Anne Laure**, Layrolle Pierre, Yuan Huipin, de Bruijn Joost D, Barrère-de

Groot Florence

Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate.

Biomaterials. 2014 Jun;35(19):5088-97.

Guihard Pierre, Boutet Marie Astrid, Brounais-Le Royer Bénédicte, **Gamblin Anne Laure**, Amiaud Jérôme, Renaud Audrey, Berreur Martine, Redini Françoise, Heymann Dominique, Layrolle Pierre, Blanchard Frédéric.

Oncostatin M, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury.

En révision pour American Journal of Pathology

Présentations lors de congrès nationaux et internationaux

2012

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, HULIN Philippe, AMIAUD Jérôme, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Development of a 3D ex vivo model of bone tissue"

FIRST (Pavi, Italie), Mai 2012. **Présentation orale. Prix des jeunes chercheurs**

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, AMIAUD Jérôme, HULIN Philippe, TRICHET Valérie, HEYMANN Dominique, LAYROLLE Pierre. "Development of a 3D ex vivo model of bone tissue"

TERMIS (Vienne, Autriche), Septembre 2012. **Présentation poster**

GAMBLIN Anne Laure, RITZ Sandra, HULIN Philippe, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Nanoparticles delivery system targeting bone tumors"

Nanomedecine in oncology (Ile de Berder, France), Septembre 2012. **Présentation orale**

2013

GAMBLIN Anne Laure, HULIN Philippe, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. « Modèle ex vivo 3D du microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome »

7emes journées du Cancéropole Grand Ouest (Sables d'Olonne, France), Avril 2013.

Présentation poster

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, CHARRIER Céline, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. « Mise au point d'un modèle ex vivo 3D de tissu osseux »

JFBTM (Poitiers, France), Mai 2013. **Présentation orale. Prix des jeunes chercheurs**

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. « Etude du mécanisme de la formation osseuse à partir de cellules souches mésenchymateuses et de biomatériaux »

JFBTM (Poitiers, France), Mai 2013. **Présentation orale**

GAMBLIN Anne Laure, LAYROLLE Pierre. « Développement d'un modèle 3D de tissu osseux »
SMAI (Seignosse, France), Mai 2013. **Présentation orale**

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, TRICHET Valérie, HEYMANN Dominique, LAYROLLE Pierre. « Etude du mécanisme de formation osseuse à partir de cellules souches mésenchymateuses et de biomatériaux »

GRIMIT (Paris, France), Septembre 2013, **Présentation poster**

2014

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, CHARRIER Céline, HULIN Philippe, LOUARN Guy, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Osteogenic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules."

GTC (Berlin, Allemagne), Mai 2014. **Présentation poster**

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, CHARRIER Céline, HULIN Philippe, LOUARN Guy, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Osteogenic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules."

Osteoimmunology (Kos, Grèce), Juin 2014. **Présentation poster**

GAMBLIN Anne Laure, BRENNAN Meadhbh, RENAUD Audrey, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Mechanism of action of mesenchymal stromal stem cells in unison with calcium phosphate ceramic for bone regeneration"

Osteoimmunology (Kos, Grèce), Juin 2014. **Présentation poster**

GAMBLIN Anne Laure, RENAUD Audrey, CHARRIER Céline, HULIN Philippe, LOUARN Guy, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Osteogenic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules."

EORS (Nantes, France), Juillet 2014. **Présentation orale**

GAMBLIN Anne Laure, BRENNAN Meadhbh, RENAUD Audrey, HEYMANN Dominique, TRICHET Valérie, LAYROLLE Pierre. "Mechanism of action of mesenchymal stromal stem cells in unison with calcium phosphate ceramic for bone regeneration"

EORS (Nantes, France), Juillet 2014. **Présentation orale.**

LISTE DES ABREVIATIONS

2D : 2 dimensions	HRP : "horseradish peroxidase"
3D : 3 dimensions	IGF-1 : "insulin-like growth factor-1"
ADB : "Adipogenic differentiation bullet kit"	IL : inter-leukine
AlphaMEM : "Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification"	IRM : imagerie par résonance magnétique
AMG655 : Conatumumab	LucF : luciférase
ADN : acide désoxyribonucléique	MCP-1 : « Monocyte chemoattractant protein 1 »
ARN : acide ribonucléique	M-CSF : «Macrophage colony-stimulating factor »
ATP : adenosine triphosphate	MEB : Microscopie électronique à balayage
BCP : phosphate de calcium biphasé	MEC : matrice extracellulaire
BMDO : 5,6-benzo-2-methylene-1,3-dioxepane	MIP alpha et beta : « Major Intrinsic Protein »
BMP : "bone morphogenetic protein"	MMP : métalloprotéase matricielle
BP : biphosphonate	MNNG/HOS : lignée de cellules d'ostéosarcome humain
BSP : "bone sialo protein"	MO : moelle osseuse
CBFA1 : « core-binding factor alpha 1)	NK : « natural killer »
Col1α1,α2 : collagène type α 1 et α 2	OC : ostéocalcine
CSF-1 : "colony stimulating factor 1"	ODB : "Osteogenic differentiation bullet kit"
CSF1R : "colony stimulating factor 1 receptor"	OPG : ostéoprotégérine
CSH : cellules souches hématopoïétiques	OPN : ostéopontine
CSM : cellules souches mésenchymateuses	PAL : phosphatase alcaline
CTSK : cathepsine k	PBS : tampon phosphate salin
DAB : 3,3'-Diaminobenzidine	P-C-P : phosphorous-carbonphosphorous motif
dNTP : désoxyribonucléotides	PCR : réaction en chaîne par polymérase
DOPE : 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine	PE : phycoérythrine
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique	PFA : Paraformaldehyde
EDX : Energy-dispersive X-ray spectroscopy	PGE2 : Prostaglandine E2
EFS : établissement français du sang	PTH : hormone parathyroïdienne
EGF : facteur de croissance épidermique	RANK-L : "receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand"
GAP junction : jonction communicante	REBORNE : "Regenerating Bone Defects using New biomedical Engineering approaches"
GFP : protéine fluorescente verte	RGD : tripeptide Arg-Gly-Asp
HA : hydroxyapatite	
HGF : facteur de croissance des hépatocytes	

RT : retro-transcription

RUNX2 : "Runt-related transcription factor 2"

SDF1 : "stromal cell-derived factor 1"

Séquence ARIF : cycle de remodelage
(activation, résorption, inversion et formation)

SVF : serum de veau foetal

Tc-99m MDP : "Tc-99m attached to medronic acid"

TCP : tri-calcium phosphate

TGF beta : "Transforming growth factor beta"

TNF : facteur de nécrose tumorale

TRAIL : "tumor-necrosis-factor related
apoptosis inducing ligand"

TRAP : "Tartrate-resistant acid phosphatase"

UV : ultra-violet

VEGF : "Vascular endothelial growth factor"

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure et composition de la partie corticale d'un os long. D'après http://www.lecorpshumain.fr	6
Figure 2 : Observation au Microscope électronique à balayage d'ostéons et schéma de sa structure. D'après quizlet.com, bone anatomy and histology.	7
Figure 3 : Orientation et structure des trabécules osseuses.	8
Figure 4 : Coupe histologique d'un os de souris colorée à l'hématoxyline et montrant les principales composantes cellulaires osseuses. Les ostéoblastes (flèches vertes) permettent la formation osseuse alors que les ostéoclastes (flèches rouges) permettent la résorption du tissu osseux. Au cœur de la matrice ostéoïde formée, les ostéocytes (flèches noires) permettent, dans leur lacune de réguler le remodelage osseux. Protégé par l'os cortical, la moelle osseuse (MO) est entourée d'os trabéculaire.....	9
Figure 5 : Isolement et différenciation des cellules souches mésenchymateuses	10
Figure 6 : Ontogénie de l'ostéocyte	12
Figure 7 : Observation au microscope électronique à transmission d'un ostéoclaste actif. Le schéma illustre la production d'enzymes et de protons responsables de la résorption de la matrice minéralisée. Adapté de Helfrich MH et al, 2007 [42].	13
Figure 8 : Ossification membranaire. D'après Junqueira's Basic Histology 12 th Ed [43].....	15
Figure 9 : Ossification endochondrale.....	16
Figure 10 : Résumé schématique des mécanismes hypothétiques mis en œuvre dans la formation osseuse induite par un biomatériau. Modifié à partir de Barradas AMC et al, 2011 [69]	26
Figure 11 : Les CSM sont stimulés par des facteurs de croissance et des chemokines activant les cellules hôte qui répondent par la sécrétion de facteurs trophiques (mitogéniques, angiogéniques, anti-apoptotiques et anti-microbactériens). Modifié à partir de Murphy et al, 2013 [89].....	29
Figure 12 : Polarisation des macrophages M1 (a) et M2 (b) et interactions avec les cellules Th1 et Th2..... D'après Biswas et al. 2010 [94]	30

- Figure 13 : Observation au MEB des céramiques de phosphate de calcium utilisées, particules et disque. Les 2 biomatériaux utilisés présentent la même microporosité.....32
- Figure 14 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine par cytométrie en flux (CD73/CD105 (B); CD45/CD90(C)) après configuration des paramètres granulométrie/taille des cellules attendues (A).....35
- Figure 15 : Mise en évidence par coloration histologique des différentes voies de différenciation de CSM cultivées in vitro (A). La voie adipogénique a été caractérisée par une coloration au red oil O (B), la voie chondrogénique par une coloration au bleu alcian (C) et la voie ostéogénique par une coloration à la phosphatase alcaline (D)....37
- Figure 16 : Déplétion des macrophages induite par le traitement AP20187 dans les souris MAFIA. La détection par cytométrie en flux des cellules CD11b+ dans les ganglions lymphatiques montre une réduction du pourcentage de monocytes dans les souris traitées avec AP20187 (A). De la même façon, l'expression génique de CD11b diminue dans les poumons des souris traitées (B).70
- Figure 17 : Malgré la déplétion systémique de la lignée myéloïde, une forte mobilisation des macrophages MØ et M1 est observée sur le site de l'implantation. L'observation des cellules CD68+ et iNOS+ par marquage immunohistologique (marron) sur des coupes représentatives de l'implant (A), et la mesure de l'expression génique relative de marqueurs spécifiques des macrophages CD11b et CD86 (B) montrent une augmentation significative de la mobilisation macrophagique dans les souris traitées. ...71
- Figure 18 : La déplétion de la lignée myéloïde par le traitement AP20187 induit l'augmentation de l'ostéoclastogénèse et l'apparition de tissu osseux (étoiles blanches) entre les particules (étoiles noires) implantées. Les colorations au TRAP (A) et au trichrome de Masson (C) de coupes représentatives montrent la formation d'ostéoclastes et d'une matrice ostéoïde condensée. De la même façon, l'expression génique relative des gènes ostéoclastiques (B) et ostéogéniques (D) augmente dans les souris traitées.72
- Figure 19 : Etude de l'expression génique relative obtenue dans les implants de phosphate de calcium biphasé avec ou sans monocytes humains. Les résultats montrent une augmentation de l'expression génique des marqueurs ostéogéniques (Cbfa1, Alp et Bsp), ostéoclastiques (Trap et Cathk) et macrophagiques (CD11b et CD163).75
- Figure 20 : Phagocytose des cellules en apoptose (CA) par les CSM stimule la différenciation ostéogénique et ostéoclastique. Modifié à partir de Tso et al. [133]76

Figure 21 : Les facteurs du microenvironnement affectant le devenir des cellules.....	79
Figure 22 : La niche osseuse est en étroite relation avec la niche vasculaire et les cellules souches hématopoïétiques CSH. Les interactions sont nombreuses entre les ostéoblastes, ostéoclastes, CSH et cellules stromales ou réticulaires, chacune intervenant dans le devenir de l'autre. Modifié à partir de Di Maggio N et al. 2010 [212].....	109
Figure 23 : Radiographies de patients souffrant d'un ostéosarcome (A) ostéocondensant (B) ostéolytique et (C) mixte.....	112
Figure 24 : Schéma de croissance de l'ostéosarcome. (modifié à partir de Bickels J, et al, 1999 [218])	113
Figure 25 : Exemple de combinaisons de chimiothérapies utilisé dans l'essai clinique OS2006 dans le traitement de l'ostéosarcome en fonction de leur âge et de leur réponse aux traitements (bonne réponse, BR et mauvaise réponse, MR). Le ZOMETA est la forme commerciale de l'acide zolédronique, un biphosphonate testé en combinaison avec les traitements classiques de l'ostéosarcome : métotrexate (MTX), cure VP (VP16 et cis-platinum), cure API (adriamycine, cis-platinum, ifosfamide) et cure AI (adriamycine et ifosfamide)	116
Figure 26 : Schéma et image MEB des nanoparticules de BMDO	124
Figure 27 : Système de délivrance des acides nucléiques en utilisant les liposomes cationiques. Modifié à partir de Coelho J et al., 2013 [262]	126
Figure 28 : Association des siARN Ct et LucF au cholestérol en 5' et au peptide en 3' du brin sens.....	127
Figure 29 : Images MEB des particules de BMDO fonctionnalisées sur différentes surfaces : BCP 0,5-1mm de Biomatlante et du fémur de souris. Les nanoparticules apparaissent sous forme de sphères de taille nanométrique.....	129
Figure 30 : Observation en microscopie confocal de la pénétration des nanoparticules (flèches blanches), en fonction du temps, dans des cellules MNNG/HOS dont la membrane plasmique a été marquée par du cell mask orange (Invitrogen)	130
Figure 31 : Survie cellulaire des cellules MNNG/HOS mesurée par cytométrie en flux après traitement avec les nanoparticules et marquage par un intercalant d'ADN, le TO-PRO-3, indiquant la survie cellulaire. Le contrôle négatif correspond aux cellules sans nanoparticule.....	131

Figure 32 : Observation par microscopie confocale de la distribution des nanoparticules chez une souris jeune après 24h. Les observations sont réalisées par compilation d'images confocale prises en visible (à gauche) et après excitation de la longueur d'onde 488nm (à droite)	132
Figure 33 : Observations en MEB des structures 3D obtenues après culture des CSM pendant 14 jours (A et C) et coculture avec les cellules d'ostéosarcome MNNG/HOS pendant 7 jours (B et D). (Grossissement x50 A et B, x200 C et D).	133
Figure 34 : Etude de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage par l'anticorps anti-Apo2.7 des cellules extraites des structures 3D hybrides, par traitement à la collagénase, après 3 (A) et 4 jours (B) de la co-culture CSM et cellules MNNG/HOS. Différentes quantités de cellules MNNG/HOS ont été testées en co-culture avec les CSM en 3D (de 2000 à 20 000). Les pourcentages représentent la quantification de l'expression protéique de GFP et du marquage Apo2.7.	134
Figure 35 : Activité luciférase après 48 heures de traitement des cellules MNNG/HOS cultivées en plaque 24 puits en présence de 1 µg/mL d'AMG655, agoniste de TRAIL.	135
Figure 36 : Etude de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage par l'anticorps anti-Apo2.7 des cellules extraites des structures 3D hybrides après 3 (A) et 4 jours (B) de la co-culture CSM et cellules MNNG/HOS traitées ou non 48 heures avec 1 µg/mL d'AMG655.	136
Figure 37 : Activité luciférase après transfection transitoire de siARN dans les MNNG/HOS exprimant la luciférase (A) par encapsulation dans un liposome cationique RPR209120/DOPE ou (B) par l'association des siARN avec le peptide acide et le cholestérol.	137
Tableau 1 : Variabilité des résultats obtenus en bioluminescence (émission de photons). 2 conditions ont été comparées (MSC avec 2000 et 10 000 cellules MNNG/HOS) et chaque échantillon a été mesuré en duplicat (prélèvements 1 et 2) après extraction.	138

TABLE DES MATIERES

Remerciements	III
Valorisation des travaux de thèse	VIII
Liste des abréviations	XII
2D : 2 dimensions	XII
3D : 3 dimensions	XII
Liste des figures	XIV

INTRODUCTION GENERALE..... 2

CHAPITRE I : LE TISSU OSSEUX..... 5

A. CLASSIFICATION ANATOMIQUE	5
B. FONCTION, STRUCTURE ET COMPOSITION DU TISSU OSSEUX	5
1) Classification histologique	6
2) Organisation cellulaire et biochimique	8
C. OSTEOGENESE.....	13
1) Ossification primaire	14
2) Ossification secondaire	16
D. REMODELAGE OSSEUX	16

OBJECTIFS DE LA THESE..... 19

CHAPITRE II : MECANISME DE FORMATION DU TISSU OSSEUX A PARTIR DE CELLULES SOUCHES EN ASSOCIATION AVEC DES PARTICULES DE PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE..... 21

I- PERTE DE SUBSTANCE OSSEUSE ET INGENIERIE TISSULAIRE :.....	21
A. PERTE DE SUBSTANCE OSSEUSE	21
1) Traumatismes	21
2) Pathologies osseuses non traumatiques	21
3) Physiopathologie des pertes de substance osseuse	22
4) Les limites de la cicatrisation osseuse	22
B. COMPLEMENT DES PERTES OSSEUSES.....	23
1) Greffes osseuses biologiques	24
2) Substituts osseux implantables	25
C. CONCEPTS SUR LA REGENERATION OSSEUSE	27
D. MONOCYTES ET MACROPHAGES	29

II-	STRATEGIES D'ETUDE :	31
III-	MATERIELS ET METHODES :	32
A.	LES BIOMATERIAUX : CERAMIQUES DE PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE	32
	1) Différentes formes de BCP utilisées.....	32
	2) Caractérisation des biomatériaux par microscopie électronique à balayage (MEB)	33
B.	LES CELLULES	33
	1) Les cellules souches mésenchymateuses	33
	a) Origine et caractérisation des CSM.....	33
	b) Décongélation / Entretien.....	34
	c) Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines.....	34
	2) Les Monocytes : Origine, caractérisation	37
C.	ASSOCIATION DES BIOMATERIAUX AVEC LES CELLULES	38
D.	ETUDE <i>IN VIVO</i>	38
	1) Expérimentation animale en site orthotopique	38
	2) Expérimentation animale en site ectopique.....	39
E.	ANALYSES HISTOLOGIQUES	39
	1) Analyses histomorphométriques	40
	2) Analyses immunohistologiques	40
F.	ANALYSE D'EXPRESSION GENIQUE.....	41
	1) Extraction des ARN	41
	2) Rétrotranscription.....	41
	3) PCR en temps réel	41
G.	CYTOMETRIE EN FLUX	42
 ARTICLE 1 : BONE TISSUE FORMATION WITH HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS: THE LOCAL IMPLICATION OF OSTEOCLASTS AND MACROPHAGES.....		44
 RESULTATS EXTRAITS DU BREVET : BONE REGENERATING BIOMATERIALS WITH SELECTED CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD		65
 Discussion et Conclusion du Chapitre II		69
 <u>CHAPITRE III : MODELE 3D MINIATURISE DE TISSU OSSEUX</u>		78
I-	DEVELOPPEMENT DES NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES :	78
A.	LES LIMITES DE LA CULTURE EN 2D :	79
B.	LES APPORTS DE LA CULTURE EN 3D :	80
C.	DIFFERENTS SYSTEMES DE CULTURE EN 3D :	80

1)	Culture organotypique	80
2)	Hydrogels	81
3)	Supports de culture :	81
II-	STRATEGIES D'ETUDE :	82
III-	MATERIELS ET METHODES :	83
A.	LES BIOMATERIAUX : CERAMIQUES DE PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE	83
B.	LES CELLULES	83
C.	L'ASSOCIATION CELLULES ET PARTICULES	83
D.	QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION DU COLLAGENE	84
E.	MICROSCOPIE PAR ENERGIE DISPERSIVE DE RAYONS X (EDX)	84
F.	MICROSCOPIE CONFOCALE	84
G.	CYTOMETRIE EN FLUX	85
H.	ANALYSES HISTOLOGIQUES	85
I.	ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE	85
 ARTICLE 2 : OSTEOLASTIC AND OSTEOCLASTIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND MONOCYTES IN A MINIATURISED THREE-DIMENSIONAL CULTURE WITH MINERAL GRANULES		87
Discussion et Conclusion dU Chapitre III		107
 <u>CHAPITRE IV : FORMATION ET VALIDATION D'UN MODELE 3D D'OSTEOSARCOME.....</u>		111
I-	OSTEOSARCOME ET DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES	111
A.	LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES	111
B.	L'OSTEOSARCOME	111
1)	Epidémiologie et étiologie	113
2)	Diagnostic	114
3)	Traitements actuels.....	115
4)	Limites des traitements actuels	116
C.	DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES	118
1)	Ciblage du site osseux	118
2)	Ciblage de l'expression génique des cellules tumorales	120
3)	Ciblage des protéines de surface	120
II-	STRATEGIES D'ETUDE :	122
III-	MATERIELS ET METHODES :	123
A.	LES BIOMATERIAUX : PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE	123
B.	LES CELLULES	123
C.	L'ASSOCIATION CELLULES ET BIOMATERIAUX.....	123
D.	ÉTUDE DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR DES GROUPEMENTS PHOSPHONATE.....	123

E.	ETUDE DE L'EFFET DE TRAIL DANS UN MODELE D'OSTEOSARCOME EN 3D	124
F.	ETUDE DE siARN ASSOCIES A UN PEPTIDE POUR LE CIBLAGE DES SURFACES OSSEUSES	124
	1) Séquences des siARN utilisés	124
	2) Passage de la membrane cellulaire et stratégie de ciblage.....	125
G.	EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA TRANSFECTION PAR MESURE DE L'ACTIVITE LUCIFERASE	127
H.	ETUDE DE LA SURVIE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	127
IV-	RESULTATS :.....	129
A.	ETUDE DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR DES GROUPEMENTS PHOSPHONATES	129
	1) Adhésion des nanoparticules sur différents supports de phosphate de calcium 129	
	2) Pénétration des nanoparticules dans des cellules d'ostéosarcome	130
B.	ETUDE DU DEVELOPPEMENT TUMORAL EN 3D.....	132
C.	ETUDE DE L'EFFET DE TRAIL DANS UN MODELE D'OSTEOSARCOME EN 3D	135
D.	ETUDE DE siARN ASSOCIES A UN PEPTIDE POUR LE CIBLAGE DES SURFACES OSSEUSES	136
	1) Etude de l'efficacité de la transfection en 2D	137
	2) Etude de l'efficacité de la transfection sur la culture d'ostéosarcome en 3D	138
	Discussion et Conclusion dU Chapitre IV	139
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</u>		143
<u>ANNEXE.....</u>		148
BREVET : BONE REGENERATING BIOMATERIALS WITH SELECTED CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD		149
BIBLIOGRAPHIE		184

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'étude du micro-environnement du tissu osseux apparaît comme un défi majeur tant dans un contexte de régénération que dans le développement de nouvelles thérapies ciblant les tumeurs osseuses primitives. En effet, la cicatrisation osseuse fait intervenir de nombreux types cellulaires tels que les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, les monocytes/macrophages et les ostéoclastes dans une matrice extracellulaire en constant remaniement. Dans un contexte pathologique, la croissance des tumeurs osseuses primitives est supportée par la résorption de la matrice osseuse alors que les CSM produisent des facteurs solubles qui favorisent la résistance des cellules cancéreuses aux agents de chimiothérapie.

Avec plus d'un million de greffes réalisées chaque année en Europe, l'os est le tissu le plus transplanté chez l'homme. Afin de traiter un certain nombre de ces affections osseuses, de nouvelles approches de thérapie cellulaire pour la régénération osseuse, ont pu être développées, notamment dans le projet européen REBORNE. Cette étude clinique vise la régénération de défauts osseux à partir de cellules souches mésenchymateuses (CSM) autologues et de biomatériaux. Ces cellules sont isolées à partir de la moelle et amplifiées en culture pendant 3 semaines, puis associées à des substituts osseux synthétiques, les céramiques de phosphate de calcium biphasé (BCP). Cette approche combinatoire, cellules et biomatériaux, a déjà montré son potentiel dans différentes études *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, le mécanisme d'ostéoinduction est à ce jour inconnu.

Dans un premier temps, la réaction cellulaire mise en jeu lors de l'implantation de l'association biomatériaux-CSM a été étudiée. Durant ces travaux, les effets des granules de BCP seules ou associées avec des CSM humaines sont comparés dans le cadre de la formation de tissu osseux en site ectopique, dans le muscle para-tibial de souris. Le rôle des macrophages et des ostéoclastes dans ce processus de formation osseuse est étudié. Ces résultats font l'objet d'un article accepté.

Dans ce cadre, la néoformation osseuse a été étudiée en associant des monocytes triés à partir du sang périphérique humain avec des particules de BCP. Ces résultats font l'objet d'un dépôt de brevet car ils permettent une régénération osseuse sans culture cellulaire préalable.

Notre laboratoire de recherche s'intéresse au rôle du microenvironnement dans le développement des tumeurs osseuses primitives, tels que l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome. Les tumeurs osseuses primitives sont rares (moins de 1% des cancers) mais se développent surtout chez l'enfant et l'adolescent ainsi que chez l'adulte

jeune. Après 50 ans, le développement tumoral survient davantage sous forme de métastases osseuses. La prise en charge de la tumeur osseuse associe généralement la chimiothérapie à la chirurgie. Le manque d'efficacité clinique et la toxicité sont les principales causes de l'échec dans le développement de nouvelles molécules anti-cancéreuses. La faisabilité des tests *in vitro* à produire des informations pouvant se corrélérer à de futurs résultats cliniques est un point essentiel dans le développement de molécules thérapeutiques. Ainsi, il est nécessaire que ces études *in vitro* se rapprochent, au plus près du phénotype observé dans le tissu cible. Les études en deux dimensions (2D) sont traditionnellement utilisées pour le test de nouvelles molécules, mais ne peuvent pas modéliser le microenvironnement tumoral et notamment les interactions tridimensionnelles (3D) entre cellules et matrice. En effet, les contacts cellule-cellule en 3D et cellules-matrice ont été montrés essentiels dans la mise en place de signaux variés tels que ceux de prolifération ou différenciation. Dans une seconde partie, un modèle 3D *in vitro* miniaturisé du tissu osseux a été développé à partir de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de monocytes permettant la formation d'une importante matrice ostéoïde et la différenciation d'ostéocytes et d'ostéoclastes. Ces résultats font l'objet d'un article accepté.

Le projet a été poursuivi par le dépôt de cellules tumorales sur ce microenvironnement ostéoïde en 3D et l'étude de plusieurs molécules optimisées pour le ciblage du tissu osseux et des tumeurs. Ces résultats sont présentés dans une 3^{ème} partie.

CHAPITRE I :

LE TISSU OSSEUX

CHAPITRE I : LE TISSU OSSEUX

A. Classification anatomique

Le squelette humain est composé de 206 os constants. Il évolue avec l'âge selon le développement de la structure osseuse. En effet, le fœtus n'a pas encore de squelette solide, celui-ci se formera progressivement durant les neuf mois de gestation. A la naissance, un bébé a davantage d'os qu'il n'en aura à l'âge adulte : environ 270 qui fusionneront entre eux au cours de la croissance. Les os peuvent se présenter sous différentes formes :

Les os courts (vertèbres et carpes)

Les os longs (radius et cubitus) souvent pris comme exemple de l'architecture osseuse. Ils présentent un fût central, la diaphyse et deux extrémités, les épiphyses, recouvertes de cartilage articulaire.

Les os plats (crâne et sternum) qui sont composés de deux couches parallèles d'os compact, les tables internes et externes, renfermant une couche d'os spongieux.

B. Fonction, structure et composition du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé dont les cellules le composant sont enchâssées dans une matrice extracellulaire très abondante [1]. L'os présente une fraction organique et une fraction minérale. Véritable armature de l'organisme, l'os minéralisé assure la fonction biomécanique à travers le soutien et la protection des organes. Outre sa fonction locomotrice, le tissu osseux exerce aussi des fonctions métaboliques. En effet, il est le principal réservoir de l'organisme, du calcium, du phosphore, du sodium et du magnésium. Il assure le stockage et la libération de ces minéraux permettant ainsi le contrôle de l'homéostasie. Enfin le tissu osseux soutient la fonction hématopoïétique. En effet, la moelle osseuse produit les différents types cellulaires du sang (érythrocytes, thrombocytes et leucocytes dérivés des cellules souches hématopoïétiques) [2]. L'endoste est à l'interface entre l'os et la moelle osseuse. Cette région est tapissée de cellules de la lignée ostéoblastique, d'origine mésenchymateuse, à différents stades de différenciation. Les ostéoblastes ont montré *in vitro* et *in vivo*, leur rôle de soutien de l'hématopoïèse, notamment par leur capacité à permettre un maintien et une expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en co-culture [3,4].

Malgré l'apparente rigidité et inertie du tissu, l'os est en constant renouvellement c'est-à-dire qu'il est dégradé et reformé perpétuellement selon le processus de remodelage osseux [5].

1) Classification histologique

Le tissu osseux peut être classé selon la disposition de ses fibres de collagène [6]. Le premier tissu osseux à se former est le tissu primaire. Il présente des fibres de collagène désorganisées et est peu minéralisé. Il est voué à être très rapidement remplacé au cours du développement par le tissu lamellaire (ou secondaire). Ce tissu est alors plus minéralisé. En fonction de l'agencement de ces lamelles, on peut distinguer : l'os compact, l'os spongieux et le périoste. Cette classification est basée sur le degré de porosité du tissu.

L'**os cortical** ou os lamellaire ou Haversien constitue les parois de la diaphyse ou corticales soit environ 80-85% du tissu osseux. Il protège la partie centrale de l'os, constituée d'os spongieux et de moelle osseuse (Figure 1). L'os cortical se compose de fibres de collagène de type I présentant une orientation différente d'une lamelle à l'autre. Cela renforce la rigidité du tissu.

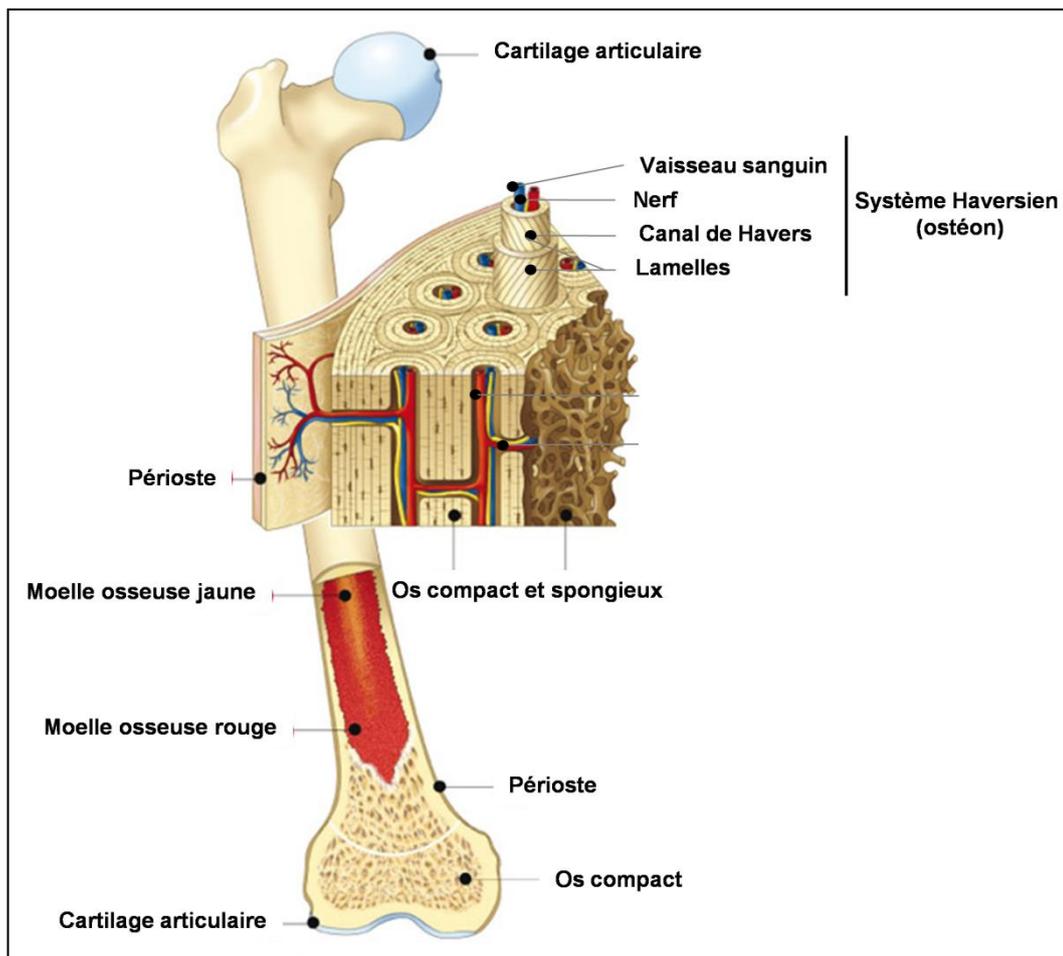


Figure 1 : Structure et composition de la partie corticale d'un os long. D'après <http://www.lecorpshumain.fr>

La structure constituante de l'os cortical est le système de Havers (ou ostéon) [7][8]. Cette structure s'organise autour d'un centre conjonctif, nerveux et vasculaire constitué de collagène de type 3. Les cellules souches mésenchymateuses s'organisent autour en pseudo-épithélium et communiquent entre elles par des jonctions adhérentes et communicantes. Par la suite, ces cellules s'éloignent, formant une lamelle et permettant l'organisation d'une nouvelle couche. La présence d'une substance fondamentale, constituée de protéines non collagéniques, comme la sialo protéine osseuse (BSP) ou l'ostéocalcine (OC), confère aux fibres de collagène la capacité de capter les cristaux d'hydroxyapatite et ainsi de permettre la minéralisation.

La succession de lamelles permet de créer des ostéons orientés selon le grand axe de l'os et communiquant entre eux par de fins canaux transversaux ou obliques (les canaux de Volkmann) (Figure 2). Ce réseau assure la survie des ostéocytes et des cellules environnantes.

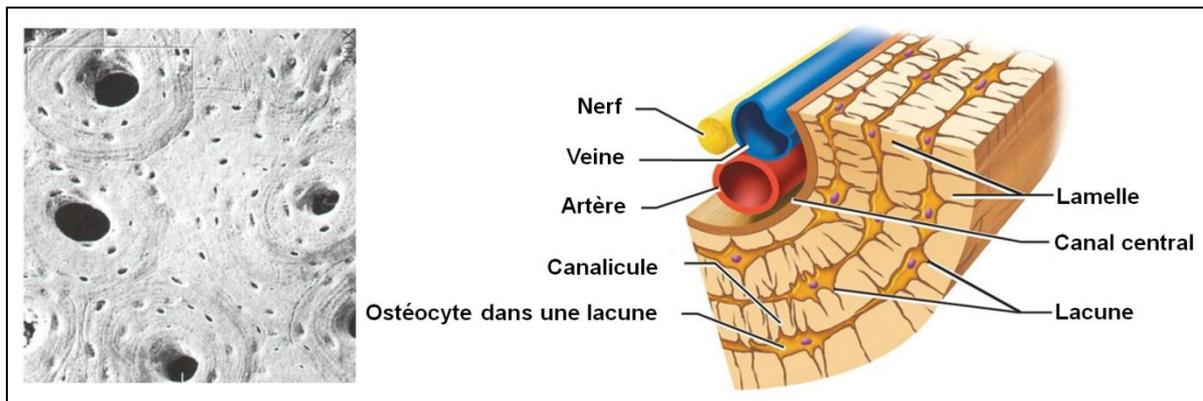


Figure 2 : Observation au Microscope électronique à balayage d'ostéons et schéma de sa structure. D'après quizlet.com, bone anatomy and histology.

L'**os trabéculaire** a lui une architecture spongieuse. Sa porosité atteint les 50 à 90% du volume, rendant ainsi le tissu plus fragile que l'os cortical. Les fibres de collagène sont orientées en lamelles osseuses ou trabécules osseuses disposées de façon concentrique autour de cavités ou aréoles (Figure 3), remplies par la moelle osseuse rouge et de nombreux vaisseaux. La présence de cette moelle rend l'os trabéculaire métaboliquement plus actif que l'os cortical. Les trabécules sont donc davantage remodelées.

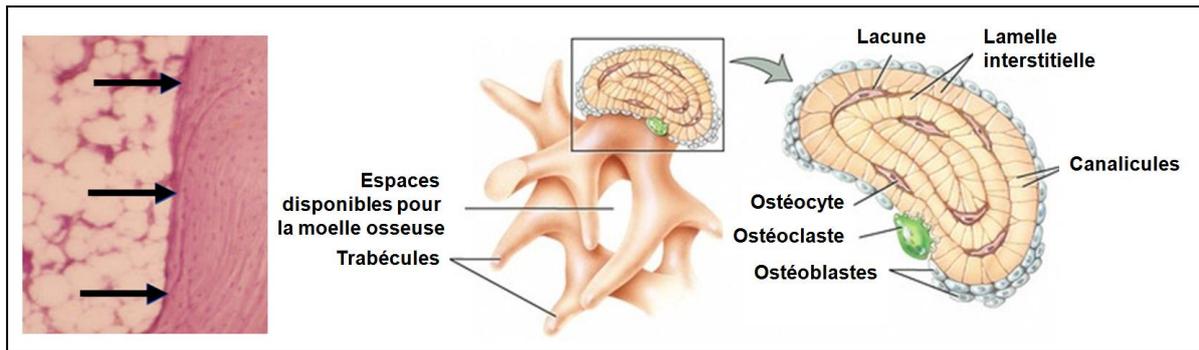


Figure 3 : Orientation et structure des trabécules osseuses.

Le **périoste** revêt la périphérie des os longs et des os plats en dehors des surfaces articulaires. Composé d'une couche externe fibreuse, d'une couche intermédiaire fibroélastique et d'une couche interne ostéoblastique (couche non fibreuse, le Cambium), ce tissu est apte à supporter l'insertion des tendons et ligaments sur l'os. Ces différentes couches assurent la croissance en épaisseur de l'os : on parle de croissance périostée en largeur. Lors du développement du tissu osseux, et quand l'os subit une fracture, la couche ostéoprogénitrice assure la formation osseuse. Avec l'âge, le périoste devient dur, fibreux et perd sa capacité à engendrer de nouveaux ostéoblastes réduisant son activité de réparation. Cela explique les difficultés de guérison après fracture chez les personnes âgées.

2) Organisation cellulaire et biochimique

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé constitué d'une matrice extracellulaire (MEC) très abondante (92 à 95% du volume tissulaire) et de cellules spécialisées assurant son perpétuel renouvellement et sa nutrition (Figure 4).

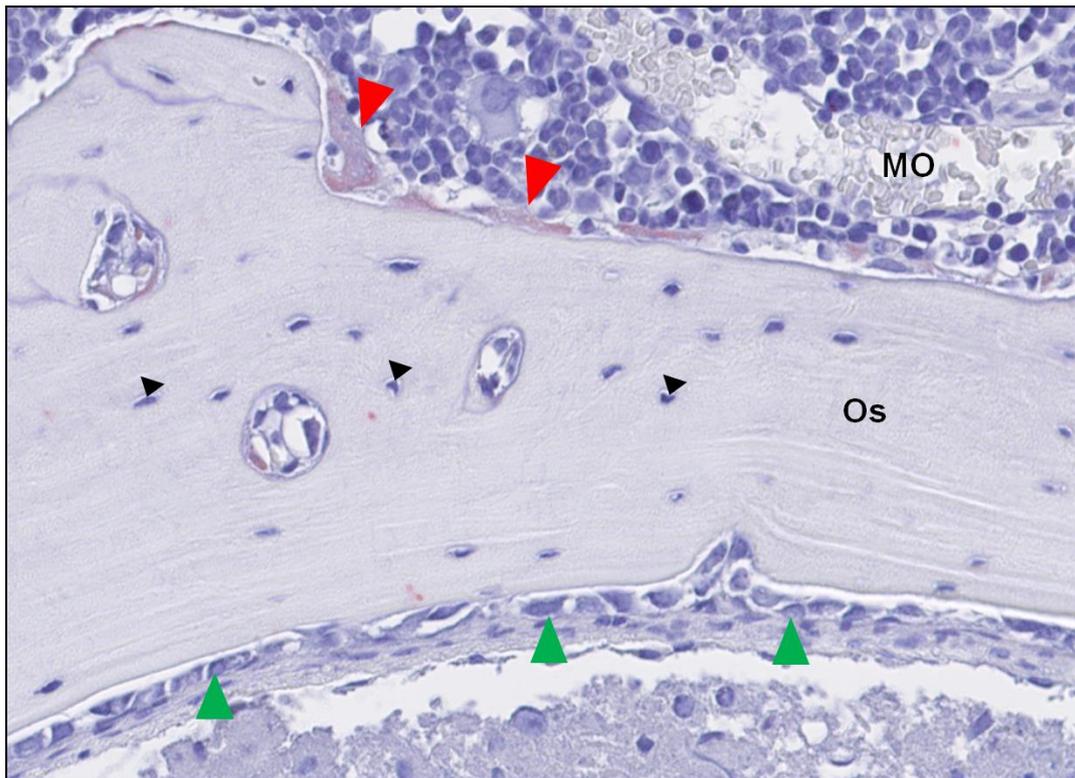


Figure 4 : Coupe histologique d'un os de souris colorée à l'hématoxyline et montrant les principales composantes cellulaires osseuses. Les ostéoblastes (flèches vertes) permettent la formation osseuse alors que les ostéoclastes (flèches rouges) permettent la résorption du tissu osseux. Au cœur de la matrice ostéoïde formée, les ostéocytes (flèches noires) permettent, dans leur lacune de réguler le remodelage osseux. Protégé par l'os cortical, la moelle osseuse (MO) est entourée d'os trabéculaire.

La **matrice osseuse** contient une phase organique et une phase minérale, lui conférant ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

La phase minérale est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)]$ et de carbonate de calcium disposés entre les fibres de collagène [6]. Le nombre et la taille des cristaux s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation [9]. Ces minéraux représentent 70% du poids total de l'os et lui confèrent sa rigidité et sa solidité. Ils constituent aussi la plus grande réserve de l'organisme et participent à l'homéostasie phospho-calcique par des échanges rapides avec la circulation sanguine.

La phase organique de la matrice représente la phase fibreuse du tissu osseux. Elle est majoritairement composée de fibres de collagène de type I (80-90%) [10]. Les fibres apportent l'élasticité et la flexibilité au tissu permettant d'absorber les contraintes dues aux déplacements et au poids du corps. La matrice osseuse contient aussi des protéines non collagéniques comme la fibronectine et l'élastine, qui contribuent à l'adhérence des cellules avec la matrice ou à l'organisation de la MEC. Les protéines de la phase non fibrillaire de la matrice telles que les protéoglycanes, glycosaminoglycanes et glycoprotéines, l'OC, l'ostéopontine (OPN) et la BSP [10] forment la substance fondamentale qui favorise la

minéralisation en permettant l'adhérence des cristaux d'hydroxyapatite aux fibres de collagène de type I. Ces facteurs protéiques jouent aussi un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse [11].

Le tissu osseux est composé de cellules spécialisées permettant son renouvellement et son maintien [4].

La **lignée ostéoblastique** est dérivée des cellules souches mésenchymateuses (Figure 6). Ces cellules sont naturellement présentes dans la moelle osseuse. Les CSM ont été identifiées en 1968 par Friedenstein A.J [12]. Elles sont obtenues par adhérence au plastique après isolation de la moelle osseuse [13]. Elles expriment les marqueurs CD105, CD90 et CD73 mais n'expriment pas les marqueurs CD45, CD34, CD14, CD79a et le CMH de classe II [14]. Les CSM ont une haute capacité de prolifération et possèdent la capacité de se différencier en cellules de différents phénotypes mésodermaux : les ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules stromales de la moelle osseuse, cellules endothéliales et cellules musculaires [15] [16] [17] (Figure 5).

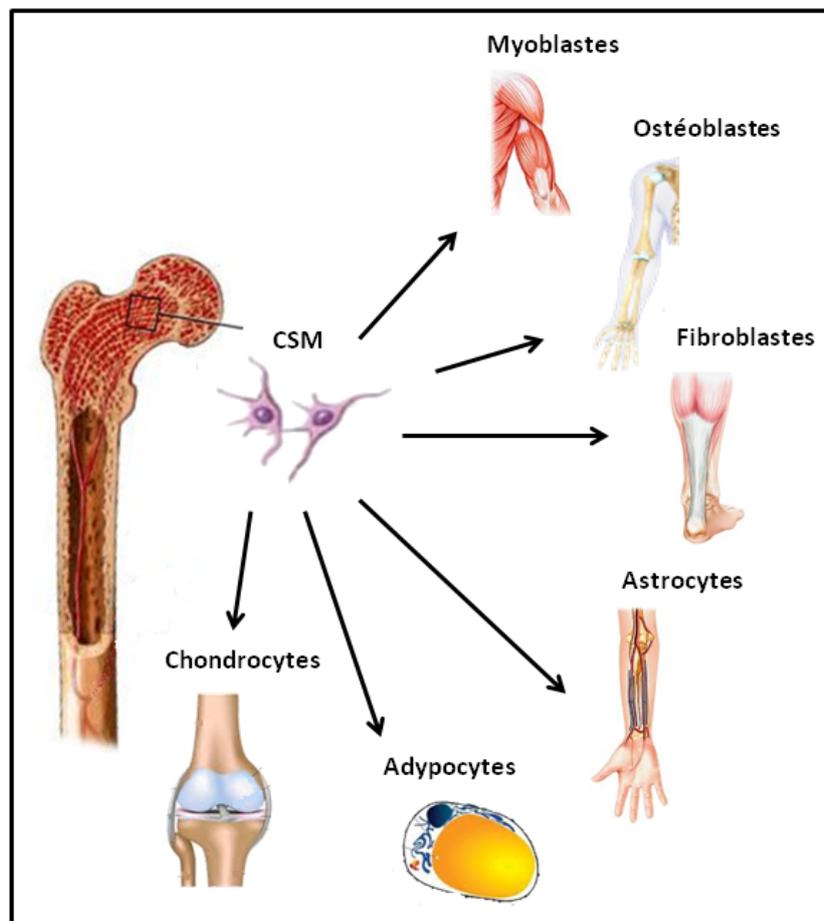


Figure 5 : Isolement et différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Il est possible d'orienter la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en supplémentant leur milieu de culture avec des facteurs de croissance spécifiques à l'orientation souhaitée : β -glycérophosphate, acide ascorbique et dexaméthasone [18][19]. Au cours de la différenciation ostéoblastique, de nombreux gènes vont être exprimés menant à la synthèse de protéines essentielles à la différenciation des CSM en ostéoblastes mais également essentielles à la formation et à la minéralisation de la MEC [20].

L'ostéoblastogénèse débute par l'activation du facteur de transcription « Runt-related transcription factor 2 » (Runx2)[21] en se liant au promoteur de nombreux gènes comme Collagène de type I (*COL1a1* et *COL1a2*), *BSP*, *OC* [22], phosphatase alcaline (*PAL*) [23], *osterix* [24] et *OPN*. L'expression de ces gènes permet la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes qui sécréteront la matrice ostéoïde [25][26].

Le pré-ostéoblaste est une cellule allongée. Il est capable de se diviser mais ne synthétise pas la matrice extracellulaire.

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale organisées en monocouche à la surface du tissu osseux.

Les cellules établissent entre elles des communications grâce à la présence de jonctions adhérentes et communicantes (GAP jonctions). La cellule présente à son pôle apical de nombreux organites (mitochondries, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) permettant une synthèse élevée des constituants protéiques de la matrice organique. D'autre part, les ostéoblastes renferment des vésicules de calcium qui permettront la minéralisation de la matrice nouvellement sécrétée. La nucléation des cristaux d'apatite et la liaison des fibres de collagène avec le calcium sont assurées par la *BSP* et l'*osteonectine*.

Enfin, à l'issue de la période de formation osseuse, les glucocorticoïdes en excès induisent l'apoptose de la majorité des ostéoblastes (65%). Dans le cas contraire, les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou subir une différenciation terminale en ostéocytes.

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés. Elles ont une forme aplatie, une activité métabolique réduite (cytoplasme pauvre en organites) et recouvrent la surface du tissu osseux. Elles assurent la communication entre la surface du tissu osseux, les ostéoblastes actifs et les ostéocytes emmurés dans la matrice.

D'autre part, sous l'action de facteurs environnementaux, elles peuvent se diviser et être réactivées en ostéoblastes matures ou libérer la surface osseuse exposée alors à l'action des ostéoclastes initiant ainsi le remodelage.

Les ostéocytes sont eux des ostéoblastes matures emmurés dans la matrice osseuse dans une lacune péri-ostéocytaire, aussi appelée ostéoplaste (seulement 20% des ostéoblastes matures donnent des ostéocytes, soit 20 000-80 000/mm³). Il s'agit, de loin, du composant cellulaire le plus abondant du tissu osseux [27,28].

Ces cellules contiennent peu d'organites mais présentent de très longs prolongements cytoplasmiques qui permettent des contacts entre les cellules et leur environnement. En effet, ces extensions cytoplasmiques permettent aux substances nutritives provenant du sang d'atteindre les ostéocytes à travers les canalicules. Mais, cette communication entre les cellules et l'environnement permet aussi la transmission de signaux mécano sensoriels [29].

D'autre part, ils régulent aussi la formation osseuse via la sécrétion de protéines osseuses dans la matrice ostéoïde, et notamment la sclérostine : un marqueur spécifique aux ostéocytes [30]. Certaines publications suggèrent que l'apoptose des ostéocytes est responsable du processus de résorption par l'attraction et l'ancrage des ostéoclastes à la surface du tissu osseux.

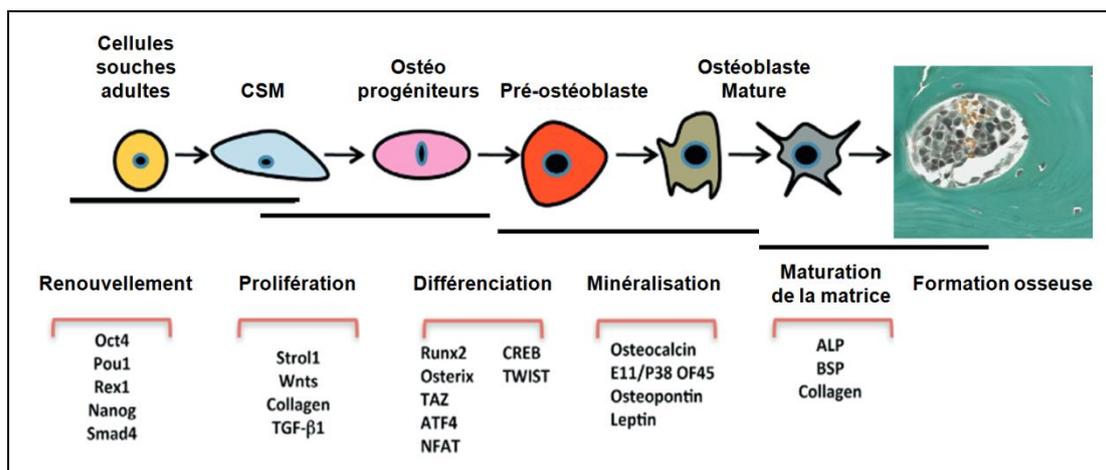


Figure 6 : Ontogénie de l'ostéocyte

La **lignée ostéoclastique** est dérivée des cellules souches hématopoïétiques [31].

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (jusqu'à 100 μm) multinucléées (jusqu'à 35 noyaux), provenant de la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique aux stades tardifs de différenciation monocyttaire. En outre, les ostéoclastes peuvent aussi directement dériver des macrophages, avec lesquels ils partagent des antigènes [32]. Sous l'action du « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF), la lignée hématopoïétique prolifère [33]. Ces précurseurs sont ensuite attirés par chimiotactisme vers le site de résorption et sont différenciés en ostéoclastes sous l'action du M-CSF et du « receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand » (RANK-L) [34]. Une fois, déposé à la surface du tissu osseux,

l'ostéoclaste se polarise. Sa membrane spécialisée présente alors une zone d'ancrage et une bordure plissée (ou bordure en brosse) [35]. Cet espace étroit et hermétique crée un microenvironnement extracellulaire isolé, où la matrice osseuse sera dégradée : on parle de lacune de résorption ou lacune d'Howship. Cet espace clos est maintenu par la présence d'intégrines ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ intégrine, aussi connue comme récepteur à la vitronectine) et la tyrosine kinase c-src (permettant l'ancrage et la migration de l'ostéoclaste). Dans cette cavité, l'ostéoclaste utilise 2 mécanismes permettant la résorption de la matrice minéralisée (Figure 7). Il acidifie le milieu par un transport de protons à travers les pompes à protons adénosine tri-phosphatase (ATPase) dépendantes [36], suivi par un transport passif d'ions chlorure [37]. Puis, l'ostéoclaste sécrète alors des protéases acides telles que la cathepsine K (Ctsk)[38] [39] et la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) [40]. L'ostéoclaste sécrète aussi des métalloprotéases matricielles (MMP) telle que la MMP9 qui participe à la résorption du tissu osseux [41].

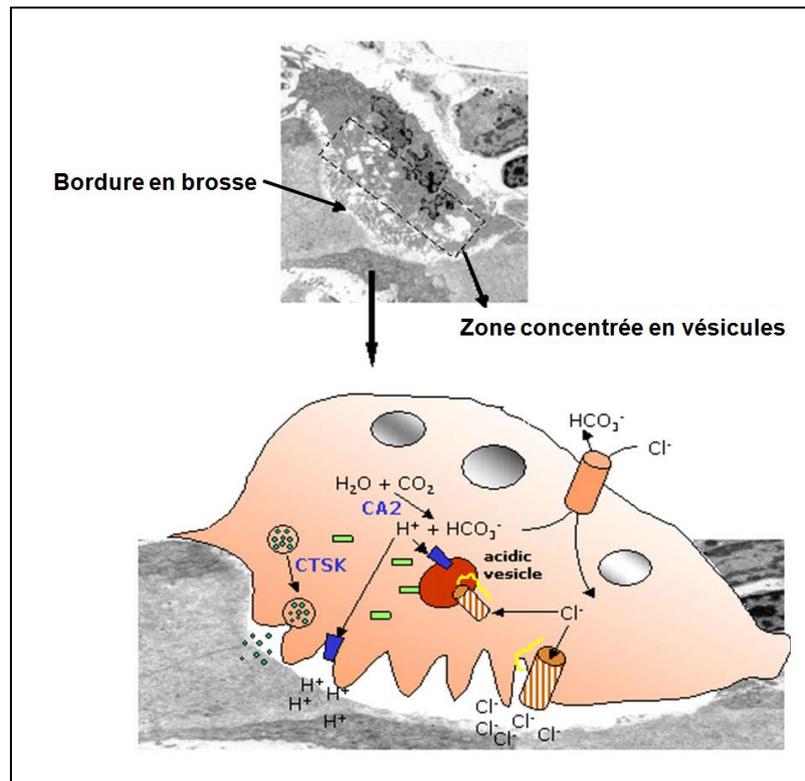


Figure 7 : Observation au microscope électronique à transmission d'un ostéoclaste actif. Le schéma illustre la production d'enzymes et de protons responsables de la résorption de la matrice minéralisée. Adapté de Helfrich MH et al, 2007 [42].

C. Ostéogénèse

L'ostéogénèse est le processus par lequel s'élabore le tissu osseux. L'os est toujours précédé par un tissu conjonctif dit ostéogène dont les cellules, d'abord indifférenciées

deviennent des ostéoblastes. Ces cellules, arrivées à maturité, formeront la matrice ostéoïde sur laquelle se fixeront les cristaux d'hydroxyapatite. Cela fait intervenir deux phases, l'ossification primaire puis secondaire.

1) Ossification primaire

L'os se développe par remplacement d'un tissu conjonctif préexistant. Les mécanismes de formation de l'os ou ostéogénèse observés chez l'embryon sont : l'ossification de membrane (endomembranaire), dans laquelle le tissu osseux se dépose directement dans le tissu conjonctif ou mésenchymateux et l'ossification endochondrale dans laquelle le tissu osseux remplace un cartilage hyalin préexistant, ébauche ou modèle de l'os futur.

L'**ossification membranaire** a lieu lors du développement des os plats (Figure 8). Le tissu osseux se développe directement par différenciation du tissu mésenchymateux embryonnaire. Les CSM s'agrègent sans cartilage intermédiaire. Ce processus est contrôlé par des signaux de régulation reposant sur les polypeptides (famille Wnt, Hedgehog, facteur de croissance des fibroblastes et facteurs de croissance cellulaire β). Ce processus débute avec l'arrivée de la vascularisation. Au niveau d'une zone vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire, les CSM se différencient en ostéoblastes. Un blastème osseux se constitue. Au centre, les ostéocytes sont reliés entre eux par leurs prolongements cellulaires. Les ostéoblastes revêtent le blastème osseux en surface avec une matrice ostéoïde. Dans un second temps, la matrice sera minéralisée. Lors de l'ossification primaire, de très nombreuses travées isolées s'élargissent par croissance appositionnelle et fusionnent ultérieurement pour former ce centre d'ossification primaire. Le dépôt continu d'os sur les surfaces trabéculaires aboutit au comblement des espaces inter-trabéculaires et ainsi, à la formation d'os compact.

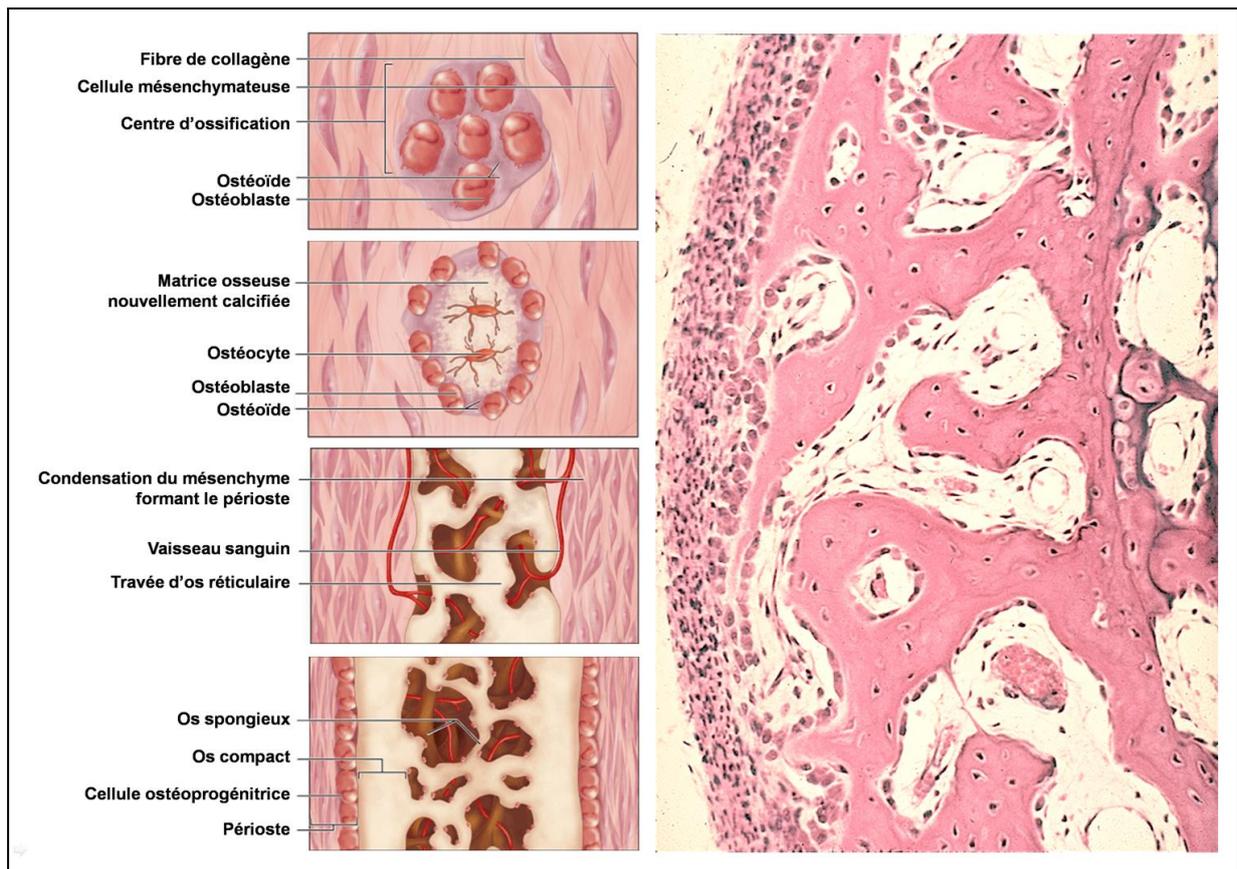


Figure 8 : Ossification membranaire. D'après Junqueira's Basic Histology 12th Ed [43]

L'**ossification endochondrale** est le processus par lequel le cartilage est remplacé par du tissu osseux (Figure 9). L'ossification débute toujours dans la région médiane de la diaphyse, sous le périchondre. Les chondrocytes s'hypertrophient et la matrice cartilagineuse se réduit à de fines travées dans lesquelles des vésicules matricielles concentrées en PAL. La PAL permet la libération de phosphate inorganique qui se lie au calcium pour former des cristaux d'hydroxy-apatite au niveau de la zone de cartilage calcifié. Parallèlement, les chondrocytes hypertrophiques dégénèrent et meurent par apoptose. Dans les chondroplastes laissés vides après la phagocytose des chondrocytes morts, des capillaires sanguins pénètrent et véhiculent les précurseurs ostéoblastiques sur le site diaphysaire. On parle de bourgeon conjonctivo-vasculaire. Le cartilage est alors progressivement remplacé par du tissu osseux. Les CSM du périoste se différencient en ostéoblastes qui synthétisent ensuite la matrice ostéoïde. Les ostéoblastes se différencient par la suite en ostéocytes.

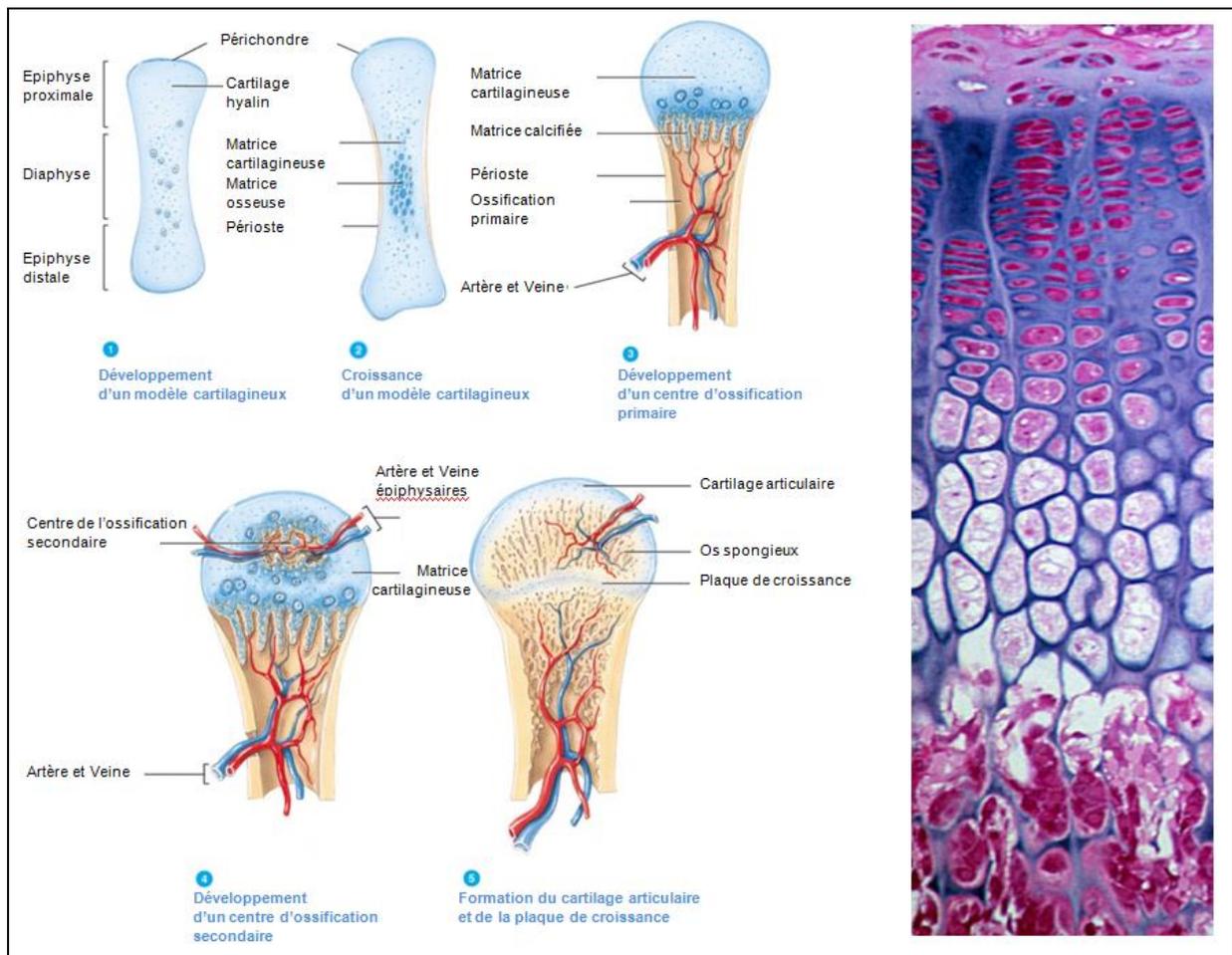


Figure 9 : Ossification endochondrale

2) Ossification secondaire

D'autres sites secondaires d'ossification apparaissent dans le cartilage aux extrémités de l'os. La maturation du tissu osseux dans ces centres secondaires est identique à celle des sites d'ossification primaires avec le remplacement du cartilage par la matrice osseuse et l'invasion des ostéoblastes et ostéoclastes. Le cartilage est remplacé par l'os jusqu'à une fine couche de cartilage séparant l'os diaphysaire, formé pendant l'ossification primaire de l'épiphyse formée pendant l'ossification secondaire. On parle de plaque épiphysaire.

D. Remodelage osseux

La croissance osseuse est généralement associée à une résorption partielle du tissu précédemment formé et au dépôt simultané d'une couche de nouveau tissu minéralisé. Ce phénomène est appelé remodelage osseux. Le remodelage permet ainsi l'adaptation en taille et en forme de l'os aux nouvelles contraintes liées à sa fonction de soutien et l'augmentation du volume des organes qu'il doit protéger. Ce renouvellement continu du

tissu osseux (10% du squelette par an) fait intervenir deux processus opposés : la formation et la résorption osseuse.

Un cycle de remodelage est caractérisé par quatre phases ou séquence ARIF : activation, résorption, inversion et formation [44]. Ce cycle dure environ 3 mois et une phase de quiescence sépare chaque cycle.

La **phase d'activation** initie le remodelage osseux. Les ostéocytes détectent des modifications d'ordre mécanique ou la présence de facteurs hormonaux (para-thyroïde hormone PTH, vitamine 3 et prostaglandine E2 PGE2) et les traduisent en signaux biologiques qui initient le remodelage osseux [45]. La phase d'activation débute par l'apoptose des ostéocytes. Classiquement, sans facteurs de remodelage, les ostéocytes sécrètent le « transforming growth factor » (TGF- β), qui inhibe l'ostéoclastogénèse. L'apoptose des ostéocytes induit ainsi la diminution des taux de TGF- β , et donc libère l'inhibition de l'ostéoclastogénèse [46,47] favorisant l'apparition des ostéoclastes sur le site. Les cellules bordantes se rétractent alors à la surface de l'os, laissant la surface du tissu osseux accessible aux précurseurs ostéoclastiques. Ces cellules mononucléées, activées par les sécrétions ostéoblastiques (incluant RANK-L), fusionnent et forment des ostéoclastes qui adhèrent à la surface osseuse et la digèrent, débutant ainsi la phase de résorption.

La **phase de résorption** consiste au scellement de la lacune d'Howship grâce aux intégrines présentes à la surface de l'ostéoclaste. En réponse à la PTH, les ostéoblastes produisent la protéine 1 chimio-attractante des monocytes (MCP-1) et augmentent l'ostéoclastogénèse dépendante de RANK-L [48]. D'autre part, les ostéoblastes expriment les principales cytokines de l'ostéoclastogénèse : « colony stimulating factor 1 » (CSF-1), RANK-L et ostéoprotégérine (OPG) [49]. Les ostéoblastes sécrètent aussi des MMPs et notamment la MMP-13, en réponse aux stimuli mécaniques [50] et endocriniens [51]. Les métalloprotéases dégradent alors la matrice ostéoïde non minéralisée, révélant la matrice minéralisée et ses points d'accroche arginine-glycine-asparagine (RGD) pour les ostéoclastes [52]. L'ostéoclaste se polarise et la bordure en brosse se forme induisant ainsi l'acidification du milieu grâce à la sécrétion d'ions H⁺. Cette sécrétion permet la dissolution de la phase minérale de la matrice. La phase organique est, elle, dégradée grâce à l'action des enzymes lysosomales (TRAP, cathepsine K, métalloprotéases et collagénases) [53]. Cette phase dure environ 30 jours.

La dégradation de la matrice induit la sécrétion de nombreux facteurs de croissance et de protéines osseuses morphogénétiques (BMPs) enchâssées dans la matrice osseuse qui activent les cellules ostéoprogénitrices [54]. On parle alors de la **phase d'inversion**. La profondeur d'érosion et la concentration en calcium vont induire le détachement des ostéoclastes de la surface osseuse. En effet, la concentration en calcium augmentant dans la lacune après la résorption, elle induit une instabilité des filaments d'actine qui délimitent la zone étanche entre le tissu osseux et l'ostéoclaste. La lacune n'est plus hermétique. Cela

engendre une augmentation du pH, et donc l'activation des MMP telle que la MMP-9 provoquant un déplacement de l'ostéoclaste et finalement son apoptose. La zone de résorption étant libérée, les macrophages viennent lisser le fond de la lacune et phagocyter les débris cellulaires.

La **phase de formation** du tissu osseux peut alors débuter. Les cellules ostéoblastiques arrivent sur le site et sécrètent la matrice organique composée principalement de fibres de collagène. Cette production peut être favorisée par l'action d'hormones (sexuelles, vitamine D,...) ou par des facteurs de croissance. Débute ensuite la phase de minéralisation de cette matrice. Pour cela, l'ostéoblaste sécrète la PAL, présente sous forme de vésicules dans la matrice non minéralisée, l'OC, la BSP et la vitamine D3 permettant la fixation du calcium aux fibres de collagène.

Une fois la matrice minéralisée, les ostéoblastes matures présents dans la lacune peuvent se différencier en ostéocytes emmurés dans le tissu osseux. Les ostéoblastes peuvent aussi migrer à la surface et constituer la ligne de cellules bordantes ou encore mourir par apoptose. Cela constitue la phase de quiescence du cycle de remodelage osseux.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le tissu osseux est un organe indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Malgré sa capacité de cicatrisation, il est parfois nécessaire d'effectuer une greffe osseuse pour régénérer des défauts de taille critique. Cependant, cette intervention chirurgicale requiert un second site chirurgical impliquant d'importants risques pour le patient. D'autre part, la quantité d'os prélevé reste très limitée. Une nouvelle technique de régénération osseuse, à partir de CSM cultivées et associées aux particules de BCP, a été proposée dans le cadre d'essais cliniques. Même si de nombreux travaux démontrent l'apport significatif de ces cellules dans le processus de formation osseuse, peu d'études présentent l'implication cellulaire qui conduit à ce phénomène.

Aussi, les objectifs de la thèse ont été :

- d'identifier les acteurs de l'ostéogénèse induite par la greffe de cellules souches et ainsi déterminer leur implication chronologique dans le processus.
- de valider le pouvoir ostéogénique d'un autre type cellulaire, les monocytes.

Au cours du siècle dernier, les progrès de la médecine et des sciences ont permis d'augmenter l'espérance de vie de l'être humain. Néanmoins, cet accroissement de la longévité a entraîné l'émergence de pathologies diverses telles que les affections ostéo-articulaires. Afin de traiter ces affections, de nombreux traitements sont mis au point. Classiquement, les molécules thérapeutiques sont, dans un premier temps, validées par des tests *in vitro* sur des cultures en 2 dimensions de cellules primaires ou de lignées tumorales. Par la suite, une étude chez l'animal permet de valider l'efficacité du produit dans un modèle approprié. Cependant, un certain nombre de ces molécules ne sont jamais mises sur le marché faute d'efficacité ou dû à une trop forte toxicité chez l'homme.

C'est pourquoi, l'objectif de cette thèse a été :

- de mettre au point un modèle 3D miniaturisé de tissu osseux *in vitro* à partir de CSM et de monocytes humains.
- d'optimiser ce modèle pour l'étude de l'ostéosarcome et ainsi mimer le micro-environnement tumoral *in vitro* pour mesurer l'efficacité de molécules à viser thérapeutique.

CHAPITRE II :

MECANISME DE FORMATION DU TISSU OSSEUX

A PARTIR DE CELLULES SOUCHES

EN ASSOCIATION AVEC

DES PARTICULES DE PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE

CHAPITRE II : MECANISME DE FORMATION DU TISSU OSSEUX A PARTIR DE CELLULES SOUCHES EN ASSOCIATION AVEC DES PARTICULES DE PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE

I- Perte de substance osseuse et ingénierie tissulaire :

A. Perte de substance osseuse

Les pertes de substance osseuse sont la conséquence de traumatismes ou de résections thérapeutiques (tumeur, infection, correction orthopédique). L'une des propriétés les plus remarquables des êtres vivants est la capacité de certains tissus à se régénérer. Chez les mammifères, seules certaines aires déterminées du corps peuvent se renouveler [55]. Cependant, dans certains cas, la perte de substance, notamment osseuse, ne peut se régénérer de façon spontanée : 10-20% des cas [56].

1) Traumatismes

L'application de contraintes dépassant la résistance de l'os entraîne une fracture. Il existe différentes fractures : la fracture ouverte, fermée, oblique, de bois vert, transverse, comminutive, engrenée et de compression.

Si la fracture n'est que peu ou pas déplacée, une simple immobilisation peut suffire pour obtenir la consolidation osseuse. Si l'orientation ou l'espacement des fragments est trop important, une ostéosynthèse est nécessaire pour remettre les fragments en contact et stabiliser la fracture.

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

2) Pathologies osseuses non traumatiques

En Europe, plus de 150 millions de patients de tous âges sont atteints par l'une des nombreuses affections du tissu osseux : l'ostéoporose [57], l'arthrose, les rhumatismes

inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) et tumeurs osseuses. Ces pathologies entraînent des altérations du tissu.

Les tumeurs osseuses, qu'elles soient malignes primitives (ostéosarcome) ou secondaires (métastases) peuvent parfois entraîner l'exérèse de grands volumes osseux. Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune.

3) Physiopathologie des pertes de substance osseuse

La cicatrisation du tissu osseux endommagé se déroule en 3 étapes distinctes.

La phase inflammatoire :

Cette phase intervient suite au traumatisme du tissu. Il est le siège d'une réaction inflammatoire. Elle permet de dégrader les tissus dévitalisés, laissant ainsi une zone propre à la reconstruction osseuse.

Suite aux dommages causés aux tissus, un hématome fracturaire se forme. Puis les cellules souches de la couche interne du périoste se multiplient, colonisent le site de réparation et se différencient en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes. Enfin, la néovascularisation se met en place dans le foyer de la fracture par formation de vaisseaux et par la création d'un système extra-osseux d'irrigation.

La phase de réparation :

Par la suite, le tissu inflammatoire est remplacé par un tissu dit « de granulation ». Il est composé de cellules préostéogéniques qui, sous l'action de facteurs de croissance et des BMPs, se multiplient et se différencient en ostéoblastes. Ces cellules sont organisées en une structure solide appelée cal. En fonction de l'apport en oxygène, le cal devient fibrocartilagineux ou osseux. Dans ce dernier cas, les cristaux d'hydroxyapatite se déposent sur les fibres de collagène. Cette minéralisation se met en place de proche en proche dans le cal, jusqu'à rejoindre le tissu natif.

La phase de remodelage

Suite à la formation du cal, le tissu subit plusieurs cycles de remodelage osseux. Pendant plus de 12 mois après sa formation, le tissu reste immature, non lamellaire. Au fur et à mesure, la vascularisation aléatoire du cal est réorganisée laissant place au réseau vasculaire de type haversien.

4) Les limites de la cicatrisation osseuse

- L'éloignement des fragments

Le problème de cicatrisation peut provenir de l'éloignement ou du mauvais alignement des fragments. Dans les deux cas, le type de tissu, qui se développe dans le foyer

de la fracture, est modifié. Des recherches ont montré que la distance critique est fixée à 1,4 fois le diamètre diaphysaire moyen de l'os considéré, indépendamment de l'espèce. Lorsque cette distance est dépassée, le défaut de progression du tissu collagénique et de la vascularisation conduit à la formation d'une pseudarthrose.

L'éloignement des fragments peut aussi se manifester par une mauvaise orientation des abouts fracturaires.

- Les mouvements interfragmentaires

Dans le foyer de la fracture, les mouvements interfragmentaires ont une réelle importance dans la formation du cal osseux. En effet, les mouvements de type cisaillement, flexion, rotation ralentissent voire interrompent la cicatrisation en détruisant la néovascularisation qui tente de se mettre en place. Il est donc essentiel de stabiliser voire comprimer le foyer de fracture afin d'obtenir une cicatrisation osseuse.

- L'infection

La fracture ouverte fait toujours craindre une infection de l'os ou des tissus environnants. L'os a la particularité de guérir très mal des infections et d'exiger des traitements antibiotiques très lourds. L'infection se fixe sur les parties de l'os qui peuvent être dévitalisées voire nécrosées. L'infection entretient la phase inflammatoire, ne laissant pas la place au développement du tissu granuleux puis du tissu osseux.

- La vascularisation

Comme dit précédemment, la vascularisation dans le foyer de la fracture est un facteur clé dans la formation d'un cal osseux. Le développement du réseau sanguin permet l'apport de l'oxygène, de cellules, de minéraux, de facteurs nutritifs, de croissance et de différenciation.

B. Comblement des pertes osseuses

Les objectifs du traitement d'une perte osseuse sont le comblement des zones où le tissu osseux manque, la récupération fonctionnelle, la cicatrisation et la tolérance aux contraintes mécaniques [58,59].

Le traitement des pertes de substance osseuse nécessite que l'on tienne compte d'éléments propres à chaque cas. En effet, la biologie du défaut osseux va déterminer l'approche thérapeutique utilisée [60]. Les matériaux, destinés à être implantés en site traumatique pour combler le défaut, doivent respecter certaines propriétés. L'absence de toxicité est une propriété essentielle de l'implant. Si le matériau ou les produits de sa dégradation entraîne la libération de molécules nocives, l'implant sera rejeté. La biocompatibilité caractérise la façon dont l'implant est toléré par les tissus receveurs. Plus l'implant est biocompatible, moins son implantation provoquera de réaction cellulaire, d'inflammation propice au rejet. L'implant est dit bioactif lorsqu'un tissu se forme

spontanément à sa périphérie sans interposition d'un tissu inflammatoire. L'ostéoconduction se définit comme la capacité de l'implant à servir de support à l'ostéoformation. L'ostéoinduction d'un implant s'estime à sa capacité à induire spontanément la différenciation des cellules en contact avec lui en cellules de type ostéoblastique. Enfin l'ostéogénicité intervient lorsque l'implant apporte avec lui des cellules capables de survivre et d'induire une ostéogénèse [59,61,62].

1) Greffes osseuses biologiques

Les greffes osseuses de type biologique sont majoritairement utilisées dans le cadre d'un comblement de défaut non résorbable [63]. La capacité d'intégration du greffon dépend de sa densité. En effet, l'implantation d'un matériau de la même densité que l'os cortical permet de conserver les propriétés mécaniques du tissu. En revanche, l'implantation d'un matériau spongieux favorise la vascularisation du tissu et ainsi la colonisation par des cellules hôtes [64].

On distingue 3 types de greffes osseuses biologiques : les autogreffes, les allogreffes et les xéno-greffes.

Les **autogreffes** osseuses consistent à prélever un tissu osseux frais au niveau d'un second site chirurgical, puis à son implantation dans le défaut. La greffe autologue est largement choisie du fait de ses capacités ostéogéniques (car elle apporte des éléments propres à l'os vivant tels que les cellules et les facteurs de croissance) [65], ostéoconductrices (du fait de sa composition organique permettant ainsi la colonisation par les cellules osseuses), et ostéoinductrices (les protéines ostéogéniques qui la composent permettent la différenciation des cellules ostéoprogénitrices) [66].

L'autogreffe peut présenter différentes formes : blocs, fragments, morcelée ou semi-liquide par aspiration de la crête iliaque. Selon le site de prélèvement (fémur, tibia, péroné, côtes, crête iliaque,...), le greffon peut être vascularisé ou non. La greffe osseuse autologue présente de nombreux avantages et principalement, celui de ne pas induire de réaction de rejet de la part du patient. La greffe est peu coûteuse car ne nécessite pas la mise en place d'une seconde équipe de chirurgie ou celle d'un traitement supplémentaire. Néanmoins, bien que l'autogreffe remplisse de nombreux critères, son utilisation est souvent associée à la morbidité du site donneur (8.6%), à des infections (2.5%) ou hémorragies (3.3%) [67]. De plus, la quantité de tissu osseux prélevée ne peut excéder le volume de 20 cm³ et peut être largement réduite après implantation du greffon du fait d'une importante résorption de la part des ostéoclastes résiduels. La viabilité du tissu dépendra donc de la survie et de l'implication des cellules dans la néoformation osseuse.

Les **allogreffes** osseuses sont utilisées comme alternative à l'autogreffe. Elles consistent en un prélèvement de tissu sain chez un individu donneur. Elles sont utilisées lorsqu'une greffe

autologue n'est pas envisageable due principalement au volume limité du prélèvement. Cependant, elles sont moins utilisées à cause des risques de rejet et de risque de transmission de pathogènes [68].

Le greffon peut provenir d'un patient à l'occasion de prélèvement opératoire ou lors de prélèvements multiples sur un cadavre. La greffe peut être sous forme de blocs, de fragments, morcelés ou en poudre. Elle peut provenir d'os long ou d'articulation. Le prélèvement et l'implantation du greffon n'étant pas simultanés, des techniques de conservation du tissu osseux ont dû être mises au point. Ce développement a permis la création de banques de tissu, augmentant ainsi la compatibilité entre donneur et receveur. Les greffons allogéniques font l'objet de divers traitements afin de rendre possible leur utilisation : traitements thermiques, chimiques, stérilisation, déshydratation et suppression des agents immunogènes tels que les protéines et les cellules. La réaction immunologique est maîtrisée augmentant ainsi la compatibilité entre donneur et receveur et ainsi la capacité des vaisseaux à pénétrer le greffon. Cependant, ces traitements altèrent considérablement les propriétés ostéoinductrices et ostéoconductrices du matériau.

La **xénogreffe** osseuse provient de corail ou d'un autre tissu osseux animal. Elle présente les mêmes inconvénients que l'allogreffe : risques d'immunogénicité et de pathogénicité ; mais reste une source de matériaux.

L'os bovin est utilisé suite à un traitement thermique (1200-1300°C). A cette température, la matrice organique est calcinée et seule la phase minérale de porosité similaire à l'os trabéculaire est conservée.

Le corail est utilisé en chirurgie maxillo-faciale ou arthrodèse vertébrale du fait de sa structure poreuse propice à l'invasion et à la prolifération des cellules humaines. Il s'agit d'un matériau biocompatible et résorbable et sa composition en carbonate de calcium peut être transformée en hydroxyapatite par un procédé hydrothermal.

2) Substituts osseux implantables

Un grand nombre de matériaux permettent une alternative aux greffes osseuses [69]. Cependant, les contraintes mécaniques, chimiques et biologiques du site d'implantation, obligent les biomatériaux, comme les greffes osseuses, à respecter de nombreuses exigences. Les propriétés mécaniques du biomatériau doivent être compatibles avec le site d'implantation : poreux ou compact. D'autre part, la composition, la structure et surface du biomatériau influent sur son ostéo-intégration [70][71].

Les céramiques : HA, alpha et bêta TCP, céramiques biphasées

A ce jour, environ 60% des substituts osseux utilisés en chirurgie reconstructrice contiennent des céramiques, qu'elles soient pures ou associées à d'autres matériaux (rapport d'évaluation des substituts osseux, HAS, 28 mai 2013). En effet, les céramiques synthétiques peuvent être préparées en grandes quantités et ont l'avantage de se présenter sous différentes formes : céramiques ou ciments, poreux ou pleins, en blocs ou en granules, injectables ou non.

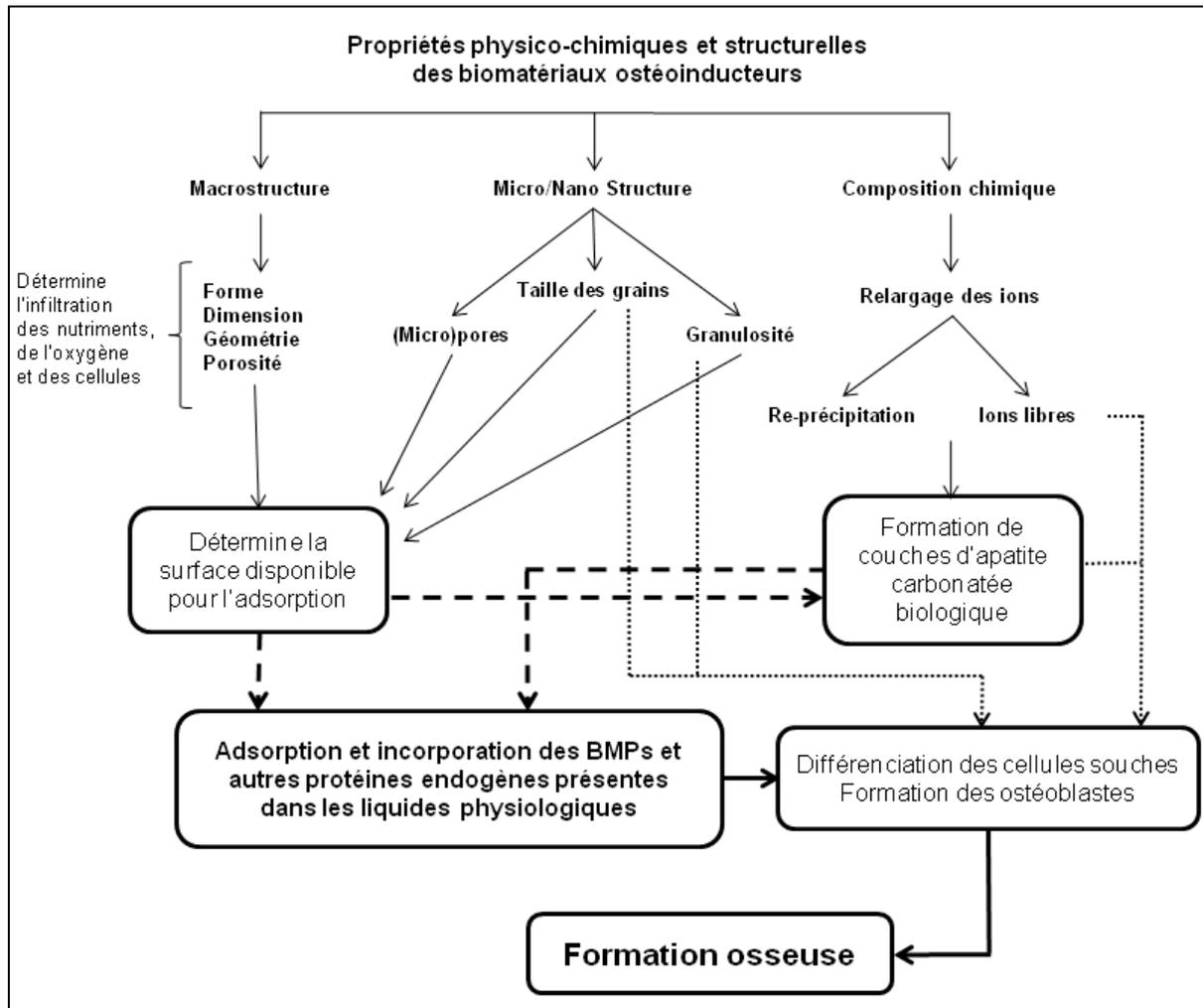


Figure 10 : Résumé schématique des mécanismes hypothétiques mis en œuvre dans la formation osseuse induite par un biomatériau. Modifié à partir de Barradas AMC et al, 2011 [69]

Contrairement aux polymères et métaux, un grand nombre de publications montre l'ostéoinduction de diverses céramiques dans des modèles animaux : HA, bêta-tricalcium phosphate, biphasic calcium phosphate, dicalcium phosphate anhydre, apatite carbonaté, calcium purphosphates et les carbonates de calcium/HA. Nous ne présenterons ici que les matériaux réalisés à partir d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta [72].

L'hydroxyapatite est la principale composante de l'émail dentaire, de la dentine et de l'os. L'hydroxyapatite phosphocalcique utilisée dans les céramiques pour la formation osseuse présente une très forte similitude avec l'hydroxyapatite osseuse : sa composition est $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)]$ et son rapport calcium/phosphate est de 1,67. Elle est très peu soluble et son taux de dégradation est dépendant du pH du milieu et des contraintes mécaniques qui lui sont imposées.

Le **phosphate tricalcique bêta** ou β -TCP $[(Ca_3(PO_4)_2)]$ présente lui un ratio calcium/phosphate de 1,5. Le β -TCP est fragile et peu résistant. De ce fait, ce matériau ne peut être utilisé que dans des zones non portantes et subissant peu de contraintes mécaniques. Contrairement à l'hydroxyapatite, le β -TCP se dégrade rapidement du fait de 2 phénomènes parallèles : la dissolution naturelle et la résorption par phagocytose.

Le **phosphate de calcium biphasé** ou BCP provient de l'association de deux phosphates de calcium : l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique bêta. La variation du rapport HA/TCP permet de modifier la vitesse de résorption (résorption lente avec l'HA ou rapide avec le TCP) et donc d'adapter le matériau à son utilisation. Les BCP sont usuellement préparés par précipitation et frittage à une température proche des 1100°C. Ils sont disponibles sous différentes formes (particules, granules, blocs, poreux ou compacts). La macroporosité du biomatériau (taille des pores $>200\mu\text{m}$) permet son ostéointégration par la pénétration des cellules, des fluides biologiques et protéines solubles [73]. Elle est obtenue en ajoutant des substances volatiles à la préparation avant frittage (naphtalène, sucre ou polymère). Selon la molécule ajoutée, les pores sont ronds ou géométriques. La microporosité du matériau (taille des pores $<10\mu\text{m}$) dépend de la température et du temps de frittage. Elle influence les propriétés physicochimiques et mécaniques des céramiques. Les BCP présentent des caractéristiques très similaires aux greffes osseuses qui les rendent intéressants pour la régénération osseuse. Ils sont biocompatibles car ils ne provoquent pas de réaction immunogène *in situ*. Leur dégradation/dissolution fait des céramiques des matériaux bioactifs. Cela permet la formation d'une couche d'apatite à leur surface et ainsi le dépôt des cellules ostéoblastiques. Ils sont ostéoconducteurs car de nombreux types cellulaires colonisent la surface et les pores de ces biomatériaux grâce à leurs propriétés physicochimiques. Enfin, ils sont dits ostéoinducteurs car après leur dissolution, sont libérés des débris qui stimulent la différenciation de la lignée ostéoblastique permettant ainsi la formation osseuse.

C. Concepts sur la régénération osseuse

Malgré des résultats cliniques satisfaisants, l'utilisation d'auto- et allo-greffes représente de nombreux inconvénients. Les principaux composants d'un substitut osseux « idéal »

pourraient ainsi être des biocéramiques, des protéines de la MEC et des cellules souches mésenchymateuses [74].

L'implantation de CSM avec des biocéramiques semble ainsi être une alternative intéressante aux greffes osseuses. Les CSM présentent de nombreuses qualités qui leur permettraient de promouvoir la régénération du tissu.

En effet, il est connu que les CSM, du fait de leur multipotence, sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires et peuvent ainsi intervenir dans différents processus de la réparation.

D'autre part, plusieurs études ont montré que les CSM pouvaient agir sur les principaux mécanismes cellulaires : prolifération, migration, apoptose (Figure 11). En effet, la principale propriété trophique des CSM est la sécrétion de facteurs de croissance et d'autres chemokines qui agissent sur la prolifération cellulaire et l'angiogénèse. Les facteurs de croissance endothéliale et vasculaire (VEGF), IGF-1, EGF et angiopoietine-1 sont sécrétés par les CSM afin de recruter des cellules d'origine endothéliale et amorcer la vascularisation [75]. Les CSM sont connues aussi pour la sécrétion de facteur dérivé des cellules stromales (SDF1) et la protéine inflammatoire des macrophages (MIP α et β).

Les CSM interviennent dans la régulation du processus inflammatoire en sécrétant, en réponse aux molécules de type interleukines IL1, 2, 12, un panel de facteurs de croissance et de protéines inflammatoires (prostaglandine 2, TGF β 1, HGF, SDF1, IL4, IL6, IL10 et IL1) qui mobiliseront sur le site divers types cellulaires [76–80]. D'autre part, les CSM bloquent la prolifération et l'activité des cellules inflammatoires, y compris des lymphocytes B et T, des cellules « natural killer »(NK), des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques [77,81,82].

Enfin, il est connu que les CSM ont un effet sur le déséquilibre inflammatoire lors d'un traumatisme par la promotion de la polarisation des lymphocytes et macrophages [83,84]. En effet, les CSM promeuvent la polarisation des cellules TH1 vers les cellules TH2 en réduisant la sécrétion d'IFN γ et en augmentant les interleukines 4 et 10 [76,85]. De même, la polarisation des macrophages M1 (dits pro-inflammatoires et anti-angiogéniques) vers les M2 (dits anti-inflammatoires) facilite la reconstruction tissulaire dans de nombreux tissus [84,86–88].

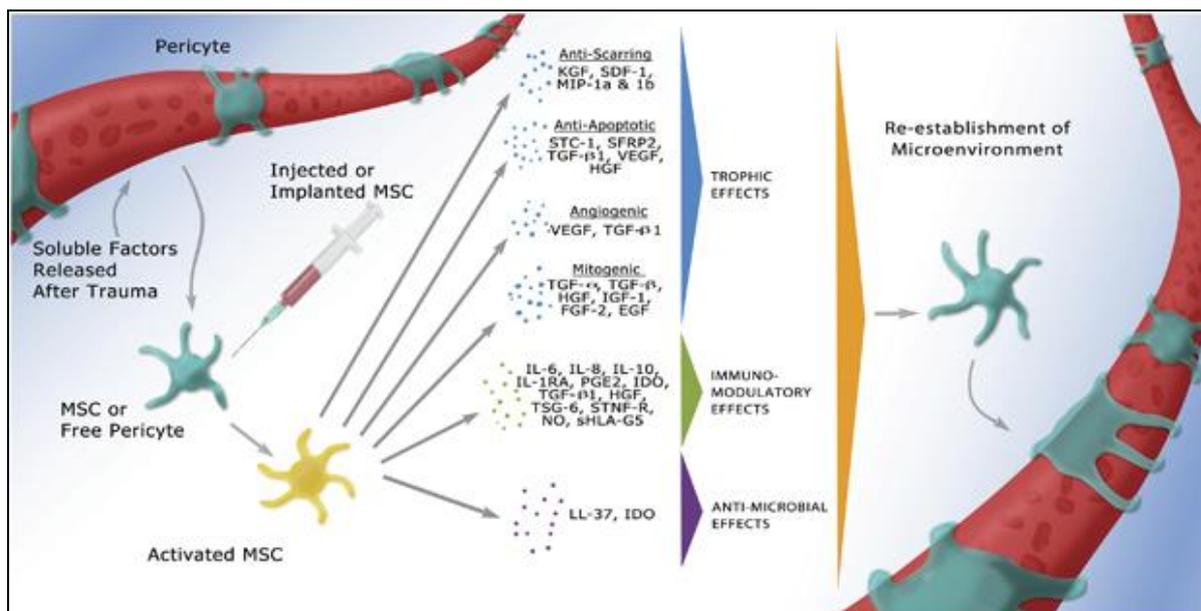


Figure 11 : Les CSM sont stimulés par des facteurs de croissance et des chemokines activant les cellules hôtes qui répondent par la sécrétion de facteurs trophiques (mitogéniques, angiogéniques, anti-apoptotiques et anti-microbactériens). Modifié à partir de Murphy et al, 2013 [89].

D. Monocytes et macrophages

Les monocytes et macrophages représentent environ 20% de la population des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Ils dérivent des précurseurs pluripotents de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques, qui peuvent se différencier en différents types cellulaires comme les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les macrophages, et les cellules dendritiques.

Les monocytes sont caractérisés par l'expression du récepteur au M-CSF, CSF-1R et du marqueur CD14. Ils quittent la moelle osseuse pour le sang périphérique sous l'action de facteurs chimioattractants, avant de passer la barrière endothéliale et ainsi pénétrer dans le tissu où ils se différencient en macrophages. Les macrophages sont ubiquitaires au sein de l'organisme et leur nom peut être spécifique du tissu envahi : les cellules de Kupffer (foie), les macrophages alvéolaires (poumons) [90].

Les macrophages montrent une très forte plasticité. Leur physiologie et leurs fonctions dépendent des stimuli environnementaux : mobilité, phagocytose, présentation antigénique et capacité sécrétrice. Les signaux responsables des caractéristiques phénotypiques des macrophages sont des molécules excrétées ou exprimées par les cellules de l'environnement, les cellules immunitaires du système inné et les composés de la matrice extracellulaire. Il s'agit notamment de molécules d'adhésion, de cytokines, de chimiokines ou de facteurs de croissance.

L'inflammation se traduit par l'attraction de différents types cellulaires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes) et l'activation des macrophages résidents. Un certain nombre de groupes évoque une classification des états d'activation des macrophages recrutés : les macrophages M1 et M2 [84,91] (figure 12).

La polarisation en macrophages M1 est soutenue par la sécrétion d'IFN γ et de TNF α produits par les lymphocytes Th1. L'IFN γ active de manière « classique » les macrophages qui vont ainsi produire de l'IL-12, activant ainsi la réponse immune à médiation cellulaire des Th1. L'IFN γ active d'autre part la synthétase inductible d'oxyde nitrique (iNOS) [92] et donc la synthèse de NO, toxique pour les parasites intracellulaires et les bactéries. La polarisation des macrophages en M1 est aussi connue pour favoriser la résistance aux tumeurs.

La polarisation dite M2 est définie comme activation « alternative » induite par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2. L'IL-4 stimule l'activité arginase des macrophages, leur permettant de convertir l'arginine en ornithine, un précurseur de polyamines et du collagène, contribuant ainsi à la production de la matrice extracellulaire [93]. Les caractéristiques communes entre les sous-groupes de macrophages M2 sont la faible production d'IL-12 et la forte production d'IL-10. L'IL-10 est connue pour réprimer l'expression du CMH de classe II et la production de NO des macrophages.

L'état d'activation des macrophages permet, d'autre part, la polarisation des lymphocytes Th1 et Th2 [94]. En effet, la sécrétion par les macrophages M1 de cytokines et chimiokines telles que IL-12, CXCL9 et CXCL10 module la polarisation et le recrutement des cellules Th1. Au contraire, les macrophages M2, activés par l'IL-4, sécrètent les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL24, connues pour influencer le recrutement et l'amplification de la réponse Th2 (figure 12).

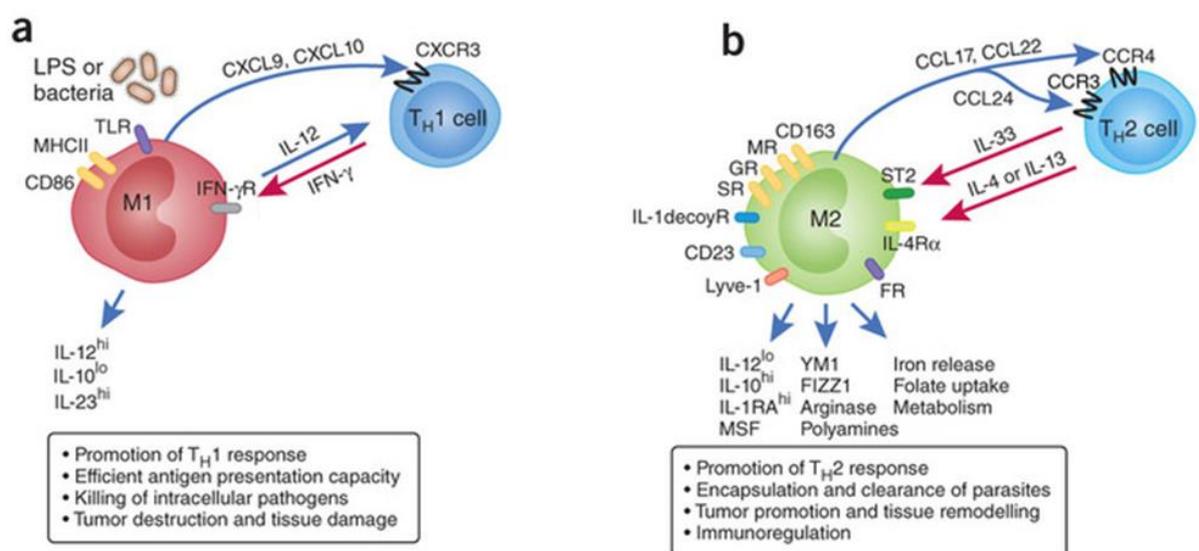


Figure 12 : Polarisation des macrophages M1 (a) et M2 (b) et interactions avec les cellules Th1 et Th2. D'après Biswas et al. 2010 [94]

II- Stratégies d'étude :

Même si de nombreux travaux ont portés sur l'influence *in vitro* et *in vivo* des CSM dans la néoformation du tissu osseux, aucune étude ne montre l'implication chronologique des différents types cellulaires, et en particulier celle des ostéoclastes et des macrophages.

Pour cela, nous avons implanté avec ou sans les CSM des particules de phosphate de calcium (BCP) en site ectopique, dans le muscle para-tibial de souris. Les expériences ont été conduites chez la souris nude pour permettre l'implantation de cellules humaines. Les animaux ont été euthanasiés à 1, 2, 4 et 8 semaines après l'implantation et les échantillons ont été étudiés pour l'expression génique et protéique. Cette étude nous a permis de mettre en évidence, dans un premier temps, la disparition des cellules humaines après 2 semaines d'implantation prouvant leur implication en tant qu'inducteur et non en tant qu'effecteur de la formation osseuse. Par la suite, le recrutement de monocytes a été étudiée montrant que les CSM influençaient leur migration sur le site d'implantation ainsi que leur différenciation en ostéoclastes et macrophages de type I. Enfin, la forte implication des ostéoclastes dans la formation osseuse a été mise en évidence par l'induction du blocage de l'ostéoclastogénèse par un anticorps anti-RANK-L.

Ces résultats sont présentés dans l'article n°1 publié dans Biomaterials en aout 2014: « Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages ».

L'étude précédente ayant montré l'effet inducteur et non effecteur des CSM dans la formation osseuse, il nous a semblé essentiel de montrer que peu de types cellulaires sont capables de cette propriété. C'est ainsi que pour créer un contrôle négatif de notre expérience, l'implantation de monocytes humains CD14+ a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. De façon inattendue, cette implantation a induit la formation de tissu osseux au contact des particules de BCP. Par la suite, la dose de cellules monocytes humaines implantées a été recherchée afin d'optimiser la formation osseuse et ainsi obtenir la même quantité d'os formé que lors de l'implantation de CSM. Les cellules humaines CD14+ sont isolées à partir d'un prélèvement de sang, et contrairement aux CSM, leur obtention ne nécessite aucune phase de culture. Seuls une centrifugation sur un gradient de densité et un tri magnétique sont nécessaires. En outre, les cellules CD14+ peuvent être cryogénisées et implantées après décongélation, permettant ainsi le prélèvement d'une grande quantité de cellules plusieurs semaines en amont de l'intervention chirurgicale. Cette préparation cellulaire de monocytes triés à partir du sang du patient permettrait de réduire les coûts et les risques de la thérapie cellulaire. Au vu de ces avantages en régénération osseuse, ces résultats font l'objet d'un brevet intitulé « Bone regenerating biomaterials with selected cells from peripheral blood ».

III- Matériels et Méthodes :

A. Les biomatériaux : céramiques de phosphate de calcium biphasé

Pour ces expérimentations, nous avons utilisé des céramiques de phosphate de calcium biphasées (BCP) fournies par la société Biomatlante (MBCP+®) (Figure 13). Malgré les différentes formes de biomatériaux utilisés, toutes les céramiques étaient de même composition. Elles sont composées à 20 % d'hydroxyapatite (HA) et 80 % de béta-tricalcium phosphate (β -TCP) correspondant au poids total. La porosimétrie à intrusion de mercure ($>10 \mu\text{m}$) a pu mettre en évidence une surface représentant $863 \pm 72 \text{ cm}^2/\text{g}$ pour ces particules.

1) Différentes formes de BCP utilisées

Les disques de BCP utilisés avaient un diamètre de 6 mm et une épaisseur de 1 mm.

Les granules de BCP, de granulométrie comprise entre 0,5 et 1 mm, présentaient une microporosité de surface de 70 % du volume total. Ces particules étaient de formes aléatoires. Un contrôle sans microporosité a été réalisé par chauffage à 1350°C pendant 10 heures. La composition chimique a été vérifiée, seule la microporosité a été modifiée. Ces particules sont ensuite aliquotées en tube de 40 mg et stérilisées avec un autoclave (alphaklave23, HMCE) à 121°C durant 20 min. L'analyse de la composition et de la microporosité de surface effectuée avant et après la stérilisation n'a montré aucune différence.

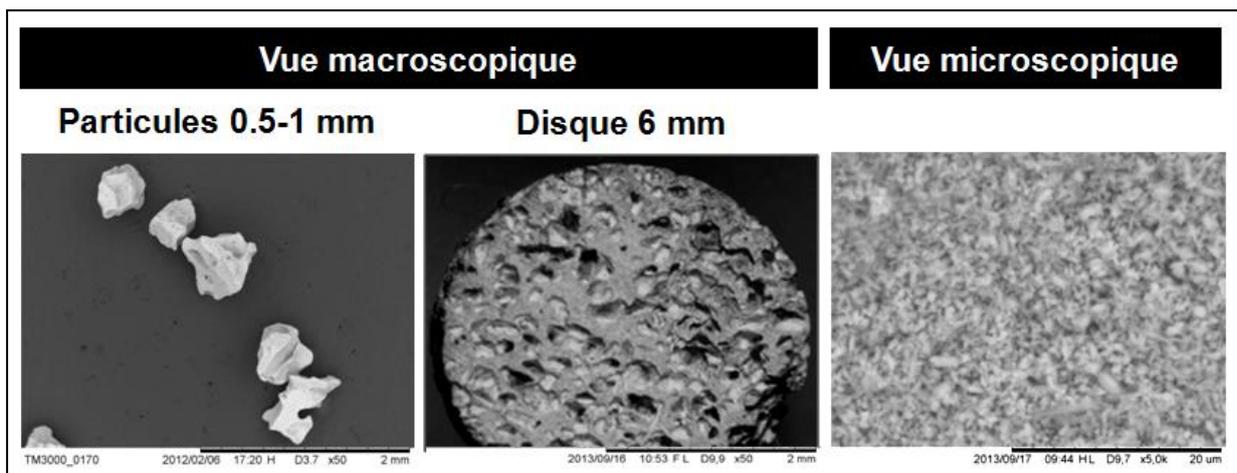


Figure 13 : Observation au MEB des céramiques de phosphate de calcium utilisées, particules et disque. Les 2 biomatériaux utilisés présentent la même microporosité.

2) Caractérisation des biomatériaux par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique d'observation de la topographie des surfaces. Dans cette étude, elle nous a permis de caractériser les surfaces des biomatériaux utilisés. Cette technique est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires, renvoyés par la surface de l'échantillon, sous l'impact d'un faisceau d'électrons primaires.

L'instrument permet de former un faisceau quasi parallèle, très fin (de l'ordre du nanomètre) d'électrons focalisés sur l'échantillon par un jeu de lentilles. Les électrons sont ensuite fortement accélérés par des tensions réglables de 0.1 à 30 kV. Grâce aux bobines de déflexion, les électrons balayent la surface de l'échantillon à étudier.

Sous l'impact du faisceau d'électrons, différents signaux sont émis qui permettront de former une image de la topographie de surface. Il y a essentiellement 5 types de signaux émis : rétrodiffusion d'électrons, émission d'électrons secondaires de faible énergie (provenant des couches externes des atomes de l'échantillon), émission de rayons X, émission de photons UV-visible, écoulement d'un courant vers la masse).

Le contraste de l'image provient de variations topographiques, chimiques et structurales, régissant la rétrodiffusion et l'émission d'électrons.

Au préalable à l'observation, l'échantillon subit une déshydratation complète par gradient d'alcool. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'enceinte du MEB (TM3000, Hitachi). Ceci a été suivi par la mise en place du vide et de l'observation des échantillons.

B. Les cellules

1) Les cellules souches mésenchymateuses

a) Origine et caractérisation des CSM

Les cellules souches mésenchymateuses nous ont été fournies par l'Institut für Transfusionsmedizin (Ulm, Allemagne). Les cellules provenaient de la moelle osseuse de patients ayant donné leur consentement éclairé et après l'approbation du comité éthique. Les moelles osseuses ont été ponctionnées sur des donneurs sains volontaires au niveau des crêtes iliaques. Les CSMs ont été isolées par adhérence au plastique de culture puis amplifiées à raison de 10 000 CSMs/cm² dans un milieu de prolifération et placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu se compose de aMEM eagle (aMEM, Gibco) supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine 1 %) et en sérum de veau foetal (SVF, Lonza) à 10 % de concentration (Chevallier *et al.*, 2010).

b) Décongélation / Entretien

Les cellules sont sorties du congélateur -80°C, puis réchauffées. Le milieu contenant les cellules est mélangé à du milieu de prolifération, puis centrifugé afin d'éliminer le diméthylsulfoxydide (DMSO, Sigma). Le culot est repris et les cellules sont ensemencées en triple flasque (F500, Dutsher), à raison de 10 000 cellules/cm² et incubées à 37°C dans une atmosphère humide sous 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine. Les passages sont réalisés à 80% de confluence. Pour cela, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est lavé par l'ajout de PBS. Les cellules sont ensuite incubées dans la trypsine/EDTA (Lonza) pendant 5 min à 37°C. La trypsine est inactivée par ajout de 2 volumes de milieu de prolifération puis centrifugée à 1600 rpm pendant 5 min. Un comptage au bleu trypan est réalisé sur cellule de Mallassez et les cellules réensemencées dans de nouvelles flasques à raison de 10 000 cellules/cm².

c) Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines

Par cytométrie en flux

Dans un premier temps, les cellules ont été caractérisées par cytométrie en flux. Après culture, les cellules ont été trypsinées, déposées à raison de 1 000 000 cellules/ml et centrifugées à 2 600 rpm pendant 1 minute. La préparation a été rincée 3 fois avec du PBS (Lonza) supplémenté en SVF à 10%. Les cellules ont été ensuite resuspendues avec l'anticorps dilué dans du PBS supplémenté en SVF à 10% pendant 15 minutes sur glace à l'obscurité. Une nouvelle centrifugation a été effectuée et les cellules ont été resuspendues dans du PBS seul. La cytométrie en flux a été réalisée selon les instructions du fabricant (F500, Beckman Coulter). Divers marquages ont été réalisés à raison de 2 µl d'anticorps pour 100 000 cellules : marquage anti-CD45 (Biolegend, ref 3040007), anti-CD73 (Biolegend, ref 550741), anti-CD90 (BD, ref 555596), anti-CD105 (Biolegend, ref 323205).

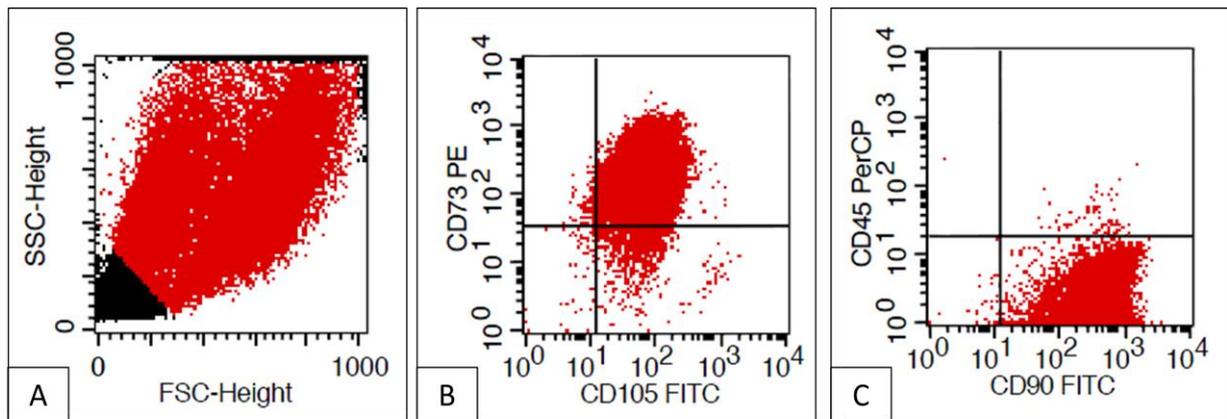


Figure 14: Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine par cytométrie en flux (CD73/CD105 (B); CD45/CD90(C)) après configuration des paramètres granulose/taille des cellules attendues (A).

Par différenciation adipogénique, chondrogénique et ostéogénique des CSM

Après avoir vérifié le phénotype des CSM isolées à partir de la moelle osseuse, leur capacité à se différencier vers les 3 lignées cellulaires prépondérantes que sont les adipocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes a été testée afin de démontrer leur multipotentialité (Figure 15). Les cellules ont été cultivées dans des milieux de différenciation spécifique aux trois voies ainsi que dans un milieu de prolifération puis colorées.

Différenciation adipogénique :

De 150 à 250 000 CSM ont étéensemencées dans une flasque en milieu de différenciation (ADB, Adipogenic differentiation bullet kit, Cambrex). Les cellules ont été cultivées 3 jours dans le milieu ADB puis 3 jours en milieu d'amplification et enfin 3 jours en milieu ADB. Ce cycle de changement de milieux est renouvelé deux fois.

Après 18 jours, une coloration au Red oil O a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été rincées au PBS puis fixées pendant 30 secondes dans l'éthanol. Les cellules sont rincées à l'eau distillée pendant 45 secondes, immédiatement colorées pendant 10 minutes avec une solution de coloration filtrée (6 volumes d'Oil Red O, 4 volumes d'eau distillée), rincées à l'isopropanol 60 % et à l'eau distillée. Les cellules ont été contre-colorées à l'hématoxyline pendant 5 minutes puis rincées à l'eau distillée. Une coloration des lipides en rouge et des noyaux cellulaires en bleu a été obtenue. La coloration a été observée à la loupe binoculaire (Stemi 2000C, Zeiss) et au microscope inversé (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

Différenciation chondrogénique :

De 40 à 50 000 cellules ont étéensemencées dans un milieu dépourvu de sérum mais additionné de 1 mM de dexaméthasone (Sigma) et de 20 ng/ml TGF- β 3 (R&D Systems). Le milieu a été entièrement renouvelé tous les 3-4 jours pendant 14-20 jours.

Une coloration au bleu alcian caractéristique des glycoaminoglycane de la matrice cartilagineuse a été faite. Pour cela, les cellules ont été fixées avec du méthanol 99.5 %

pendant 2 minutes puis rincées 2 fois 5 minutes au PBS froid. Les CSM ont été colorées pendant 2 heures par une solution à 0.1 % de bleu alcian puis lavées 3 fois 5 minutes à l'eau courante avant d'être plongées dans le PBS. La coloration a été observée à la loupe binoculaire et au microscope inversé.

Différenciation ostéogénique :

Les CSMs ont étéensemencées à raison de 20 000 cellules/cm². Le milieu est changé après 3 jours de culture et remplacé par un milieu de différenciation (ODB, Osteogenic differentiation bullet kit, Cambrex) supplémenté avec 0.2 mM acide ascorbique (Sigma), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma), 10⁻⁸ M dexaméthasone (Sigma). Les cellules ont été cultivées dans l'ODB avec changement du milieu pour moitié tous les 3-4 jours jusqu'à 20 jours maximum.

Deux types de coloration ont été réalisés afin de constater la différenciation ostéoblastique des CSM : une coloration de la phosphatase alcaline et une coloration au rouge alizarine (RA).

Coloration PAL : La PAL est une protéine révélatrice de l'engagement des CSM vers le phénotype ostéoblastique. Le milieu de culture a été retiré et le tapis cellulaire lavé au PBS. Les cellules ont été fixées par une solution d'acétone/citrate pendant 1 min à température ambiante. Les cellules ont été rincées à l'eau distillée puis incubées dans une solution de Fast Violet B (Sigma Aldrich, 85L3R-1KT) contenant du naphthol pendant 30 minutes à température ambiante. A nouveau, les cellules ont été lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée. La coloration a été observée à la loupe binoculaire et au microscope inversé.

Coloration au rouge alizarine : Cette technique permet de révéler la minéralisation de la matrice extracellulaire par la coloration des dépôts de calcium lors de la différenciation ostéoblastique. Le milieu de culture a été retiré et le tapis cellulaire lavé 2 fois au PBS. Les cellules ont été fixées à l'éthanol 70 % froid pendant 20 minutes et le tapis recouvert d'une solution de rouge alizarine (2%, pH 4.2, Merck) pendant 10 minutes. Le colorant a ensuite été retiré et le tapis cellulaire lavé 3 fois avec de l'eau distillée. La coloration a été observée à la loupe binoculaire et au microscope inversé.

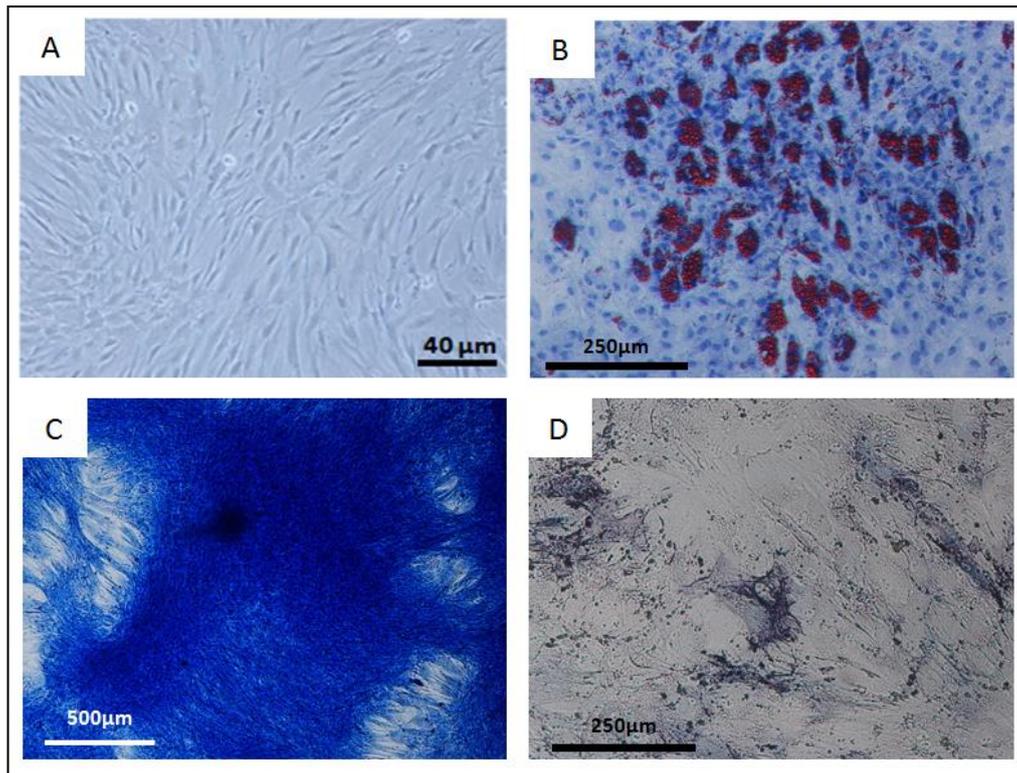


Figure 15: Mise en évidence par coloration histologique des différentes voies de différenciation de CSM cultivées *in vitro* (A). La voie adipogénique a été caractérisée par une coloration au red oil O (B), la voie chondrogénique par une coloration au bleu alcian (C) et la voie ostéogénique par une coloration à la phosphatase alcaline (D).

2) Les Monocytes : Origine, caractérisation

Les cellules issues d'un échantillon de sang humain provenant de l'Établissement français du sang (EFS) ont été triées par sélection positive des monocytes humains marqués CD14⁺ (CD14 microbeads, MACS Miltenyi biotec). Pour cela, le sang a été dilué au demi dans du PBS et déposé sur un gradient de biocoll separating solution (Biochrom AG). Puis, une centrifugation à 2000 rpm a été réalisée sans frein pendant 20 minutes. L'anneau a été récupéré et resuspendu dans du PBS puis de nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 1600 rpm. Le culot a été resuspendu et les cellules comptées sur cellule de Mallassez. Le culot a été ensuite repris dans 90 μ l de PBS et 10 μ l de billes magnétiques pour 10^7 cellules. La préparation a ensuite été incubée 15 min à 4 °C puis centrifugée à 1600 rpm pendant 10 minutes. Enfin, le culot a été repris dans 500 μ l de PBS froid et déposé sur la colonne aimantée. Après 3 lavages au PBS, la colonne a été retirée de l'aimant et son contenu dilué avec 500 μ l de PBS.

Par la suite, les cellules ont été caractérisées par cytométrie en flux après un marquage par l'anticorps anti-CD14 (Beckman Coulter, AO7764).

C. Association des biomatériaux avec les cellules

Les disques de BCP et les aliquots de 40 mg de granules (0.5-1mm) ont été stérilisés. Puis les solutions cellulaires de 70 μ l ont été associées aux biomatériaux à raison de $1,4 \times 10^6$ cellules par implant soit un rapport surfacique de 3×10^4 cellules par cm^2 . Avant implantation, les cellules restent en contact avec les biomatériaux pendant 1 heure.

D. Etude *in vivo*

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les conseils d'un chirurgien vétérinaire et dans le respect des directives de la communauté européenne validées par le comité d'éthique local.

Ces expérimentations ont été menées au sein de l'unité thérapeutique et expérimentale de la faculté de médecine de Nantes.

Les animaux sont fournis par le laboratoire Janvier. Des souris femelles âgées de 5 semaines de la souche NMRI Nu/Nu ont été utilisées afin de limiter la réaction immunitaire contre les cellules souches humaines. Les expérimentations ont été menées après 1 semaine d'acclimatation. Les souris avaient un poids moyen de 20 g.

1) Expérimentation animale en site orthotopique

Une perte osseuse de taille critique a été réalisée sur le crâne des souris au niveau de la calvaria. La régénération osseuse en site orthotopique peut alors être évaluée, permettant ainsi de montrer l'ostéoconductivité du biomatériau dans un environnement contenant les précurseurs osseux et reproduisant les conditions d'implantation d'un défaut à combler.

Pour cela, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane (2.5%, Flucka) avec un débit de 1 L/min, puis maintenus dans un cadre stéréotaxique. La zone d'intervention est désinfectée par une solution iodée (Bétadine). Une injection sous cutanée de lidocaine adrénalinée (2mg/kg) et une injection intramusculaire de buprénorphine (buprécare, 60 μ l/kg, Axience) sont réalisées 30 minutes avant l'opération. Une incision cutanée d'un centimètre est réalisée au niveau de la nuque et le périoste est retiré. A l'aide d'un moteur chirurgical, un défaut critique de 4 mm de diamètre est réalisé au niveau de la suture coronale. Une solution de cellules souches est déposée sur les disques de BCP 1 heure avant le dépôt sur le défaut osseux. Un contrôle est effectué sans disque de BCP et un autre avec un disque sans cellule. La peau est ensuite replacée sur le disque de BCP et suturée par un fil non résorbable (Filapeau 4/0, cutting 20mm, Péters surgical). Une injection intramusculaire de buprénorphine est réalisée toutes les 12 heures pendant 3 jours et si des

symptômes de douleurs persistent (difficulté à marcher, prostration). Les animaux sont euthanasiés après 8 semaines, sous anesthésie générale par dislocation cervicale.

Même si l'implantation en site orthotopique reste plus fidèle aux procédés de comblement de défauts de taille critique, seul un site ectopique peut mettre en évidence l'implication des cellules implantées et celle des cellules hôtes dans la néoformation osseuse.

2) Expérimentation animale en site ectopique

Une implantation de particules a été réalisée dans le muscle para-tibial, permettant ainsi d'observer la néo-formation du tissu osseux dans un site éloigné de tous précurseurs osseux et ainsi tester la capacité ostéogénique des cellules et des particules implantées.

Les CSMs et monocytes humainsensemencés sur les différents biomatériaux (denses ou microporeux) ont été implantés comme décrit précédemment, après 1 heure de contact.

Comme précédemment, les animaux ont été anesthésiés par un mélange d'air et d'isoflurane (2,5%), et les zones d'intervention désinfectées avec une solution iodée. Les animaux recevaient une injection de buprémorphine (buprécare, 60µl/kg). Une incision de 5 mm a été réalisée au niveau de la peau et du muscle para-tibial à l'aide d'un scalpel. Ensuite, les fibres musculaires ont été écartées afin de créer une poche dans laquelle les particules chargées ou non en cellules ont été introduites. La peau a été ensuite suturée à l'aide d'un fil non résorbable.

Ces expériences ont été conduites chez la souris nude afin de permettre l'implantation de cellules humaines. Les animaux ont été euthanasiés après 1, 2, 4 et 8 semaines, sous anesthésie générale par dislocation cervicale.

Afin d'évaluer l'implication des ostéoclastes dans la formation osseuse, les implantations ont été répétées chez la souris nude recevant une injection sous-cutanée d'anticorps anti-RANK-L (50µg, 2 fois par semaine). Cet anticorps est connu pour inhiber drastiquement la formation des cellules multinucléées TRAP positives [95]. Les injections ont débuté 3 jours avant l'implantation et ont été poursuivies pendant 8 semaines.

E. Analyses histologiques

Après l'euthanasie des animaux, les échantillons sont partagés en 2. Une partie est fixée dans 10 volumes de formol 4% et l'autre permet l'analyse de l'expression génique. Après 48h de fixation, les échantillons sont décalcifiés dans une solution de PBS contenant 0.5% de paraformaldéhyde (PFA), 4.13% d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), et chauffée à 46°C. L'absence de minéralisation dans les échantillons est validée par une radiographie à

rayons X. Les échantillons sont ensuite inclus dans de la paraffine chauffée à 56°C. Une fois refroidis, des coupes de 3µm d'épaisseur sont réalisées.

1) Analyses histomorphométriques

Les coupes ont été colorées au trichrome de Masson. Cette coloration permet d'observer la présence des fibres de collagène lâches ou denses (intensité de vert), les cytoplasmes (rouge brique), les particules de BCP (en gris car décalcifié), les noyaux cellulaires (noir), les hématies (orange). Pour cela, les lames ont été déparaffinées et colorées par des solutions d'hématoxyline de Groat, de Fuschine acide-Ponceau, de vert lumière et d'orange G molybdique. Par la suite, les lames ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage à base de xylène et toluène (Pertex), avant d'être observées à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.0 Hamamatsu.

Les coupes ont été aussi colorées par une coloration de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP). Cette enzyme est hautement exprimée par les ostéoclastes. Ce marquage a été réalisé selon le kit commercial (acid phosphatase leukocyte staining kit, Sigma) selon les instructions du fabricant. Pour cela, les lames ont été déparaffinées par un gradient d'alcool de 70% à 100%. Les lames ont été ensuite incubées pendant 90 minutes à 37°C dans une solution tampon d'acétate de sodium (0.1M, pH5.2) contenant du Fast Red TR salt (3.9 mM), naphthol AS-TR phosphate disodium salt (2.3 mM), N-N diméthylformamide (68 µM), et de l'acide L(+)-tartaric (100 mM). Par la suite, les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer et montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage aqueux avant d'être observées au scanner de lames.

2) Analyses immunohistologiques

Les coupes ont été aussi utilisées pour réaliser des marquages immunohistochimiques. Les lames ont été marquées par les anticorps anti-F4/80 (MCA4976, rat anti souris, 1/200e, Serotec), anti-iNOS (ab15323, lapin anti souris, 1/100e, Abcam), anti-CD206 (ab644693, lapin anti souris, 1/1000e, Abcam), CD68 (MCA1815T, souris anti-humain, 1/100e, Abd Serotex). Pour cela, les lames ont été déparaffinées et chauffées dans une solution de citrate (1X pH6.0, Microm Microtech) pendant 20 minutes à 95°C. Les lames ont été rincées dans une solution de PBS. Après l'inhibition des peroxydases endogènes dans une solution d'H₂O₂ à 3%, un rinçage au PBS, les coupes ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C dans une solution de blocage contenant de l'albumine et du sérum. Puis les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire dilué en solution de blocage. Après un lavage, les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire. Le système a été amplifié par le couplage biotine / streptavidine / peroxydase de raifort (HRP). Enfin, le marquage a été révélé par une solution

DAB (Dako) et les noyaux contre-colorés avec une solution d'hématoxyline de Mayer. Par la suite, les lames ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage Pertex, avant d'être observées par le scanner de lames.

F. Analyse d'expression génique

1) Extraction des ARN

La méthode d'extraction au TRI[®]-Reagent (Sigma) a été réalisée selon les instructions du fabricant. Brièvement, au moment de l'euthanasie, les échantillons ont été plongés dans de l'azote liquide et congelés au -80°C avant traitement. Les échantillons ont été décongelés par l'ajout de 1 mL de TRI[®]-Reagent. Les cellules ont ensuite été lysées mécaniquement et la solution homogénéisée par un vigoureux vortex. Par la suite, la phase contenant les ARN a été séparée de la phase contenant les protéines par une centrifugation à 10 000g pendant 15 min à 4°C en présence de chloroforme. La phase supérieure contenant les ARN a été récupérée et précipitée par l'ajout d'isopropanol. Une nouvelle centrifugation a été effectuée. Les ARN contenus dans le culot, ont été ensuite rincés à l'éthanol 75% puis séchés à l'air et repris dans 20µL d'eau stérile avant d'être quantifiés à l'aide du nanodrop (absorbance 230/260 et 260/280). Les ARN sont ensuite conservés à -20°C.

2) Rétrotranscription

Cette étape doit permettre de convertir les ARN extraits en ADN complémentaires (ADNc). La rétrotranscription est effectuée par une enzyme, la Maxima H Minus selon le kit de synthèse (Thermo Scientific). Pour cela, 1µg d'ARN sont ajoutés à une solution contenant 50pmol d'héxamères aléatoires (random primers), un excès de dNTP et de l'eau stérile sans RNase pour un volume final de 20µl. Cette préparation a été chauffée 5 minutes à 65°C puis déposée sur glace. L'enzyme a été ensuite ajoutée au mix et incubée à 50°C pendant 1 heure et à 85°C pendant 5 minutes. Les tubes sont ensuite conservés à -20°C avant de réaliser la PCR.

3) PCR en temps réel

Lors de nos travaux, la PCR a été réalisée en présence du fluorochrome SYBRgreen. Le mix réalisé contenait dans chaque puits 2µl du produit de RT (10ng d'ADNc) et 8µl d'un mélange réactionnel : amorces sens et antisens à 5µM spécifiques du gène d'intérêt, un excès de dNTP, l'enzyme et la sonde iQ[™] SYBR Green Supermix (Biorad). L'amplification PCR a été réalisée pendant 39 cycles de 30 secondes à 98°C, 15 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C. L'expression des gènes cibles a été normalisée au contrôle endogène : la protéine

ribosomale 60S L19. La méthode de calcul, du niveau d'expression génique relative, utilisée était basée sur le $2^{-\Delta Ct}$.

G. Cytométrie en flux

Cette technique permet notamment d'étudier l'expression protéique à la surface des cellules.

Dans cette étude, les cellules des ganglions lymphatiques des animaux ont été isolées. Pour cela, les organes ont été déposés dans 5 mL de milieu à l'euthanasie. Les cellules ont été extraites par dilacération entre deux lames de verre. Les globules rouges ont été ensuite éliminés par centrifugation à 1600 rpm pendant 5 min et ajout d'eau stérile sur le culot. Les cellules ont été ensuite filtrées sur un tamis de 70 μ m. Les cellules sont resuspendues à raison de 400 000 cellules/mL et marquées par l'anticorps anti-CD11b (1/10, conjugué phyco-érythrine, BD). Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées en PBS, centrifugées et resuspendues en PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux (FC500, Beckman Coulter) avec une excitation à 488nm et une émission à 575nm.

ARTICLE 1 :

BONE TISSUE FORMATION

WITH HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

AND BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS :

THE LOCAL IMPLICATION OF OSTEOCLASTS AND MACROPHAGES

Article 1 : Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages

Gamblin Anne Laure^{1,2}, Brennan Meadhbh^{1,2}, Renaud Audrey^{1,2}, Yagita H³, Lézot Frédéric^{1,2,4}, Heymann Dominique^{1,2,4,5}, Trichet Valérie^{1,2,4}, Layrolle Pierre^{1,2*}

1 INSERM, UMR957, Nantes,

2 Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes,

3 Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421

4 Equipe LIGUE Nationale Contre le Cancer 2012, Nantes, France

5 CHU, Hôtel Dieu, Nantes

Accepted by Biomaterials in august 2014

Abstract

Human mesenchymal stem cells (hMSC) have immunomodulative properties and, associated with calcium phosphate (CaP) ceramics, induce bone tissue repair. However, the mechanisms of osteoinduction by hMSC with CaP are not clearly established, in particular the role of osteoclasts and macrophages. Biphasic calcium phosphate (BCP) particles were implanted with or without hMSC in the paratibial muscles of nude mice. hMSC increased osteoblastic gene expression at 1 week, the presence of macrophages at 2 and 4 weeks, osteoclastogenesis at 4 and 8 weeks, and osteogenesis at 4 and 8 weeks. hMSC disappeared from the implantation site after 2 weeks, indicating that hMSC were inducers rather than effectors of bone formation. Induced blockage of osteoclastogenesis by anti-Rankl treatment significantly impaired bone formation, revealing the pivotal role of osteoclasts in bone formation. In summary, hMSC positively influence the foreign body reaction by attracting circulating haematopoietic stem cells and inducing their differentiation into macrophages M1 and osteoclasts, thus favouring bone formation.

Key words: osteoinduction, foreign body reaction, osteoclasts, macrophages, mAb anti-RANKL

1. Introduction

Autologous bone grafts are considered the gold standard in bone regeneration because of their osteogenicity, osteoinductivity, osteoconduction and osteointegration characteristics [63]. However, the bone harvesting procedure requires a second surgical site, at which complications have been reported, and the quantity of bone available for grafting is limited.

Synthetic bone substitutes, particularly calcium phosphate (CaP) ceramics, have been proven safe and biocompatible and are widely used to fill bone defects in clinical indications such as dental, maxillofacial and orthopaedic augmentation [96,97]. Despite having a similar chemical composition to bone mineral [63] and possessing osteoconductive properties, CaP ceramics lack the osteogenicity needed to support bone healing in critical size defects [63] thus limiting their clinical use to small bone defects where osteoconduction is sufficient. The use of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) in unison with synthetic biomaterial scaffolds may overcome the challenges of autologous bone grafting for the regeneration of large defects. Human MSC (hMSC) are easily isolated, expanded in culture and have the ability to differentiate into multiple lineages such as osteoblasts, chondrocytes and adipocytes [14]. *In vitro*, hMSC cultured on CaP differentiated into osteoblasts even without osteogenic supplements [63] and *in vivo* bone formation is achieved by the use of hMSC with ceramic scaffolds in ectopic sites [98] and critical sized defects [99]. In addition to their regenerative properties, hMSC are also known to have unique immunoregulatory properties [99,100]. It has been demonstrated that transplanted hMSC promote wound healing by recruitment of host MSC to the wound site [101] and Song and colleagues elegantly showed the homing of bone marrow MSC to ectopic sites for bone formation by using a sex-mismatched dog model [102].

An inflammatory reaction is expected following implantation of a biomaterial such as CaP due to the host response to a foreign body. During the innate inflammatory reaction, monocytes which circulate in the blood become tissue macrophages [103]. There is evidence that MSC can regulate the macrophage M1/M2 balance to the M2, IL-10 producing anti-inflammatory phenotype [104], by secreting some M2 inducers such as interleukine-4 (IL-4), IL-13 [104], IL-6 [105], and prostaglandin E2 [106]. Bone is essential for a functioning immune system since immune cells originate in the bone marrow; however the significance of immune cells to bone tissue formation is less understood. Nonetheless, disordered bone formation occurs in autoimmune diseases and recently it was shown that ablation of

macrophages inhibits intramembranous bone healing [107]. The contribution of macrophages to tissue engineered bone formation is unclear however.

While osteoclast activity is generally associated with bone resorption, it has been demonstrated *in vitro* that osteoclasts secrete mediators which induce the migration and osteogenic differentiation of MSC [108]. In addition, the Wnt/BMP signalling pathway and sphingosine-1-phosphate cytokines, secreted by osteoclasts, seem to be implicated in osteoblast precursor recruitment [109]. Furthermore, osteoclast ablation was found to inhibit ectopic bone formation by β -TCP [110]. However, the influence of transplanted MSC on osteoclast activity during *in vivo* bone formation is unknown.

In this study, the hypothesis that transplanted hMSC, associated with BCP granules, can mobilize circulating monocytes thereby favouring bone formation is tested. Specifically, we investigated the interactions of transplanted hMSC, macrophages and osteoclasts in ectopic ossification in nude mice. To further elucidate the contribution of osteoclasts to bone formation, we used an anti-mouse RANKL antibody depleting osteoclast in mice [95].

2. Materials and methods

2.1. Biomaterials

Micro-porous biphasic calcium phosphate (BCP) granules of 0.5-1mm in size and composed of HA/ β -TCP in a ratio of 20/80 in weight were used as received by the supplier (MBCP+®, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). Briefly, BCP granules were prepared by mixing calcium deficient apatite with organic pore makers, followed by compaction and sintering at 1050 °C. The overall porosity (% vol) was $75 \pm 5\%$, with a pore size distribution of 70% (0-10 μ M), 20% (10-100 μ M) and 10% (100-300 μ M). Aliquots of 40 mg of BCP granules were prepared in Eppendorf centrifuge tubes sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min.

2.2. hMSC isolation and culture

The human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSC) were kindly provided by Prof. Markus Rojewski, Institute for Clinical Transfusion Medicine, Ulm, Germany. After receiving informed consent from adult donors, a bone marrow aspiration was performed under local anaesthesia by haematologists. The cells were seeded at low density on treated culture polystyrene flasks (Corning) and cultured in α -modified Eagle's medium (α MEM, LONZA), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Lonza), 100 UI/ml penicillin, 100 μ g/ml

streptomycin. hMSC were isolated by plastic adherence, amplified in culture until passage 4 in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. hMSC were characterized by flow cytometry as being positive for CD73, CD90, CD105 and negative for CD45. Multipotency was demonstrated by culturing cells in adipogenic, chondrocytic and osteogenic conditions, as previously described [111]. For the preparation of cell-loaded implants, 1.4x10⁶ viable hMSC suspended in 70µL PBS were added to 40 mg sterile BCP particles. The average time between cell seeding and surgery was approximately 1 hour.

2.3. *In vivo* experimental design

All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community Guidelines (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. An animal experimentation protocol was prepared, submitted and approved by the local Ethic Committee (CEEA.2012.27).

In order to evaluate the influence of transplanted hMSC on bone formation, *Adult nude NMRI Nu/Nu* female mice (4 weeks old, body weight 20 g) were purchased from a professional stock breeder (Janvier Labs, France). The nude mice were kept in Hepa filtered closets with water and food *ad libitum* and were quarantined for a minimum of 10 days prior to surgery. The mice were randomly and equally divided into 2 groups: BCP particles alone (40 mg) and BCP + hMSC (40 mg and 1.4x10⁶ viable cells) that were bilaterally implanted in paratibial muscles. Five mice from each treatment group (n=5) were followed for 1, 2, 4 or 8 weeks after surgery. Animals were placed under general anaesthesia by inhalation of isoflurane (2.5% Flucka, 1L/min) and an intramuscular injection of the analgesic Buprenorphine (Buprecare 60µL/kg, Axience) was performed 30 min before surgery. A skin incision of 0.5 cm was made for exposing the muscle, and fibres were taken away to create a pocket where BCP granules were inserted. Skin incisions were closed with sutures (Filapeau 4/0, Peters). The mice were euthanized under general anaesthesia by cervical dislocation.

To determine the impact of osteoclastogenesis on bone formation initiated by hMSC, 8 weeks experiments were reproduced in nude mice which received injections of mAb anti RANKL. RANKL is a key factor for osteoclast differentiation and activation. Anti RANKL is known to drastically inhibit the formation of TRAP positive multinucleated cells *in vitro* and *in vivo* [95]. *Adult nude NMRI Nu/Nu* female mice (n=4) were implanted with BCP alone (40 mg on left leg) and BCP+ hMSC (40 mg and 1.4x10⁶ viable cells, on right leg) and treated with a

subcutaneous injection (50 µg dose) of antibody anti-mouse RANKL, kindly provided by Prof. Hideo Yagita, Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, three days before implantation. This same injection regime was repeated twice a week and animals were sacrificed after 8 weeks under general anaesthesia by cervical dislocation. Implants were sectioned after euthanasia to perform histology and RNA extraction.

2.4. Histological analysis

The muscles were excised, fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in a PBS solution with 0.5% paraformaldehyde 4.13% EDTA in a microwave decalcifying automat (KOS Histostation) at 46°C. Samples were then embedded in paraffin and 3 µM thick sections were cut. Three sections through each implant were attained for histological analysis. The sections were stained with Masson's Trichrome and qualitative/quantitative histological evaluations of soft-tissue in-growth and bone formation were performed. Masson's trichrome technique combines hematoxylin for cell nuclei (blue/black), fuchsin for cytoplasm, muscle and erythrocytes (red) and light green solution for collagen (green). The quantity of new bone was measured in separate sections with the software ImageJ. The bone formation was evaluated according to:

Newly formed bone = (bone surface) *100 / [(total implant surface) - (BCP granules surface)]

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) is highly expressed by osteoclasts and therefore can be used to stain these cells in histological sections. The sections were stained using a commercial TRAP staining kit (Acid Phosphatase Leukocyte Staining Kit, Sigma) following the manufacturer's instructions. Briefly, the staining solution was prepared with Fast Red TR salt (3.9 mM), naphthol AS-TR phosphate disodium salt (2.3 mM), N-N dimethylformamide (68 µM), and L(+)-tartaric acid (100 mM) all diluted in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.2). Deparaffinised sections were incubated in the solution for 90 min at 37°C and then counterstained with Mayer's hematoxylin. TRAP-positive stained cells appeared red. Qualitative/quantitative histological evaluations of osteoclasts were then performed.

2.5. *In situ* hybridization

In situ hybridization using the human-specific repetitive Alu sequence, which comprises approximately 5% of the total human genome was performed for identification of human

cells. Sections were deparaffinized and rehydrated in graded series of ethanol and washed with tris buffered saline (TBS) tween 0.05 % pH 7.6 three times for 5 min each under gently agitation. Slides were treated with 3 % H₂O₂ for 15 min at room temperature (RT) to block endogenous peroxidase activity, followed by three washes with TBS tween 0.05 %. Sections were then treated with 10 µg/mL proteinase K (P2308, Sigma Aldrich, France) for 10 min at 37°C. After a further three washes for 5 min each in TBS tween 0.05 %, sections were treated with 0.25 % acetic acid in 0.1 M triethanolamine (TEA) pH 8.0 for 20 min at RT under agitation. Pre-hybridization was performed for 3 h at 56°C in a hybridization buffer containing 4 X SSC (S6639, Sigma Aldrich France), 50 % deionized formamide, 1 X Denhardt's solution, 5 % dextran sulfate and 100 µg/mL salmon sperm DNA and molecular grade H₂O. Hybridization buffer was replaced by fresh hybridization buffer containing 70 nM DIG-labeled human locked nucleic acid (LNA) Alu probe 5DigN/5'-TCTCGATCTCCTGACCTCATGA-3'/3DigN (Exiqon, Vedbaek, Denmark) and then target DNA and the probe were denatured for 5 min at 95°C. Hybridization was carried out for 40 h at 56°C in a wet chamber. Sections were washed twice in 2 X SSC, then twice in 0.5 X SSC at 56°C for 10 min each time, followed by three washes in TBS tween 0.05 %. Finally, the hybridized probe was detected by immunohistochemistry using biotin-SP-conjugated IgG fraction monoclonal mouse anti-digoxin (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) diluted 1/200 in PBS for 45 min at 37°C. After three washes in TBS tween 0.05 % at RT, streptaperoxidase was added (1/200 in TBS tween 0.05 %) for 45 min at 37°C before diaminobenzidine (DAB) substrate addition (Dako). Sections were counterstained with Gill-2 hematoxylin (Thermo Shandon Ltd, Runcorn, UK) dehydrated and mounted using Pertex (HistoLab Products AB, Sweden).

2.6. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on deparaffinised and rehydrated sections with specific primary antibodies: CD146 antibody (ab75769, rabbit anti mouse, 1/200, Abcam), F4/80 antibody (MCA4976, rat anti-mouse, 1/200, Serotec), iNOS antibody (ab15323, rabbit anti-mouse, 1/100, Abcam), CD206 antibody (ab64693, rabbit anti mouse, 1/1000, Abcam), CD68 (MCA1815T, mouse anti-human, 1/100, Abd Serotex). All sections were counterstained using Gill's hematoxylin and mounted using permanent mounting medium. Tissue staining was viewed using Nanozoomer 2.0 Hamamatsu slide scanner.

The CD146 antibody was used to detect pericytes in the histological sections. CD146, also known as Mel-CAM, MUC18, A32 antigen and S-Endo1, is a membrane glycoprotein observed in pericyte that surround the endothelial layers [112]. The F4/80 antibody was used to detect macrophages M0. The antigen, F4/80, is well expressed in macrophages M0 in most tissues of the developing and adult mouse. The iNOS antibody was utilised in this study for the detection of macrophages M1. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is an enzyme catalyzing the production of nitric oxide (NO) from L-arginine [113]. The presence of macrophages M2 was detected by the CD206 antibody. CD206, widely known as the mannose receptor (MR) or more precisely MR C type 1 (MRC1) is a type 1 transmembrane protein involved in innate immunity [114]. The CD68 antibody was used to detect macrophages M0. CD68 is a member of the lysosome-associated membrane protein (LAMP)-1 family [115]. It is a transmembrane glycoprotein highly expressed by monocytes and tissue macrophages [116].

2.7. Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Implants were sectioned after euthanasia to perform histology and RNA extraction. Thus, each half of implants were transferred into a 1 mL tube with and vigorously shaken to lyse the cells. Phase separation was performed using chloroform. RNA was recovered from the aqueous phase using isopropanol, and this was followed by alcohol precipitation steps. RNA samples (4 µg) were reverse transcribed with Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and random primers in a total volume of 20 µL. Quantitative real-time PCR was performed in the CFX96 (Bio-Rad Laboratories) with SYBR Green detection according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications involved 39 cycles of 30 s at 98°C, 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Expression of the target gene was normalized to that of the endogenous control ribosomal protein L19. The $2^{-\Delta Ct}$ (Ct: cycle threshold) method was used to calculate the relative expression levels. Gene name symbols with corresponding full names and the list of corresponding primer sequences are indicated in Table 1. The primer sequences used were specific to mouse genome to only evaluate the host cells behaviour.

Relative gene expression for osteoblastic markers, as alkaline phosphatase (*Alp*), Bone sialo protein (*Bsp*) and osteocalcin (*Oc*), for osteoclastic markers, as acid phosphatase tartrate resistant (*Trap*) have been evaluated.

2.10. Statistics

Statistical comparisons of gene target expression and histomorphometry were performed using Two-way ANOVA and Bonferroni post tests in GraphPad Prism 6.0 software. p values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Bone formation is increased by transplanted hMSC

Histological analyses showed bone tissue and bone marrow formation at 4 and 8 weeks in all implants consisting of hMSC and BCP granules (bone incidence 5 out of 5) (Figure 1A). Conversely, there was no bone tissue at 4 weeks and only small quantities of bone formation without the presence of bone marrow at 8 weeks in the BCP group without cells (Figure 1A). Quantification by histomorphometry revealed a significant increase in bone formation with BCP plus hMSC at 4 and 8 weeks, compared with BCP alone (5 and 10 fold increase respectively, $p < 0.001$, Figure 1B). Supporting these findings, there was a significant up-regulation in the expression of mouse bone markers, bone sialo protein and osteocalcin, in BCP plus hMSC at 1 week compared to BCP alone (Figure 1C). In contrast to histological bone detection that increased between 1 and 8 weeks, the gene expression of these bone markers decreased after 1 week. This apparent discrepancy may be explained by the loss of efficiency in RNA extraction from mineral tissue compared to soft tissue.

3.2. Transplanted hMSC disappear from implanted site

The presence of hMSC in the implants was evaluated by *in situ* hybridization on histological sections and by gene expression of the specific human Alu sequence. As illustrated in Figure 2A, human cells were detected at 1 and 2 weeks within the BCP plus hMSC implants, while they were not detected at 4 weeks. These results were corroborated by the relative gene expression of Alu sequence (Figure 2B) which detected human cells within BCP plus hMSC

implants at 1 and 2 weeks, but with a large decrease of activity between 1 and 2 weeks (2 fold decrease, $p < 0.001$, Figure 2B). As expected, no human cell transcription was measured in the control group without human cells. Confirming the *in situ* hybridization results, human cell transcription was not detected within the BCP plus hMSC implants at 4 and 8 weeks.

3.3. Osteoclast activity is enhanced by transplanted hMSC

Distribution of osteoclasts at the implantation site was investigated by the TRAP staining. Representative stained sections showed a large production of this resorbing enzyme around the BCP granules (Figure 3A). Histomorphometry quantification confirmed that hMSC significantly increased osteoclast activity in the implants (more than a 2 fold increase, $p < 0.001$, Figure 3B). There was an increase in the relative gene expression of the mouse osteoclast markers *Cathk* and *Trap* at 1 and 2 weeks in both the BCP group and BCP + hMSC group; however there was no difference between the two groups.

3.4. Mobilization of macrophages M0 and M1 to the implant site is enhanced by transplanted hMSC

The distribution of first innate immunological cells, macrophages M0 and M1 within the implants was detected in histological sections as illustrated in Figure 4. Macrophages M0, labelled by the antibody anti-F4/80, were distributed in fibrous tissue between the BCP granules, whereas, macrophages M1, labelled by the antibody anti-iNOS, were primarily located surrounding the BCP biomaterial (Figure 4A). Histomorphological quantification showed an increase in the mobilization of macrophages M0 and M1 to the implant site in the BCP plus hMSC group compared to BCP alone (Figure 4B). Specifically, macrophages M0 were increased by the presence of hMSC at 2 and 4 weeks and decreased thereafter, while macrophages M1 were significantly higher at 4 weeks as a consequence of hMSC.

Presence of macrophages M2 was investigated by immunohistochemistry directed against CD206 and relative gene expression of CD206, FCGR2, CD163 (data not shown). However, few positive cells were detected and no difference between the BCP alone group and the BCP plus hMSC group was found. The presence of pericytes was also investigated by immunohistochemistry directed against CD146 and relative gene expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 2. The implants were highly

vascularised but no difference could be quantified between the BCP and BCP + hMSC groups (data not shown). Moreover, CD146 and *in situ* hybridization of Alu sequence were performed on serial sections of each implant demonstrating that human cells did not colocalize in the vessel walls.

3.5. Anti-RANKL treatment induces simultaneous blockage of osteoclastogenesis and reduced bone formation

Figure 5 depicts 8 week implants in nude mice with or without anti-RANKL treatment which inhibits osteoclastogenesis. Blockage of osteoclast activity was successful with a significant decrease in TRAP staining compared to non-treated controls (Figure 5A, 5D). Interestingly, inhibition of osteoclastogenesis with anti-RANKL treatment also resulted in a dramatic reduction in bone formation (from 15% to 5%), as highlighted in Figure 5B and 5D. Supporting these results, osteoclastic and osteoblastic gene expression were quantified and showed a considerable decrease with mouse anti-RANKL antibody treatment (Figure 5E). The distribution of M0 macrophages was studied by immunohistochemistry directed against CD68 (Figure 5C). The results showed no difference in the presence of macrophages between the untreated and mAb anti-RANKL treated groups.

4. Discussion

The objective of the present study was to understand the underlying mechanisms of bone formation induced by the grafting of hMSC. To achieve this, microporous BCP granules were implanted in the paratibial muscles of nude mice with or without hMSC and the chronological events leading to osteoinduction were identified. Implantation of hMSC considerably enhanced and sped up bone formation. Human cells were not found within the implants at 4 weeks, proving their role as mediators rather than effectors of bone formation. The foreign body reaction was studied revealing that hMSC induced an early mobilization of circulating monocytes to the implantation site as the presence of macrophages and osteoclasts was significantly up-regulated, suggesting their implication in the mechanism of bone formation. To more precisely determine the contribution of osteoclasts to osteogenesis, implantations were repeated in nude mice treated with mAb anti-RANKL to deplete osteoclast formation

and activation. Ablation of osteoclastogenesis significantly impaired bone formation, proving the pivotal role of osteoclast-mediated bone formation. The implantation of hMSC with BCP ceramics in this study resulted in a 15 fold increase in bone formation compared to BCP alone. This finding is in agreement with other studies in bone defects [99] and ectopic sites [98] which show the bone-forming benefits of implanted hMSC. However, the exact mechanisms by which implanted hMSC mediate bone induction is unclear. In the past it was thought that the therapeutic effects of implanted hMSC lay in their ability to differentiate into cells of different lineages, into bone forming osteoblasts in the case of bone tissue engineering. However, in this study the implanted hMSC disappeared completely from the implantation site between 2 and 4 weeks and the newly formed bone tissue was exclusively of host origin, suggesting that the implanted hMSC facilitate but do not participate directly in the bone formation. Indeed, it has been previously demonstrated that calcium phosphate granules implanted ectopically induced the homing of MSC from the bone marrow to the site of CaP particles implantation to form ectopic bone tissue [102]. Previous studies substantiate the large scale death of implanted MSC [99,117] which is due to ischaemia [115] and lack of glucose [116] in the implant microenvironment. It has recently been shown that the viability of implanted MSC can be maintained in glucose supplemented implants [116]. Nevertheless, the maintained viability of implanted MSC was not necessary to initiate bone formation in this study.

The foreign body reaction against BCP biomaterial and hMSC was investigated in this study and it was found that BCP granules initiated a recruitment of cells of the monocyte/macrophage lineage, which was significantly potentiated by the addition of hMSC. Attraction of macrophages to β -TCP particles was previously demonstrated *in vitro*, whereby macrophages migrated towards the biomaterial by emitting cytoplasmic extensions [118]. Furthermore, interactions of poly morphonuclear neutrophils with hydroxy-apatite particles increase levels of pro-inflammatory mediators interleukin-8 (IL-8) and the matrix metalloproteinase 9 [119], a possible mechanism contributing to the mobilization of monocytes and macrophages M1 to BCP. The further significant increase in mobilization of cells of the monocyte lineage by the addition of hMSC in our study, may be explained by the secretion of monocyte chemo-attractant protein-1 by implanted MSC, which was previously described in a model of vascular tissue engineering [120].

It has been previously shown that ablated osteoclastogenesis significantly impaired bone formation by calcium phosphate implantations in ectopic sites [110]. However, the present

study is the first to investigate hMSC-mediated osteoclast activity in bone formation. Increased bone formation was found when osteoclast and macrophage M0 and M1 presence was up-regulated at the implantation site by hMSC, and when osteoclastogenesis was abrogated a significant reduction in bone formation was significantly impaired. The precise underlying mechanisms are unclear, however several *in vitro* studies shed light on possible contributing factors such as the secretion of platelet-derived growth factor by osteoclasts which induces the migration of MSC [108] and the production of oncostatin M by monocyte/macrophages and osteoclasts which strongly induces the osteogenic differentiation of MSC *in vitro* [121,122].

In the present study, in response to the implantation of BCP and hMSC, numerous macrophages M0 were observed around the particles and converted into pro-inflammatory M1. Co-implantation with human cells further enhanced this mechanism. Previous studies have shown that MSC can regulate the M1/M2 macrophage balance, favouring a shift towards the M2 anti-inflammatory phenotype [104,106,123]. This move towards the M2 phenotype has been implicated in the resolution of inflammation, tissue repair and remodelling in the heart [124] and kidney [125]. In contrast, the presence of macrophages M2 (study of 3 gene markers by PCR and 1 specific protein by immunohistochemistry), within implants with or without the addition of human cells was not observed in the current study. Therefore, macrophage M2 were shown not to be implicated in hMSC mediated ectopic bone formation, rather macrophages M1 and osteoclasts were the prominent cells implicated in the ectopic osteogenesis mechanism.

It would be interesting to study the macrophage role in bone formation, but independently of the osteoclast one. Alexander *et al.* have concluded that osteal macrophages promoted bone healing by using clodronate treatment and Macrophage Fas-Induced Apoptosis (MAFIA) transgenic mice model [107]. However, clodronate treatment and conditionally depletion of macrophages in MAFIA alter the osteoclast differentiation as well as the macrophage one. Furthermore, the MAFIA mouse model is in immune-competent mice and the bone formation mechanism should be differently addressed in an immune-deficient model, as suggested by recent study [126].

In this study, the number of vascular cells within the implants was quantified and while the implants were observed to be highly vascularised, no difference between groups was

observed. This suggests that there is no direct implication of vascularised tissue in this mechanism of ectopic bone formation induced by BCP granules and hMSC.

5. Conclusion

Human MSC significantly enhanced ectopic bone formation in nude mice. They did not participate directly in osteogenesis, rather they increased the innate immune response and enabled to speed up the mobilization of monocytes to the implantation site where they differentiate into macrophages M1 and osteoclasts. Ablation of osteoclastogenesis by anti-RANKL treatment considerably impaired hMSC-mediated bone formation, highlighting the pivotal role of osteoclasts in the ectopic bone formation. In nude mice models, an up-regulation of osteoclasts and macrophages M1 at the implantation site was correlated with increased bone formation due to hMSC associated to BCP particles.

Acknowledgements

We are very grateful to the members of the European consortium REBORNE in providing the GMP grade cells used to set up the protocols, in particular to Markus Rojewski and Hubert Schrezenmeier from Ulm University. We also thank the company Biomatlante that provided the MBCP+™ granules. This work was supported by the grant (HEALTH-2009-1.4.2-241879) from the 7th Framework Programme of the European Commission REBORNE (Regenerating Bone defects using New biomedical Engineering approaches). ALG is the recipient of a PhD fellowship from the regional council of “Pays de la Loire” (France).



Table 1.

Official Symbol	Official full name; Alias	Sense primer Antisense primer
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney; Alp	CCGGATCCCTGACCAAAAAC GCCTTACCCCTCATGATGTC
<i>Bglap</i>	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein; Oc	AGACTCCGGCGCTACCTT CAAGCAGGGTTAAGCTCACA
<i>Ibsp</i>	integrin-binding sialoprotein; Bsp	CGGCATAGTTCGGAAGAGGA CCCCTCAGAATCTTCATTGTTT
<i>Acp5</i>	acid phosphatase 5, tartrate resistant; Trap	CGTCTCTGCACAGATTGCAT AAGCGCAAAACGGTAGTAAGG
<i>Ctsk</i>	cathepsin K; Cathk	GGAGGCGGCTATATGACCA GGCGTTATACATACAAACTTTCATCC
<i>Alu</i>	Alu sequence	TCTCGATCTCCTGACCTCATGA TCATGAGGTCAGGAGATCGAGA
<i>Rpl19</i>	Ribosomal protein L19	TCGTTGCCGGAAAAACAC AGGTCACCTTCTCAGGCATC

Osteogenic markers

Osteoclastic markers

Reference

Table 1. Sequences of primers used for real-time PCR analysis of mouse genes.

Figure 1.

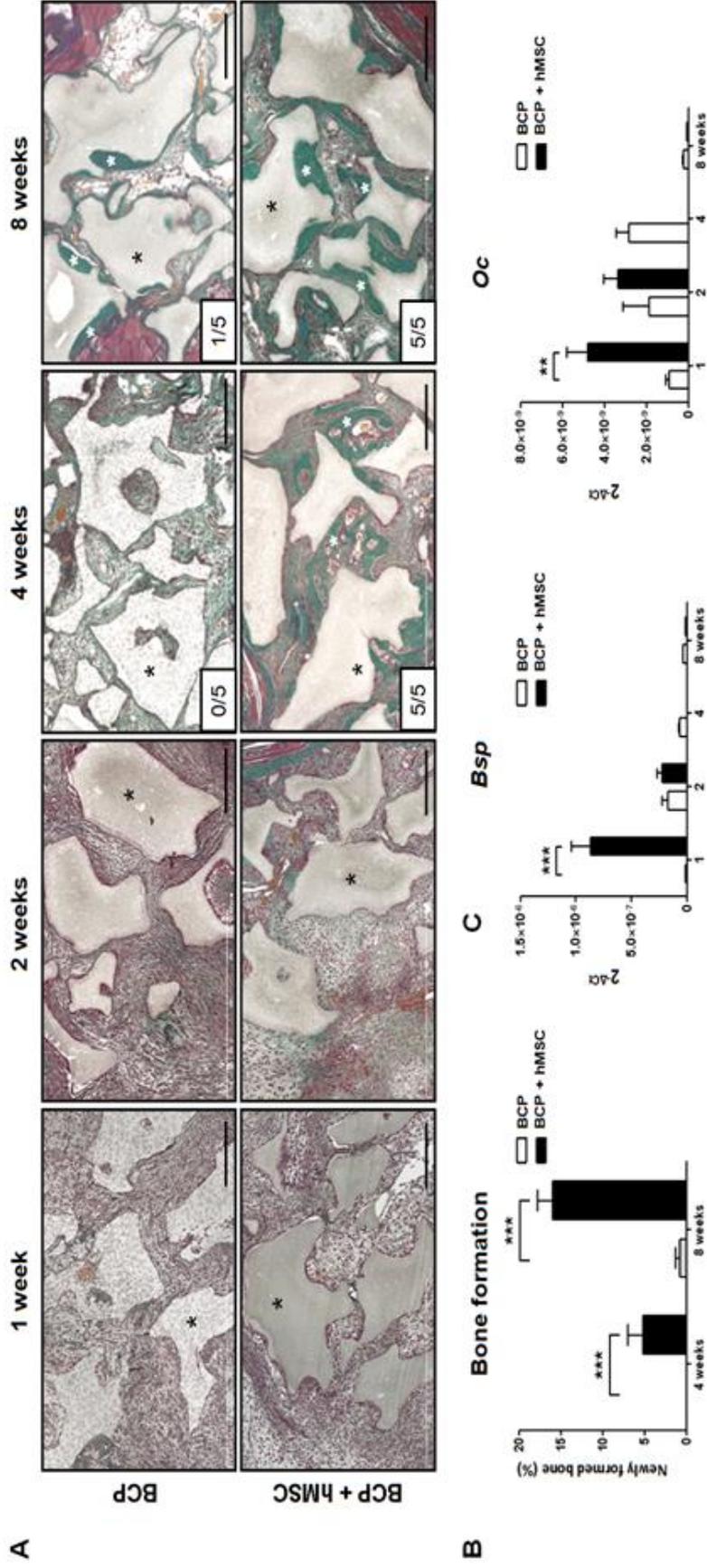


Figure 1. **Ectopic bone formation increased by BCP granules and hMSC.** (A) Representative sections stained with Masson's trichrome of BCP granules (black stars) and hMSC implanted in paratibial muscle for 1, 2, 4 and 8 weeks. Ectopic bone formation (white stars) was found in the implants at 4 and 8 weeks. Incidence of bone formation in mice is indicated in white boxes. (B) Percentages of bone formation were evaluated with ImageJ software on the available surface and showed that implantation of human cells increased significantly newly formed bone. (n=5 mice per group, measurement on 3 levels within each total implant, SED, *** p<0.001, ** p<0.01) (C) Relative gene expression of *Bsp* and *Oc* were evaluated in BCP and BCP+hMSC implants. (n=5 mice per group, SED of triplicate)

Figure 2.

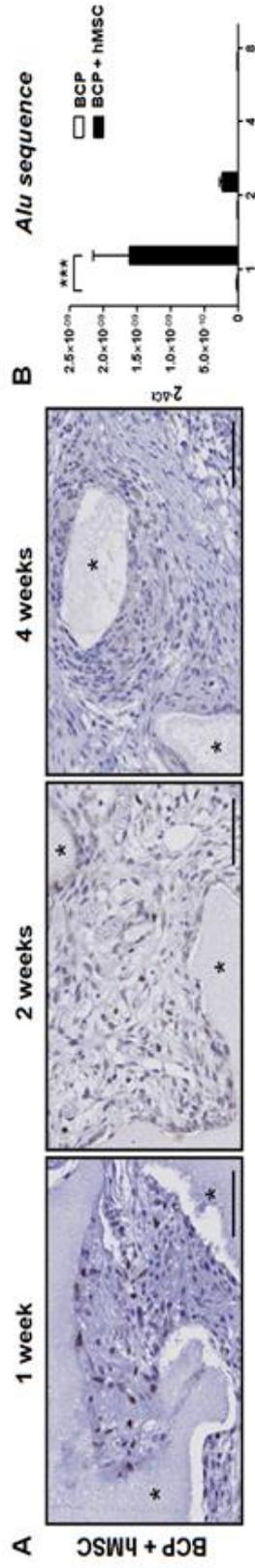


Figure 2. **Disappearance of hMSC after 2 weeks implantation** (A) Alu sequence *in situ* hybridization showed human cells were no longer present within the implants at 4 weeks (scale bar = 75μm). (B) Relative gene expression of Alu sequence decreased over time after implantation. (n=5 mice per group, SED of triplicate *** p<0.001)

Figure 3.

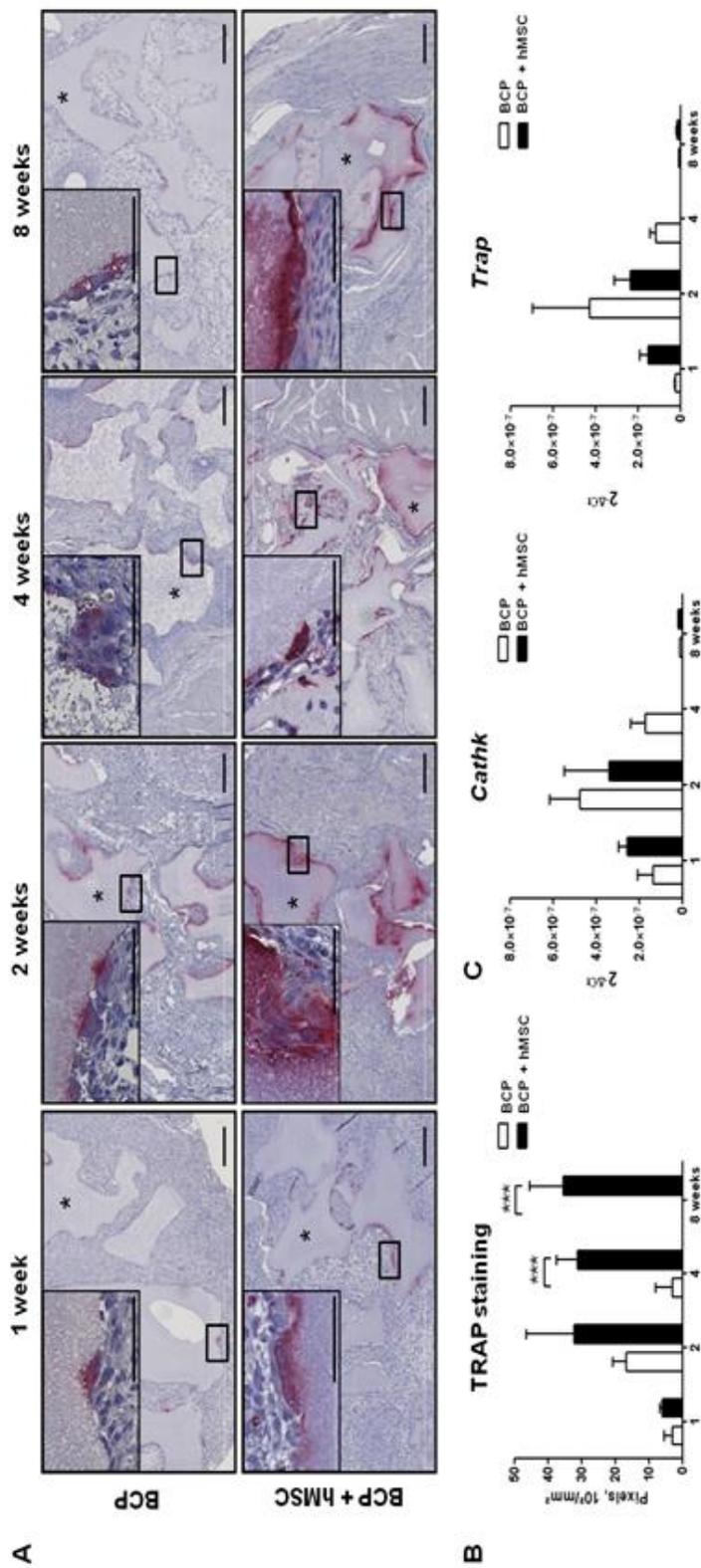


Figure 3. **Osteoclastogenesis increased by BCP granules and hMSC.** (A) Representative sections stained for osteoclast marker tartrate resistant acid phosphatase (TRAP, red) showed an increase of multinucleated TRAP positive cells in BCP plus hMSC implants compared with BCP alone implants. (scale bar = 100 μ m) (B) Percentages of TRAP staining were evaluated with ImageJ software on the available surface and showed that implantation of human cells increased significantly the number of osteoclast. (n=5 mice per group, measurement on 3 levels within each total implant, SED, *** p<0.001) (C) Relative gene expression of *Cathk* and *Trap* were evaluated in BCP and BCP+hMSC implants. (n=5 mice per group, SED of triplicate)

Figure 4.

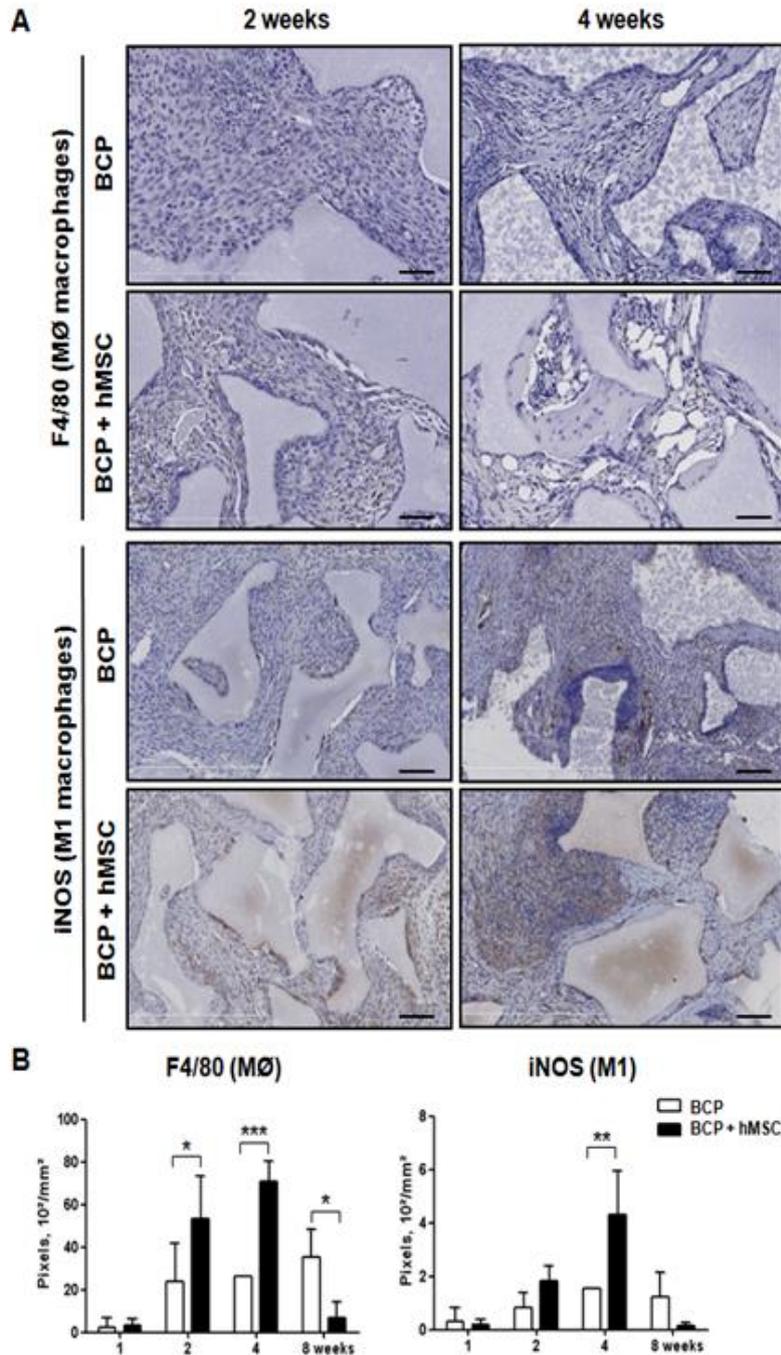


Figure 4. **Mobilization of macrophages M0 and M1 enhanced by transplanted hMSC in nude mice.** (A) F4/80 and iNOS immunohistological staining of macrophages showed an increase in mobilization of M0 and M1, respectively, within BCP plus hMSC implants compared to BCP alone (scale bar = 75µm). (B) Percentages of macrophages M0 and M1 were evaluated with ImageJ software on the available surface. (n=5 mice per group, measurement of 1mm² area on 3 levels within each implant, SED of triplicate, *p<0.05, **<0.01, ***<0.001)

Figure 5.

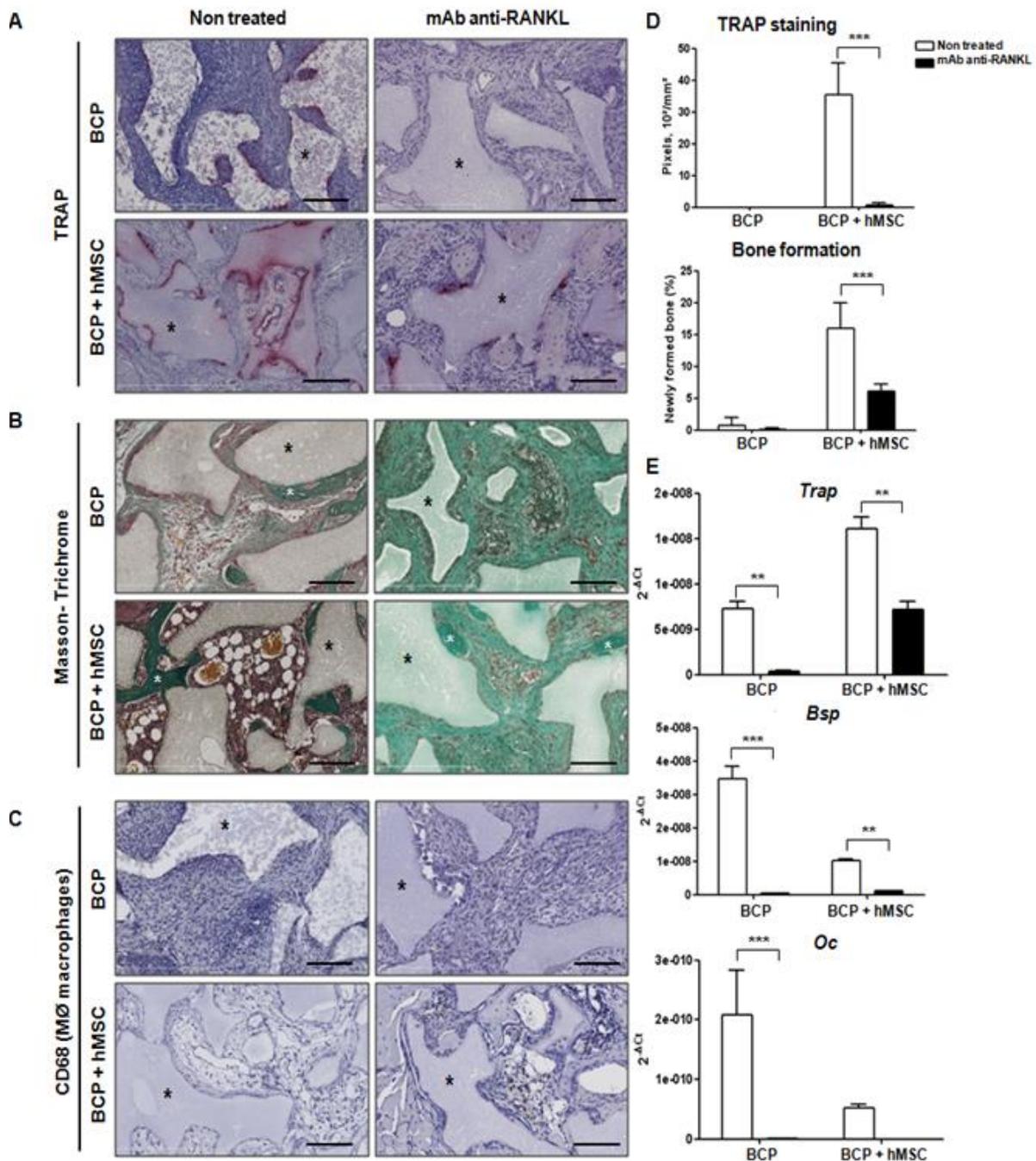


Figure 5. Ectopic osteoclastogenesis and bone formation were largely decreased with anti-RANKL treatment. (A) Representative sections stained for osteoclast marker TRAP, showed a decrease of multinucleated TRAP positive cells in anti-RANKL treated mice compared to untreated mice. (B) Representative sections stained with Masson's trichrome of BCP granules (black stars) and BCP+hMSC implanted in paratibial muscle for 8 weeks with or without anti-RANKL treatment. Results showed an important decrease of newly formed bone with mAb treatment (scale bar = 100µm). (C) Immunohistological staining of CD68 showed no difference in macrophages MØ distribution between control and anti-RANKL groups (scale bar = 100µm). (D) Percentages of bone formation and osteoclastogenesis were evaluated with ImageJ software on the available surface and showed that treatment decreased significantly newly formed bone and number of osteoclast compared to non-treated group. (E) Relative gene expression of mouse mature bone (*Bsp* and *Oc*) and osteoclast (*Trap*) markers were decreased with anti-RANKL treatment versus control mice with or without human cells (n=4 mice per group, SED of triplicate).

RÉSULTATS EXTRAITS DU BREVET :

BONE REGENERATING BIOMATERIALS WITH SELECTED CELLS
FROM PERIPHERAL BLOOD

Résultats extraits du brevet : Bone regenerating biomaterials with selected cells from peripheral blood

Cité en annexe

Comme présenté précédemment, dans la majorité des approches de thérapies cellulaires, la moelle osseuse du patient (10 à 50 ml) est aspirée au niveau de la crête iliaque sous anesthésie locale. Les cellules souches mésenchymateuses sont par la suite isolées par adhérence au plastique et amplifiées dans un milieu adapté contenant du lysat plaquettaire humain [14]. Enfin, les cellules sont mélangées aux particules de phosphate de calcium et implantées au niveau du défaut osseux.

Du fait de la très faible contenance de la moelle osseuse en CSM (0,01% à 0,001% des cellules nucléées) [127], ces cellules doivent être amplifiées en culture pendant plusieurs semaines pour obtenir une dose thérapeutique suffisante, environ 20 millions de cellules/cm³ de biomatériaux. Cette étape d'amplification doit être réalisée dans un environnement contrôlé (salles blanches, établissements pharmaceutiques) et de nombreux contrôles qualités doivent être réalisés.

Nous avons montré précédemment que l'implantation de CSM augmentait le pouvoir ostéogénique des particules de BCP. Le rôle pivot des ostéoclastes et des macrophages dans la régénération osseuse a pu être mis en évidence dans une étude chronologique.

Dans cette étude, nous nous sommes interrogés à savoir si les CSM étaient le seul type cellulaire capable d'induire une néo-formation osseuse. Pour cela, les précurseurs des macrophages et des ostéoclastes, les monocytes, ont été implantés en combinaison avec les particules de phosphate de calcium.

Les monocytes ont été isolés à partir de sang périphérique humain par une technique de tri à l'aide de billes magnétiques liées à un anticorps anti-CD14. Lors de la procédure, le nombre de cellules CD14⁺ obtenues dans un échantillon de 100 mL de sang humain est d'environ 200 millions. Les cellules ont par la suite été mises en contact pendant 1 heure avec les particules de BCP avant leur implantation en site paratibial chez la souris nude.

1. Formation osseuse induite par l'implantation de monocytes associés aux particules de BCP

Dans un premier temps, une étude comparative a été réalisée, utilisant le même nombre de CSM et de monocytes CD14⁺ en combinaison avec les particules de BCP soit 1,4x10⁶/40mg. Le matériel a été explanté après 8 semaines.

Les analyses histologiques, réalisées sur les coupes des implants colorées au trichrome de Masson, montrent une très forte formation de tissu osseux dans les groupes BCP+hCSM et BCP+hCD14⁺. Au contraire, peu de formation osseuse a été observée dans le groupe avec particules de BCP seules (Figure 1A). En effet, les incidences de formation osseuse dans les différents groupes montrent une grande reproductibilité de formation du tissu osseux dans les groupes avec cellules (BCP + CSM : 7/7 ; BCP + cellules CD14⁺ : 4/4) alors que seuls 2 échantillons sur 10 présentent de l'os dans le groupe avec particules seules. La quantification par histomorphométrie révèle une augmentation significative du tissu osseux formé dans les groupes avec cellules humaines implantées en comparaison du groupe de particules seules (Figure 1B). Cependant, la quantité d'os nouvellement formé dans le groupe BCP et cellules CD14⁺ n'est pas aussi importante que celle obtenue en présence des CSM. En effet, à 8 semaines, la quantité de tissu osseux formé lors de l'implantation du mélange BCP + CSM est 5 fois supérieure à celui formé lors de l'implantation du mélange BCP + cellules CD14⁺.

2. Optimisation de la formation osseuse induite par le mélange monocytes et particules

Afin d'optimiser la technique de régénération osseuse obtenue en présence de cellules CD14⁺ et de particules de BCP, différentes doses ont été testées et la formation osseuse induite évaluée (Figure 2). Les résultats obtenus après implantation des particules de BCP associées aux monocytes montrent que la concentration optimale pour la régénération osseuse est de $0,14 \times 10^6$ cellules CD14⁺ associées aux 40mg de particules.

La formation osseuse obtenue à partir de cette dose est identique à celle obtenue après l'implantation de $1,4 \times 10^6$ CSM associées aux particules de BCP. De façon surprenante, les doses plus importantes que $0,14 \times 10^6$ de monocytes implantés n'induisent pas l'augmentation de la formation osseuse.

D'autre part, cette étude a montré que la concentration optimale de monocytes induit une formation osseuse plus importante que le mélange de particules avec du sang humain, contenant environ $0,01 \times 10^6$ cellules CD14⁺. Ces résultats montrent donc qu'une dose inférieure à $0,14 \times 10^6$, comme celle du sang, ne permet pas la formation de tissu osseux, et qu'une dose supérieure induit le recrutement de nombreuses cellules sur le site empêchant la formation du tissu osseux.

Ces résultats montrent que l'implantation de cellules hématopoïétiques permet d'augmenter le pouvoir ostéogénique des particules de BCP et que le tri magnétique anti-CD14⁺ des cellules du sang humain permet l'optimisation de cette nouvelle technique de thérapie cellulaire jusqu'à une formation osseuse comparable à celle obtenue en présence de CSM.

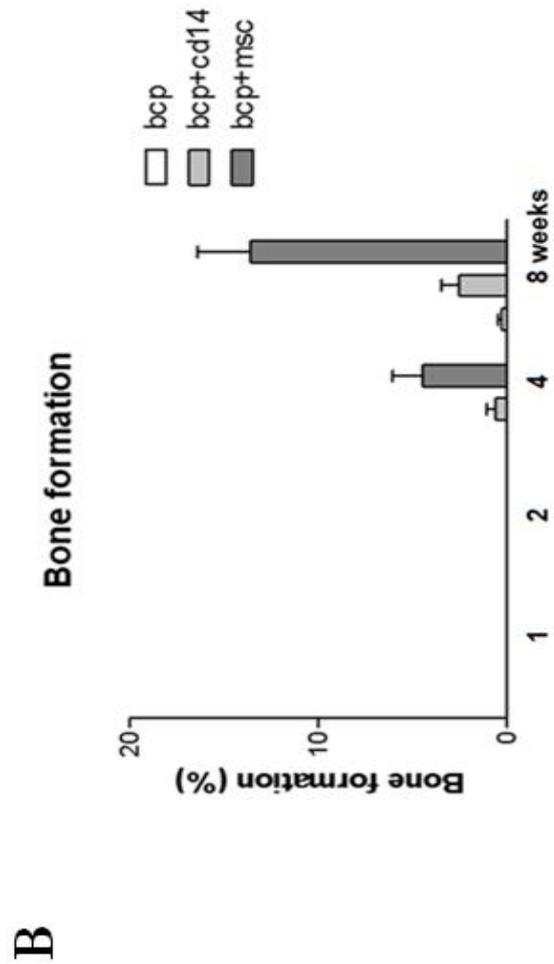
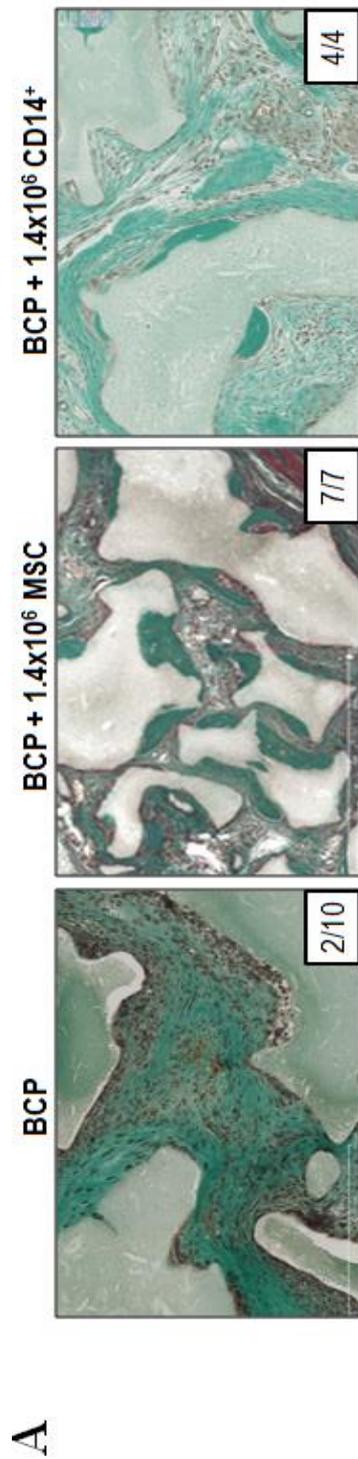
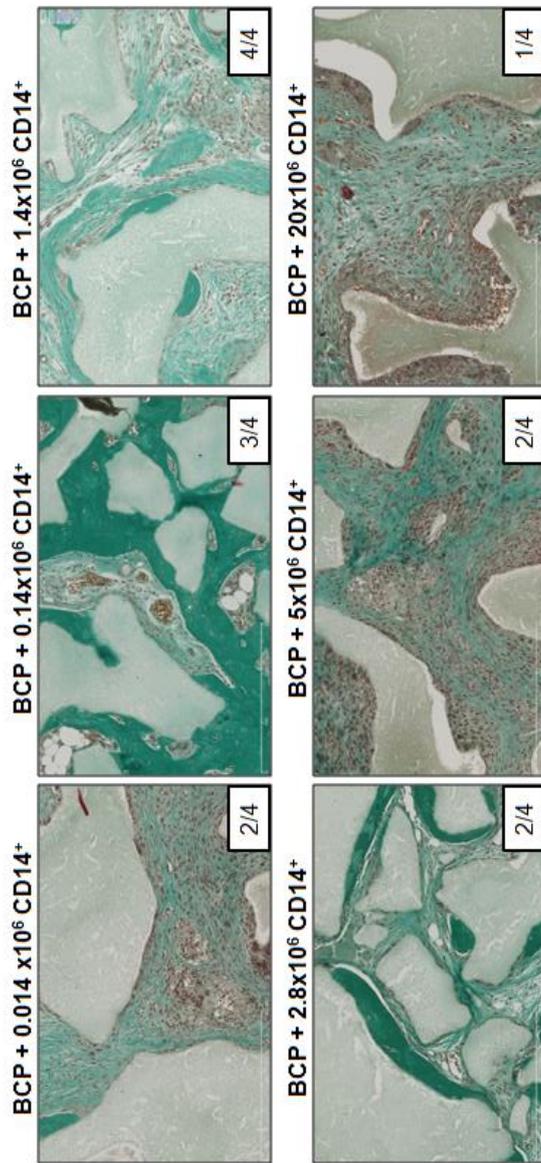
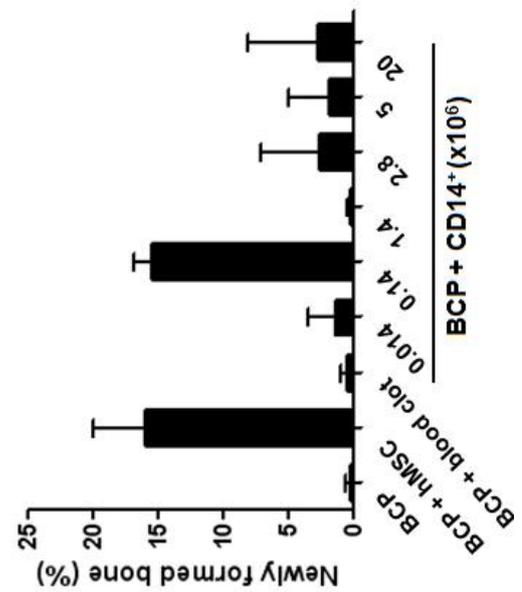


Figure 1 : Coloration au trichrome de Masson de coupes histologiques des implants intramusculaires des particules de BCP, et des mélanges BCP/CSM et BCP/monocytes après 8 semaines chez la souris Nude (A). Quantification histomorphométrique de la formation osseuse obtenue dans ces 3 groupes aux temps 4 et 8 semaines après implantation (B).



A



B

Figure 2 : Coloration au trichrome de Masson de coupes histologiques des implants intra-musculaires des particules de BCP associées à des doses croissantes de monocytes après 8 semaines d'implantation (A). Quantification histomorphométrique de la formation osseuse obtenue dans les implants intra-musculaires en présence de ces différentes doses de monocytes, de CSM et de sang périphérique (B).

DISCUSSION ET CONCLUSION DU CHAPITRE II

Dans ces études, nous avons démontré l'efficacité de 2 approches de thérapie cellulaire pour la régénération osseuse : l'utilisation de biomatériaux phosphocalciques combinés à des CSM ou à des monocytes.

La première étude visait à comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la formation osseuse induite par l'implantation de CSM avec des BCP. Nous avons ainsi mis en évidence le rôle de médiateur et non d'effecteur des CSM dans l'ostéogénèse. Ainsi, les CSM sont responsables de l'ostéoinduction mais ne participent pas directement à la formation du tissu minéralisé. Cependant, elles favorisent la migration des précurseurs myéloïdes circulant sur le site d'implantation, et leur différenciation en macrophages et ostéoclastes, suggérant le rôle pivot de ces 2 types cellulaires dans la formation osseuse.

Afin de préciser le rôle des ostéoclastes, un traitement des souris avec l'anticorps anti-RANKL a été utilisé. Cet inhibiteur de l'ostéoclastogénèse a ainsi significativement réduit la formation osseuse, prouvant l'importance des ostéoclastes dans ce mécanisme.

Ces résultats ont été discutés dans l'article 1 intitulé « Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages ».

Afin de compléter ce travail, l'implication des macrophages dans la formation osseuse ectopique a été étudiée. Les implantations ont été répétées dans un modèle transgénique de déplétion spécifique de la lignée myéloïde, monocytes et cellules dendritiques. Les souris « macrophage fas-induce apoptosis transgenic mice » (MAFIA) présentent un système d'apoptose inductible, Fas, sous la direction du promoteur « mouse colony stimulating factor 1 receptor » *Csf1r* et activé par une injection journalière intrapéritonéale du ligand AP20187 (10 mg/kg, Clonetech) [107,128]. Compte tenu du coût très important du traitement AP20187, l'implantation a été réalisée chez seulement 3 souris.

La déplétion des cellules de la lignée myéloïde a été vérifiée.

Dans un premier temps, après 3 jours de traitement, 3 souris ont été euthanasiées et les cellules des ganglions lymphatiques ont été extraites. Une cytométrie en flux a été réalisée sur ces cellules après le marquage avec un anticorps anti-CD11b. CD11b, aussi appelé intégrine alpha M (ITGAM) est une sous unité protéique exprimée à la surface de nombreux leucocytes tels que les monocytes et macrophages [129].

Les résultats montrent que le traitement AP20187 réduit de façon importante le nombre de cellules totales (plus de 60% d'inhibition : résultats non montrés). Ce traitement

réduit aussi significativement le nombre des cellules CD11b+ dans les ganglions lymphatiques (68.13% d'inhibition) (Figure 16).

D'autre part, l'expression génique de CD11b a été évaluée au niveau des poumons, chez les souris après 1 mois de traitement à l'AP20187. L'expression génique relative de CD11b réduit fortement chez les souris traitées. Ces résultats prouvent l'efficacité du traitement AP20187 à dépléter la lignée myéloïde de manière généralisée (Figure 15).

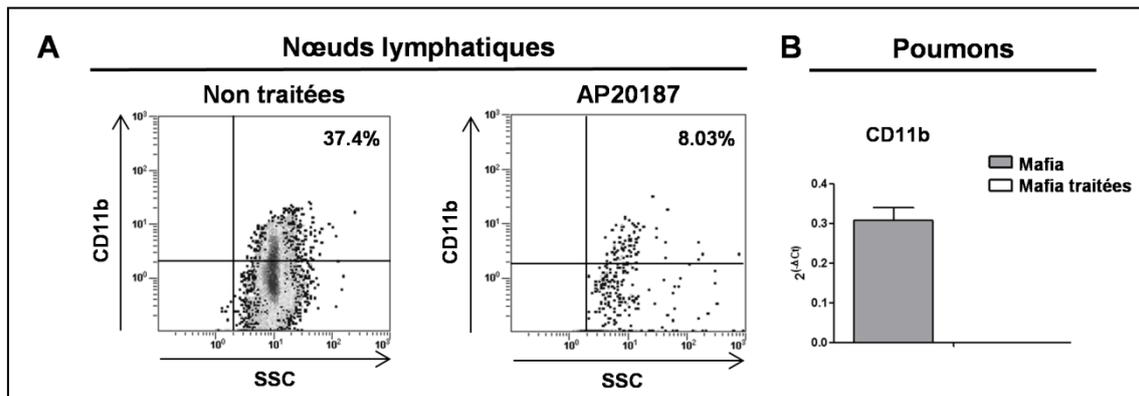


Figure 16 : Déplétion des macrophages induite par le traitement AP20187 dans les souris MAFIA. La détection par cytométrie en flux des cellules CD11b+ dans les ganglions lymphatiques montre une réduction du pourcentage de monocytes dans les souris traitées avec AP20187 (A). De la même façon, l'expression génique de CD11b diminue dans les poumons des souris traitées (B).

Par la suite, afin de vérifier la déplétion au niveau local, nous avons étudié la présence des macrophages sur le site d'implantation dans les souris traitées et non traitées.

De façon inattendue, les études de l'expression génique et protéique, réalisées sur les implants, ont montré la mobilisation d'un grand nombre de macrophages sur le site de l'implantation des particules dans le cas du traitement AP20187. Le marquage des cellules CD68 et iNOS positives sur les implants chez les souris C57/Bl6 non traitées semble identique à celui observé chez la nude dans les mêmes conditions. L'injection du traitement AP20187 semble ne pas affecter le nombre de macrophages MØ mais semble augmenter le nombre des macrophages M1 (Figure 17A). Ces résultats sont confirmés par les mesures de l'expression génique de CD11b et CD86 (Figure 17B).

Cela démontre une inefficacité du traitement à dépléter la lignée myéloïde au niveau local. D'autres études ont utilisé différents régimes d'injection du traitement afin d'induire la déplétion. En 2011, Alexander *et al.* étudient l'implication des ostéomacs (type de macrophages) dans la formation osseuse intramembranaire dans un modèle de défaut osseux chez les MAFIA. Dans cette étude, le ligand AP20187 est injecté directement dans le défaut et induit une déplétion locale des macrophages F4/80+ et de la régénération osseuse [107]. De la même façon, Cho *et al.* ont montré en 2013 qu'au cours de l'administration du

ligand AP20187, les taux de TRAP5b et P1NP, d'importants marqueurs de l'ostéoclastogénèse et de la formation osseuse, variaient. Les différences entre les groupes traités et non traités s'estompent entre 2 et 6 semaines d'injection. Cependant, leur étude montre la déplétion des cellules myéloïdes ainsi qu'une diminution de la formation osseuse à 6 semaines.

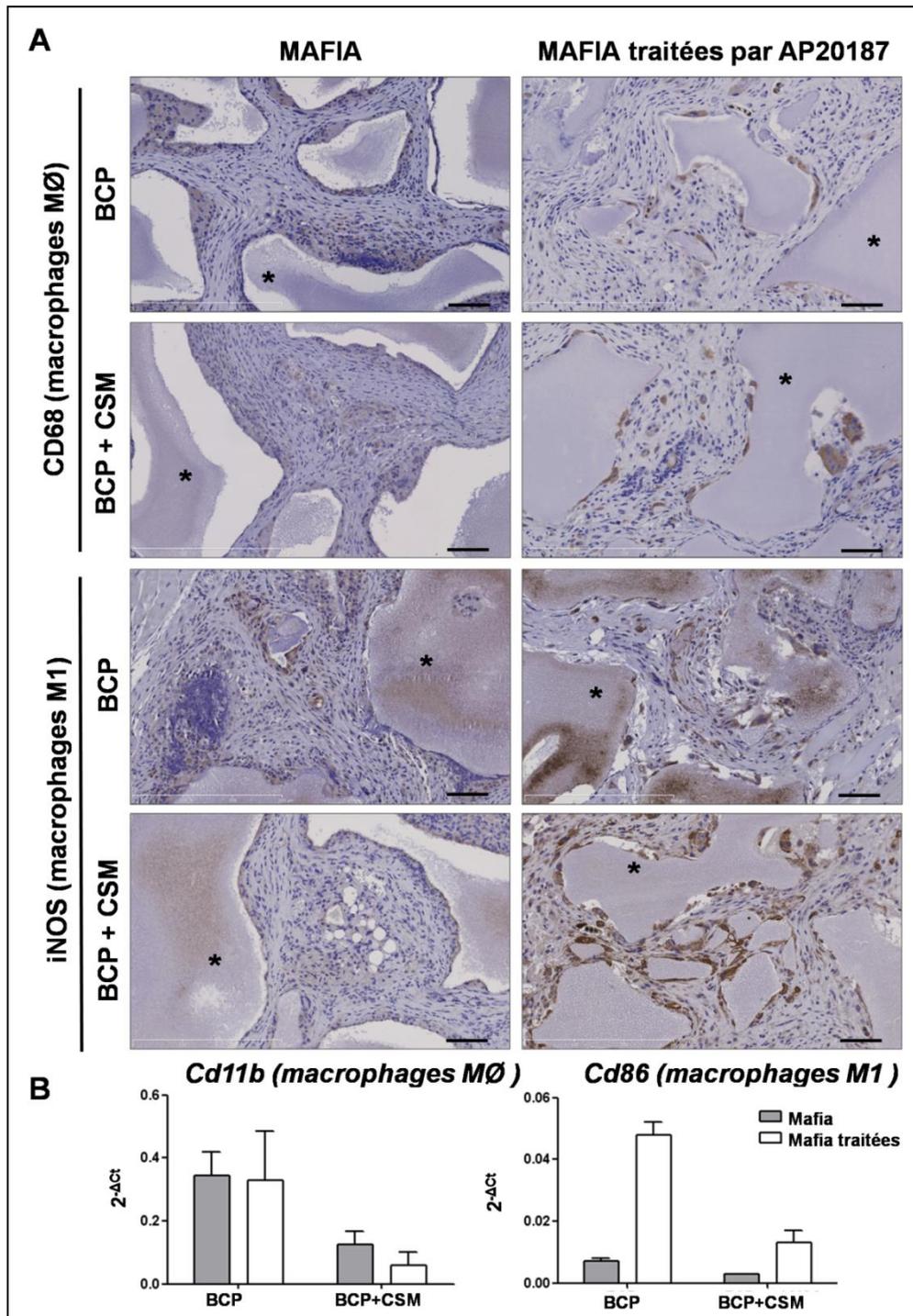


Figure 17 : Malgré la déplétion systémique de la lignée myéloïde, une forte mobilisation des macrophages MØ et M1 est observée sur le site de l'implantation. L'observation des cellules CD68+ et iNOS+ par marquage immunohistologique (marron) sur des coupes représentatives de l'implant (A), et la mesure de l'expression génique relative de marqueurs spécifiques des macrophages CD11b et CD86 (B) montrent une augmentation significative de la mobilisation macrophagique dans les souris traitées.

Malgré l'absence de déplétion constatée chez les souris traitées, les formations d'ostéoclastes et de tissu osseux ont été étudiées dans les implants. On n'observe aucune ostéoclastogénèse et aucune formation osseuse dans les souris C57/Bl6 non traitées (Figure 18). Au contraire, dans les souris traitées à l'AP20187, de nombreuses cellules sont marquées par la coloration TRAP (Figure 17A). L'expression génique relative des gènes ostéoclastiques tels que *Trap* et *Cathk*, est augmentée dans les souris traitées (Figure 18B). De la même façon, la formation osseuse est augmentée par le traitement. Tous les animaux traités présentent une légère ostéogénèse (Figure 18C) et une augmentation de l'expression génique des marqueurs ostéoblastique, *Alp* et *Bsp* (Figure 18D).

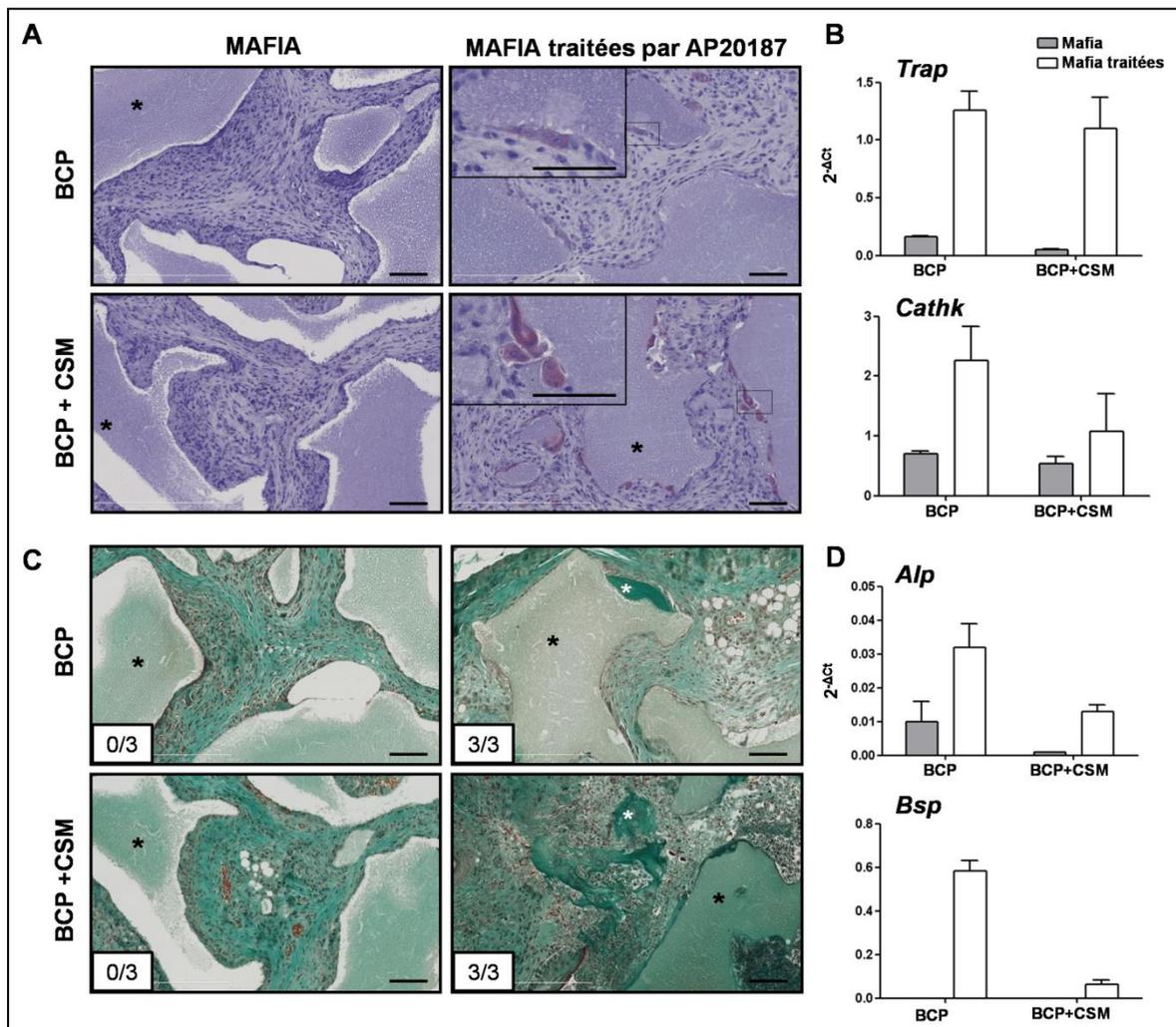


Figure 18 : La déplétion de la lignée myéloïde par le traitement AP20187 induit l'augmentation de l'ostéoclastogénèse et l'apparition de tissu osseux (étoiles blanches) entre les particules (étoiles noires) implantées. Les colorations au TRAP (A) et au trichrome de Masson (C) de coupes représentatives montrent la formation d'ostéoclastes et d'une matrice ostéoïde condensée. De la même façon, l'expression génique relative des gènes ostéoclastiques (B) et ostéogéniques (D) augmente dans les souris traitées.

Ces résultats obtenus chez la souris MAFA sont intéressants car reproduisant les observations obtenues chez la souris Nude. Cependant, ce modèle présente plusieurs limites :

- Comme dit précédemment, le **nombre d'animaux** (n=3) utilisé dans la manipulation a été réduit du fait du coût très important de la molécule AP20187 (4000 euros pour les 3 animaux, à ajouter aux 3000 euros que coûtent les souris). Les résultats sont donc difficilement interprétables et ne peuvent être conclus statistiquement.

- D'autre part, les résultats obtenus avec cette **lignée transgénique compétente** sont difficilement comparables à ceux obtenus chez la **souris Nude**. En effet, les souris Nude sont des souris mutantes qui présentent une détérioration voire une absence de thymus, induisant un défaut de la maturation des lymphocytes T [130].

De nombreuses études montrent que le système immunitaire peut intervenir dans la formation osseuse. En effet, il est connu que l'absence de lymphocytes T, chez les souris Nude [126] et Rag1(-/-) [131], est essentielle à la formation osseuse induite par les CSM. Ainsi, chez les souris compétentes, la reconnaissance des CSM par le système immunitaire bloquerait le mécanisme de formation osseuse mis en évidence dans l'article 1.

Dans notre modèle, l'injection du ligand AP20187 induit une déplétion systémique de la lignée myéloïde : monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Or ces dernières sont connues pour leur implication dans l'activation des lymphocytes T [132]. En effet, dans le cas d'une réponse immunitaire, les cellules dendritiques présentant l'antigène, migrent des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques, où elles interagissent avec les lymphocytes T primitifs contribuant à leur prolifération et leur différenciation, par la sécrétion de diverses chemokines, « EBI1 ligand chemokine », « Thymus and activation-regulated chemokine » and « macrophage-derived chemokine ».

- Enfin, le ligand AP20187 se fixant sur le récepteur CSFR-1, induit la **déplétion de toute la lignée myéloïde**, soit les précurseurs monocytaires, les macrophages mais aussi les ostéoclastes. Cette étude ne permet donc pas de discriminer l'implication des macrophages de celle des ostéoclastes dans le mécanisme de formation osseuse.

La deuxième étude présentée dans ce chapitre traite de la formation osseuse induite par l'association de particules de phosphate de calcium et de monocytes humains chez la souris nude.

Les essais cliniques du projet Reborne tendent à prouver l'efficacité de la thérapie cellulaire BCP et CSM dans la régénération osseuse. Dans cet essai, la moelle osseuse du patient est extraite en amont de son opération de chirurgie, au court d'une opération sous anesthésie locale. Puis les cellules de la moelle osseuse sont mises en culture pendant 3 semaines afin de sélectionner les CSM qui seront amplifiées et mises en contact avec les particules. Ces différentes étapes sont risquées et coûteuses (environ 20 000 euros/patient). Nous avons démontré qu'un autre type cellulaire, les monocytes, qui nécessite seulement un prélèvement de sang et un tri magnétique des cellules pouvant induire une formation osseuse comparable. Le prélèvement de sang est indolore pour le patient et peut être réalisé plusieurs semaines avant l'opération. La centrifugation sur gradient de densité et le tri magnétique des cellules peuvent être réalisés par un centre de transfusion sanguine agréé. D'autre part, ces techniques de tri magnétique par anticorps couplé à des billes magnétiques ont déjà été validées pour la clinique (CliniMACS cell separation system et MACS GMP de Miltenyi Biotec).

Afin de compléter cette étude, nous avons souhaité démontrer le mécanisme mis en jeu dans cette formation osseuse induite par les particules de BCP et modulée par la présence des monocytes. Pour cela, une étude de l'expression génique a été réalisée après 1 mois et 2 mois d'implantation dans la condition d'implantation de 35×10^6 CD14+/g de BCP (figure 19). L'expression génique relative des gènes ostéogéniques (*Cbfa1*, *Alp* et *Bsp*) soutient les résultats obtenus en histologie et montre une augmentation à 1 et 2 mois, dans la condition avec les monocytes humains en comparaison de la condition des biomatériaux seuls. De la même façon que lors de l'implantation des CSM avec les particules, l'implantation des monocytes induit une augmentation des gènes ostéoclastiques (*Trap* et *Cathk*) et macrophagiques ($M\emptyset$: *CD11b* et $M1$: *CD163*) (Figure 19).

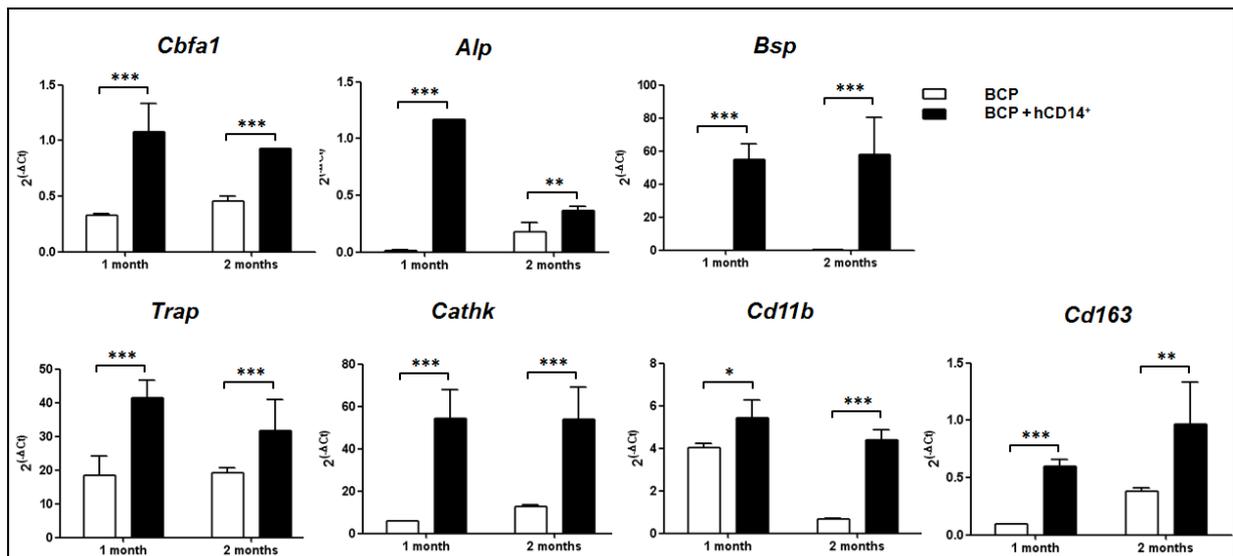


Figure 19 : Etude de l'expression génique relative obtenue dans les implants de phosphate de calcium biphasé avec ou sans monocytes humains. Les résultats montrent une augmentation de l'expression génique des marqueurs ostéogéniques (*Cbfa1*, *Alp* et *Bsp*), ostéoclastiques (*Trap* et *Cathk*) et macrophagiques (*CD11b* et *CD163*).

Ces résultats suggèrent que le mécanisme de formation osseuse est identique dans le cas d'une implantation de CSM et de monocytes.

Dans ce cadre, des études immunohistologiques ont été réalisées dans notre laboratoire démontrant la présence de la séquence ALU dans des cellules murines macrophagiques CD68+. Ainsi, nous supposons l'intervention du phénomène de phagocytose dans le mécanisme de formation osseuse induite par l'implantation de particules de BCP, et modulée par la présence des cellules humaines.

Tso *et al.* en 2010 ont montré l'implication des CSM dans ce phénomène de phagocytose de cellules en apoptose entraînant une modulation de la différenciation ostéogénique et ostéoclastique [133]. Cette étude démontre que lors d'une condition pathologique présentant un excès de cellules en apoptose, les CSM phagocytent ces cellules. Par la suite, les CSM, ainsi transformées, stimulent le chimiotactisme des lymphocytes T en sécrétant IL-8 et MCP-1. Elles stimulent aussi la différenciation ostéoclastique par le recrutement de cellules Th17 (Figure 20). Ce phénomène ne peut s'appliquer dans le cas de nos études en souris Nude du fait de l'absence de maturation des lymphocytes T. Cependant, il ouvre des perspectives d'étude pour comprendre l'implication des phénomènes de phagocytose dans le mécanisme de formation osseuse.

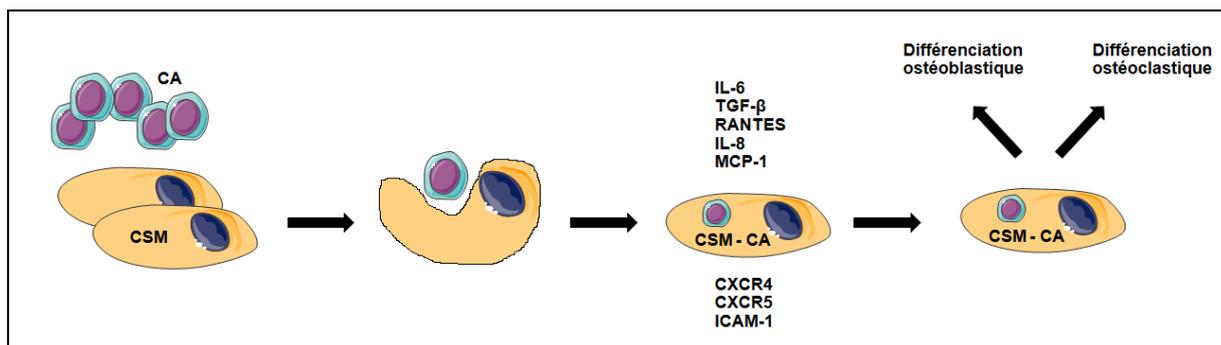


Figure 20 : Phagocytose des cellules en apoptose (CA) par les CSM stimule la différenciation ostéogénique et ostéoclastique. Modifié à partir de Tso et al. [133]

Ainsi, l'étude pourrait se poursuivre par une implantation de cellules en apoptose, induit par une irradiation, ou encore en nécrose, provoquée par plusieurs cycles de congélation/décongélation. En effet, il a été montré que les lésions tissulaires pouvaient être à l'origine du relargage d'un certains nombres de facteurs responsables de l'activation de la réponse immunitaire innée, telles que des protéines de chocs thermiques (HSP), des protéines liées à l'ADN (HMGB1), ou des molécules d'ADN libres. Ces molécules agissent alors comme signaux de dangers (« damage-associated molecular patterns » DAMPS) et induisent le recrutement des cellules inflammatoires que sont les monocytes et les leukocytes polynucléaires [134,135].

Même si les études, réalisées dans ce chapitre, présentent l'implication des différents acteurs cellulaires hotes et greffés dans la formation osseuse induite par l'implantation de particules et de cellules humaines, aucune étude n'a été réalisée sur ces animaux afin de découvrir quelle molécule intervenait dans la communication entre les différents types cellulaires. Il serait intéressant d'étudier, par exemple, les différentes molécules sécrétées sur le site de l'implantation à différents temps d'implantation. Comme décrit dans la discussion de l'article 1, de nombreuses molécules sont connues pour influencer l'ostéogénèse ainsi que la mobilisation et la différenciation des différents acteurs du mécanisme de formation osseuse (IL8, MMP9, OSM, PGE2, TGF-β).

En conclusion de ce chapitre, le rôle indirect des cellules souches mésenchymateuses ainsi que la réponse locale des macrophages et des ostéoclastes pour induire la néoformation du tissu osseux ont été démontrées. Une nouvelle approche de thérapie cellulaire pour la régénération osseuse à partir de monocytes du sang périphérique du patient a été découverte.

CHAPITRE III :

MODELE 3D MINIATURISE DE TISSU OSSEUX

CHAPITRE III : MODELE 3D MINIATURISE DE TISSU OSSEUX

I- Développement des nouvelles molécules thérapeutiques :

La découverte et le développement de nouvelles molécules de traitement suivent, dans la majorité des cas, un même processus de recherche. Dans un premier temps, une cible thérapeutique est découverte et les ligands qui pourraient affecter la pathologie concernée sont recherchés, conçus, développés et optimisés. Ces étapes demandent de nombreux tests *in vitro*, *in vivo* et cliniques avant l'utilisation de la molécule dans le traitement de cette pathologie. Dans un premier temps, la molécule est testée sur des cellules primaires ou de lignées cultivées en 2D, et par la suite sur des modèles *in vivo* adaptés à la pathologie concernée. Ces tests précliniques permettent de déterminer la toxicité mais aussi les caractéristiques pharmaco-cinétiques de la molécule (absorption, distribution, excrétion et métabolisme). Ces données sont essentielles pour identifier les composés utilisables en clinique.

Ainsi, un nombre croissant de molécules anti-cancéreuses sont entrées dans les premières phases de test clinique [136]. Et pourtant, seul un très faible pourcentage de ces composés est mis sur le marché, approximativement 10% [137]. En effet, le manque d'efficacité clinique et/ou une toxicité inacceptable sont les principales causes de l'échec du développement clinique des molécules testées [138,139]. Le prix très élevé de la mise sur le marché d'un agent thérapeutique (environ 1 milliard de dollars), et le fait que la plupart des drogues ne passent pas les tests cliniques (et particulièrement la phase III, la plus coûteuse [140,141]) forcent la recherche à développer de nouveaux systèmes qui permettraient l'exclusion de ces composés inefficaces ou toxiques le plus rapidement possible, de préférence avant les essais cliniques, voire avant les tests chez l'animal.

Il semble qu'améliorer les méthodes de culture *in vitro* soit l'étape clé qui permettra l'optimisation des molécules dans les premières phases des tests précliniques [141]. La faculté des tests *in vitro* à produire des informations pertinentes sur le bio-médicalement est alors essentielle. Pour cela, il est nécessaire que le test reproduise le phénotype exact des cellules ainsi que le micro-environnement du tissu ciblé [142,143] (Figure 21). La culture en 2D est utilisée de façon conventionnelle pour tester les nouveaux candidats qui deviendront des agents thérapeutiques. Cependant, cette méthode présente de nombreuses limites : le manque d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice dans un environnement 3D, l'absence de certaines molécules de signalisation existant dans les systèmes *in vivo* et

permettant les mécanismes essentiels pour la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire [144,145].

Ainsi, dans l'idée de combler le vide entre les cultures en 2D et les modèles *in vivo*, les modèles 3D *in vitro* ont été développés. Dans ces systèmes, les cellules seraient baignées dans une matrice ressemblant à la MEC naturelle, permettant ainsi des interactions cellule/matrice dans des conditions moins complexes et mieux définies que chez l'animal.

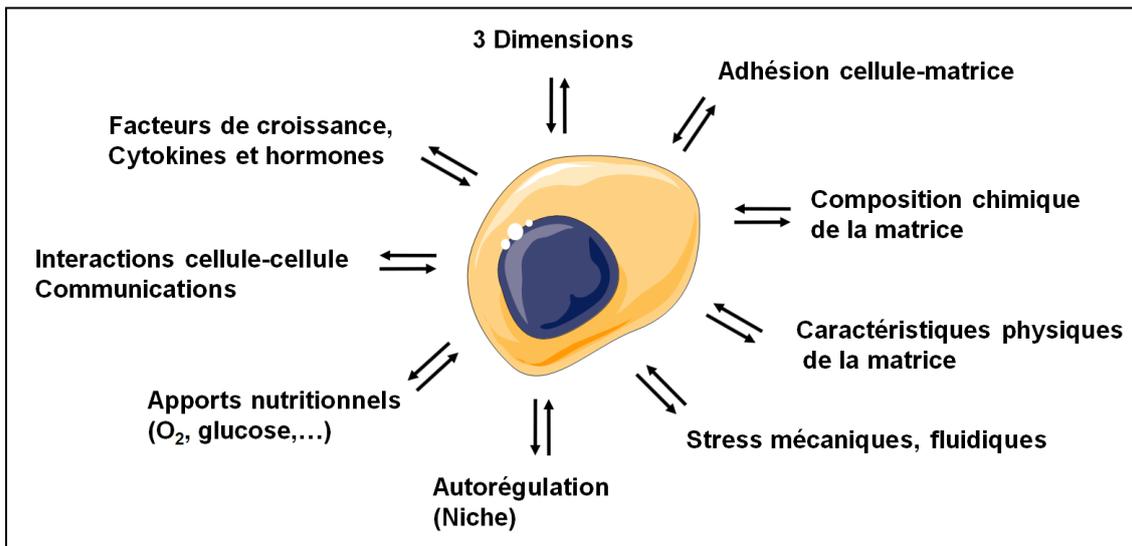


Figure 21 : Les facteurs du microenvironnement affectant le devenir des cellules.

A. Les limites de la culture en 2D :

Les données recueillies depuis 30 ans ont démontré les limites de la culture en monocouche à prédire le devenir des cellules dans un organisme vivant. Cependant, du fait de la facilité et du faible coût de ce type de culture, il représente la majorité des tests *in vitro* pour le développement de molécules.

L'inconvénient principal de ce type de culture est la mauvaise reproduction du microenvironnement et des interactions entre cellules. Même si certains types cellulaires, comme les cellules épithéliales, présentent un phénotype physiologique dans une culture sur plastique [146] ; la majorité des cellules nécessite le support qu'apporte une culture en 3D pour former des structures similaires à celles observées *in vivo*. En effet, l'architecture spécifique du tissu, les caractéristiques mécaniques et biochimiques sont perdues lors du passage à une culture en 2D [147]. D'autre part, les substrats de culture utilisés pour la culture en 2D ne parviennent pas à reproduire le milieu dans lequel baignent les cellules *in vivo* : apport en oxygène et en nutriments *ad limitum*, différence de texture et de pression.

B. Les apports de la culture en 3D :

In vivo, les cellules se développent selon l'architecture d'un tissu et d'un organe. C'est pourquoi, la notion de microenvironnement 3D est si importante dans le développement de modèles *in vitro* physiologiquement pertinents.

Les études sur le cancer sont celles qui mettent le plus en avant la nécessité d'utiliser des modèles 3D. Bissell *et al* sont les premiers à avoir montré, par exemple, l'implication de la matrice extracellulaire et de l'architecture du tissu dans le développement tumoral [144,145,148,149]. D'autres études, par la suite, ont montré comment les facteurs environnementaux pouvaient profondément influencer le devenir des cellules tumorales et notamment leur sensibilité aux agents thérapeutiques [150–152].

C. Différents systèmes de culture en 3D :

De nombreux types de culture 3D ont été développés afin de reproduire l'environnement ou la structure des organes à étudier.

1) Culture organotypique

La culture organotypique est le fait de cultiver tout ou une partie d'un tissu sans procéder à une dissociation cellulaire. Ce type de modèle comporte de nombreux avantages. Il permet de conserver l'architecture 3D du tissu et les interactions paracrines entre les différents types cellulaires, ce qui est primordial pour reproduire le développement d'un tissu. Ce modèle permet en outre de mesurer l'effet d'une substance directement sur le tissu biologique d'intérêt en s'affranchissant des effets dus à une action indirecte via un autre tissu. Cela permet donc de détailler le mécanisme d'action de la substance sur les fonctions physiologiques. La difficulté principale est la survie cellulaire dans ce type de système. En effet, même si le débit de la perfusion et la quantité de nutriments sont idéals, les cellules de l'organe survivent moins de 24h en culture.

Une variante de ce système de culture a été développée : les coupes d'organes. Elles conservent aussi l'architecture et les fonctions spécifiques de l'organe, mais la culture peut être maintenue sur plusieurs jours. Cependant, dans ces 2 cas de culture organotypique, le tissu doit être prélevé sur un animal dont la physiologie est différente de l'humain et présente une complexité élevée avec de nombreux types cellulaires en interaction dans une matrice extracellulaire.

2) Hydrogels

Dans l'environnement cellulaire naturel, les cellules sont majoritairement entourées d'une matrice extracellulaire et d'un stroma. La matrice interagit avec les cellules notamment par des stimuli mécaniques et biologiques qui sont traduits par la suite en réaction physiologiques. Les propriétés de la matrice sont alors essentielles pour définir le devenir des cellules : leur croissance, différenciation, migration et signalisation [153–158]. En effet, les entités biochimiques comme les ligands (protéines, facteurs de croissance, cytokines, hormones) présents dans la matrice, ainsi que les propriétés physico-chimiques de la matrice (porosité, rigidité et l'architecture des fibres) influencent de nombreux processus cellulaires [159–162]. Des études ont montré que la réduction de la rigidité de la matrice pouvait notamment inverser le phénotype malin de cellules de cancer du sein *in vitro* et réduire le développement de la tumeur *in vivo* [145,163].

Les cultures sur matrice permettent ainsi la différenciation cellulaire sur plusieurs jours. Les hydrogels peuvent être issus de produits naturels (collagène animal, fibrine issue du sang [164], matrigel®) ou de produits synthétiques (saccharide peptide [165], puramatrix®). L'inconvénient principal de l'hydrogel est l'analyse des résultats à la fin de la culture. En effet, il est souvent compliqué d'extraire les cellules de l'hydrogel et d'étudier l'expression protéique ou génique des cellules.

3) Supports de culture :

Les supports de culture, présentant des propriétés biologiques spécifiques, permettent la formation des tissus en guidant l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules cultivées. Ce type de culture sur support peut être utilisé dans un système de perfusion.

Les matériaux qu'ils soient naturels (corail [166], dentine [167]) ou synthétiques (particules de phosphate de calcium, fibres de polycaprolactone) présentent l'avantage de reproduire l'environnement 3D d'un tissu en comparaison des cultures en mono couche. Alors que les matériaux naturels présentent des propriétés chimiques (composition minérale) qui favorisent la différenciation cellulaire, les matériaux synthétiques sont intéressants pour leurs propriétés mécaniques (porosité, rigidité).

Les principaux inconvénients de ces types de culture sont dus aux variations spatiales de la répartition des nutriments, de l'oxygène et des métabolites excrétés. Cependant, le système de perfusion permet la création d'un flux à l'intérieur de la culture et ainsi aide à la distribution des apports.

II- Stratégies d'étude :

Aujourd'hui, malgré les nombreux traitements mis en place, les pathologies du squelette ont un impact très important sur la société. Les traitements mis en place sont développés sur des cultures en 2D et dans des modèles animaux. Cependant, ce processus de développement ne permet pas toujours d'aboutir à une mise sur le marché de la molécule.

La nécessité de créer un intermédiaire entre les 2 systèmes de tests *in vitro* et *in vivo* a semblé essentiel. Pour cela, différentes équipes ont tenté de mettre au point des modèles de culture 3D *in vitro* en associant par exemple les particules de phosphate de calcium avec des précurseurs ostéoblastiques [168–170], des cultures primaires d'ostéoblastes [171] ou des lignées immortelles d'ostéoblastes [172].

Dans cette étude, nous avons ainsi mis au point un modèle de culture 3D miniaturisé de cellules engagées dans la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. L'association de CSM humaines et de particules de phosphate de calcium BCP a permis la sécrétion d'une matrice ostéoïde abondante et ainsi la formation d'un support 3D au dépôt de pré-ostéoclastes humains. Après 90 jours de culture, le système de culture miniaturisé a été étudié par histologie, PCR et MEB permettant de démontrer la présence d'ostéocytes et d'ostéoclastes.

Ces résultats sont présentés dans l'article n°2 accepté dans le journal *Acta Biomaterialia* : « Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturised three-dimensional culture with mineral granules ».

III- Matériels et Méthodes :

A. Les biomatériaux : céramiques de phosphate de calcium biphasé

Nous avons utilisé comme précédemment des particules de BCP (MBCP+®, Biomatlante), dont la composition était de 20% d'HA et de 80% de β -TCP.

Cependant, pour ces expérimentations, les particules présentaient une granulométrie comprise entre 125 et 200 nm. Leur rapport surfacique était de 1250 cm² /g de particules. Des aliquots de 8 mg de particules sont préparés et stérilisés à l'autoclave. Pour l'expérimentation, les particules sont déposées dans chaque puits et recouvertes de PBS.

B. Les cellules

Les cellules souches mésenchymateuses ont été obtenues à partir de prélèvements de moelle osseuse de patients (l'Institut für Transfusionsmedizin, Ulm, Allemagne). Les CSMs ont été isolées par adhérence au plastique de culture puis amplifiées à raison de 10 000 CSMs/cm² dans un milieu de prolifération.

Les cellules CD14+ sont obtenues par tri cellulaire de sang périphérique humain [173]. Afin de pré-différencier les monocytes en ostéoclastes, les CD14 ont étéensemencées à raison de 0.13x10⁶ cellules /cm² dans une plaque 24 puits dans 500 μ l de milieu d'adhérence. Le milieu se compose d'aMEM supplémenté en antibiotiques (P/S 1 %), en SVF à 10 % et facteur stimulant l'adhésion des macrophages humains (hM-CSF, R&D). Après 3 jours, le milieu a été supplémenté en hRANK-L (activateur du récepteur du ligand du facteur nucléaire kappa B, Amgen). Cette différenciation a été poursuivie jusqu'à 7 jours de culture. Les monocytes, ainsi pré-différenciés, sont décollés par ajout de 100 μ l de StemPro Accutase (Life technologies), centrifugés et remis en suspension dans 250 μ l de milieu de différenciation contenant hM-CSF, hRANK-L, pour la différenciation ostéoclastique, et dexaméthasone, β -glycérophosphate et acide ascorbique pour la différenciation ostéoblastique.

C. L'association cellules et particules

Après trypsination, les CSM ont été remises en suspension à raison de 3,2x10⁶ cellules/ml. Le PBS recouvrant les particules a été retiré et 50 μ l de la suspension cellulaire déposés sur les particules très délicatement. La plaque est alors incubée à 37°C dans une atmosphère humide sous 5% de CO₂ en évitant tout mouvement. Après formation de la structure 3D, le jour suivant, 200 μ l de milieu de différenciation ostéoblastique ont été ajoutés. Ce temps de culture permet un contact étroit entre cellules et particules induisant ainsi la formation d'agrégats. La culture a été poursuivie jusqu'à 83 jours. Alors, les monocytes pré-

différenciés ont été déposés sur l'agrégat formé de cellules et particules. La co-culture tridimensionnelle ainsi établie a été poursuivie jusqu'à 90 jours.

D. Quantification de la production du collagène

Le rouge Sirius est un colorant qui se lie au collagène fibrillaire (types I à V) et plus spécifiquement sur les motifs [Gly-X-Y]_n de la structure hélicoïdale. Il s'agit d'un dosage semi-quantitatif pour déterminer les quantités de collagène produites par les cellules en culture.

Pour cela, les cellules ont été fixées en PFA 4% pendant 15 min et colorées pendant 1 h avec 200µl de rouge Sirius (1mg/ml dilué en acide picrique) sous agitation douce. Après séchage, la coloration est observée par loupe binoculaire. Enfin, le contenu de chaque puits est décoloré par une solution de soude 0,2M/méthanol (ratio 1 pour 1) pendant 15 min et l'absorbance mesurée à 490 nm au spectrophotomètre.

E. Microscopie par énergie dispersive de rayons X (EDX)

L'utilisation de la microscopie par énergie dispersive de rayons X permet d'analyser la composition chimique de nos échantillons par détection des raies d'émission caractéristiques des éléments. Pour cela, l'échantillon est bombardé d'électrons provoquant la libération d'énergie cinétique et l'éjection d'un électron de l'atome. Le photon est analysé et, grâce à des spectres pré-établis, les éléments contenus dans l'échantillon peuvent être identifiés.

Les échantillons ont été déshydratés par différents bains d'alcool allant de 70° à 100° pendant 5 min, recouverts d'une fine couche d'or palladium à l'aide d'un Cressington carbon coater et placés ensuite dans l'enceinte du MEB (LEO 1450).

F. Microscopie confocale

La viabilité des agrégats de cellules avec les particules a été évaluée par un test de live and dead (for mammalian cells, L3224, Life technologies) et observée par microscopie confocale. Le marquage a été réalisé selon les instructions du fabricant. Pour cela, les agrégats ont été rincés au PBS. Une solution contenant 5 mM calcein-AM et 2 mM ethidium homodimere-1 est ajoutée à du PBS. Après 10 minutes, la solution de marquage a été retirée et rincée au PBS. Les agrégats ont alors été observés à l'aide d'un microscope confocal (Nikon) équipé d'un laser argon (488 nm) et d'un laser diode (561 nm). Les images ont été ensuite enregistrées sur 300µm.

G. Cytométrie en flux

Les échantillons ont été rincés en PBS et traités par une solution de collagénase H pendant 2 heures à 37°C. L'enzyme a été ensuite inhibée par ajout de milieu supplémenté en SVF et la suspension cellulaire filtrée sur un tamis de 100 µm.

La survie cellulaire a été évaluée par un marquage au Sytox Green dead cell stain (1/300 dilué dans l'eau distillée, Invitrogen) pendant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sont analysés, sans lavage préalable, avec le cytomètre en flux FC500 à une longueur d'onde d'excitation de 450 nm.

H. Analyses histologiques

Les échantillons ont été fixés en solution de PFA 4% pendant 24 heures. Les échantillons sont décalcifiés dans une solution de PFA, d'EDTA chauffée à 46°C pendant 24 heures. L'absence de minéralisation dans les échantillons est validée par une radiographie à rayons X. Les échantillons sont ensuite inclus dans de la paraffine chauffée à 56°C. Une fois refroidis, des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées.

Les coupes ont été colorées au trichrome de Masson et par une coloration TRAP.

D'autre part, les coupes ont été aussi marquées par des anticorps anti-phosphatase alcaline (dilution 1/4000, sur la nuit à 4°C, ab10837 Abcam), anti-Collagène de type I (dilution 1/1000, 1 heure à 37°C, ab6308 Abcam) et anti-Sialo protéine osseuse (dilution 1/100, 1 heure à 37°C, ab52128, Abcam).

I. Analyse de l'expression génique

Les agrégats de cellules avec les particules ont été congelés dans 1 mL de TRI® Reagent avant d'être congelés à -20°C. A la décongélation, chaque agrégat a été mécaniquement dilacéré et le lysat vigoureusement vortexé. Une séparation sur chloroforme et isopropanol a été réalisée. Le culot a été rincé à l'éthanol et repris dans 20 µl d'eau sans RNase.

La rétrotranscription (RT) a été effectuée sur 1 µg d'ARN totaux grâce à l'enzyme Maxima H Minus en présence de random primers, de dNTP et d'eau stérile. Enfin, la PCR a été réalisée sur 2 µl de produit de RT en présence d'amorces d'intérêt, d'enzyme et de la sonde fluorescente SYBR-Green. Le contrôle endogène de l'expérience était glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH).

ARTICLE 2 :

OSTEOBLASTIC AND OSTEOCLASTIC DIFFERENTIATION
OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND MONOCYTES
IN A MINIATURISED THREE-DIMENSIONAL CULTURE
WITH MINERAL GRANULES

Article 2 : Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturised three-dimensional culture with mineral granules

Short title: **Miniaturised 3D culture of bone cell precursors**

Gamblin Anne Laure¹, Renaud Audrey¹, Charrier Céline¹, Hulin Philippe^{2,3}, Louarn Guy⁴, Heymann Dominique^{1,2,5}, Trichet Valérie^{1,2}, Layrolle Pierre^{1,2,5*}

¹ *INSERM, UMR957, Nantes,*

² *Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes,*

³ *Plate forme MicroPICell, SFR Santé François Bonamy, Inserm UMS 016, CNRS 3556.*

⁴ *Laboratoire de Physique des Matériaux et Nanostructures, UMR 6502, Institut des Matériaux Jean Rouxel, 2 Rue de la Houssinière BP 32229, 44322 Nantes Cedex 03, France*

⁵ *CHU, Hôtel Dieu, Nantes*

Accepted by Acta Biomateriala in august 2014

Abstract

The pathologies of the skeleton have a significant socioeconomic impact on our population. Although therapies have improved the treatment of osteosarcoma and osteoporosis, their efficacy still remains limited. In this context, we developed a miniaturised 3D culture model of bone cells on calcium phosphate ceramics. Human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were three dimensionally cultured on particles of biphasic calcium phosphate (BCP, 125-200µm) in osteogenic media. The MSCs seeded on the BCP particles adhered and proliferated, producing abundant collagenous extracellular matrix. Light and confocal laser scanning microscopy showed that the MSCs created bridges between the BCP particles and formed a 3D structure. Energy dispersive X-ray analysis (EDX) from scanning electron microscopy (SEM) proved mineralisation of the collagen matrix. The 96-well sized bone constructs were tested by immunohistology and transcription analysis, proving cell differentiation. Both techniques corroborated the osteoblastic differentiation with high production of bone sialoprotein and osteocalcin. Peripheral blood CD14 positive monocytes (MOs) were pre-differentiated into osteoclasts prior to seeding on the 3D constructs. Multinucleated and tartrate resistant acid phosphatase-positive cells were also identified at the surface of the 3D constructs after 90 days of culture. In addition, cell viability within these constructs was measured by flow cytometry. In summary, we developed a miniaturised 3D culture of bone cell precursors with osteoblasts and osteoclasts. This 3D culture may make it possible to test the effects of new drugs for bone healing, osteoporosis and osteosarcomas, in more appropriate cell-cell and cell-matrix interactions than conventional 2D cultures.

Keywords: 3D model, bone, human mesenchymal stromal/stem cells, osteoblasts, human monocytes, osteoclasts, biphasic calcium phosphate particles, miniaturised 96-well co-culture

Introduction

Bone pathologies have a negative impact on life and are a major healthcare issue for aging populations [174,175]. Osteoporosis, which is characterised by a loss of bone density, leads to bone fractures in half of women and one third of men during their lifetime [176]. Secondary tumours derived from common breast or prostate carcinomas can lead to bone loss, which is associated with pain and fractures [177]. In addition, rare primary bone tumours including osteosarcomas [178] and rare genetic bone disorders such as osteogenesis imperfecta [179] affect young patients and are also associated with an imbalance between bone formation and resorption.

Three-dimensional (3D) reconstitution of tissues *in vitro* aims to understand how diseases develop by co-culturing various cells with more appropriate cell-cell and cell-matrix interactions than conventional 2D cell monoculture [180]. In addition, *in vitro* 3D tissue models may help understanding of how biological factors or drugs control the pathophysiology of tissues rather than using more complex animal models. There is increasing evidence that cell behaviour in 3D constructs recapitulates *in vivo* tissues as illustrated by cell morphology [147], cell fate [181] and cell signalling [182]. For bone, osteoblasts and osteoclasts are the primary cells needed to construct such a 3D model.

Osteoblasts produce the bone matrix that is composed of collagen type I (90% of extracellular matrix proteins) and non-collagenous proteins, such as bone sialo protein (BSP) and osteocalcin (OC) [183]. This osteoid matrix mineralizes by deposition of calcium phosphate crystals, particularly hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Once surrounded by the bone matrix, osteoblasts are fully differentiated into osteocytes. Osteoblasts differentiate from mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), which can be obtained from bone marrow and culture-expanded for bone regeneration [184–187]. Osteoclasts are multinucleated bone-resorbing cells formed from the fusion of monocytes (MOs) [188,189]. Osteoclasts produce cathepsin K (CATHK), the master enzyme responsible for the degradation of bone proteins. Osteoclasts are characterised by high amounts of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), the activation of the nuclear factor of activated T-cells (NFATC1) and the expression of DCSTAMP (dendrocyte seven-membrane protein) that makes cellular fusion possible. Osteoclasts differentiate from a monocyte precursor that can be identified by the cluster of differentiation CD14 in humans. Osteoclastogenesis is mainly controlled by the receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) [189]. Osteoclasts are the main target of anti-resorptive therapies, which include bisphosphonates or human mono-clonal antibody directed against RANKL (i.e. Denosumab) [177,190–192].

In order to mimic the mineral compound of bone, biphasic calcium phosphate (BCP) granules have been associated with osteoblast precursors [168–170], primary cell cultures of osteoblasts [171] or osteoblast cell lines [172]. In these study, the BCP granules supported *in vitro* osteoblast differentiation. The 3D constructs have also been associated with peripheral blood MOs [193] or pre-osteoclast cell lines [194], demonstrating osteoclastic differentiation with gene expression and cytokine secretion. However, these 3D bone constructs were not developed in 96-well microplates, which would make it possible to screen the molecules by evaluating their effects on differentiation or the viability of specialised bone cells. In this study, we investigated the differentiation of human MSCs from bone marrow aspirates co-cultured with MOs isolated from human peripheral blood, on BCP scaffolds. The 96-well sized 3D bone constructs were used analyzed by histology, flow cytometry for cell viability and transcription analysis for gene expression.

Materials and Methods

Biomaterial

Granules, 125-200 μm in diameter, of microporous biphasic calcium phosphate (BCP, MBCP+®, Biomatlante, France) with 80/20 β -tricalcium phosphate/ hydroxyapatite weight ratio were used as scaffolds for the 3D cultures. The BCP granules were prepared by mixing calcium-deficient apatite with pore makers, followed by compaction and sintering at 1050°C. The specific surface area of the BCP was determined by using the Brunauer Emmett-Teller (BET) method with helium absorption desorption (Micromeritics) at $863 \pm 72 \text{ cm}^2/\text{g}$. The BCP granules were weighted in 8 mg aliquots, corresponding to an area of approximately 6.9 cm^2 in Eppendorf tubes and sterilised by autoclaving.

Cell isolation and culture

Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) were kindly provided by Prof. Markus Rojewski, Institut für Transfusionsmedizin, Ulm, Germany. After receiving informed consent from adult donors, a bone marrow aspiration was performed under local anaesthesia by haematologists. The cells were seeded at low density on treated culture polystyrene flasks (Corning) and cultured in D-modified Eagle's medium (DMEM, Lonza), supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS, Lonza), 100 UI/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The MSCs were isolated by plastic adherence, and amplified in culture until passage 3 in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2 . The human MSCs were characterised by flow

cytometry as being positive for CD73, CD90, CD105 and negative for CD45. Multipotency was demonstrated by culturing cells in adipogenic, chondrocytic and osteogenic conditions according to the International Society of Cell Therapy (ISCT) guidelines.

Human blood monocytes (MOs) were isolated from buffy coats obtained from the peripheral blood of healthy anonymous donors by gradient centrifugation (Biocoll, Biochrom AG). The MOs were purified by positive selection using anti-CD14-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The human MOs were at least 90% positive for CD14. MOs (0.75×10^6) were seeded onto 24-well plates in culture media supplemented with 25 ng/mL of human macrophage colony stimulating factor (MCSF; R&D Systems) and with 100 ng/mL of human RANKL (kindly provided by Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) for 7 days for differentiation into pre-osteoclastic cells [173]. The cells were harvested from the treated culture polystyrene using Stempro Accutase (Life Technologies) and seeded on to the 3D constructs.

3D co-culture on biomaterial

Aliquots of BCP granules (8 mg) were put into 96-well low adherent culture plates (low attachment plate, Corning Corp). Prior to cell seeding, the BCP granules were incubated in PBS for 12 hours. The MSCs were seeded on BCP granules at a density of $0.16 \times 10^6/8\text{mg}$ in 50 μL of culture media overnight. After cell attachment to the granules, 200 μL of cell culture medium supplemented with 0.2 mM ascorbic acid (Sigma), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma), and 10^{-8} M dexamethasone (Sigma) were added to each well. The MSCs attached to the BCP granules, proliferated and produced abundant extracellular matrix forming 3D constructs of cells, extracellular matrix and BCP granules. The 3D co-culture of MSCs and MOs was initiated on day 83. Osteoclast-pre-differentiated MOs were detached from the adherent plate, following 7 days of MCSF/RANKL treatment, prior to cell fusion and deposited on to the 3D constructs for 7 days in the previous osteogenic culture media, supplemented with MCSF and RANKL [173] (corresponding to 90-days-old 3D constructs).

Scanning electron microscopy (SEM) and Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis

Prior to the SEM observations, the BCP particles and 3D constructs were washed in PBS, dehydrated in ethanol baths of 70, 80, 90 and 100 % for 5 min each and coated with a thin layer of Au-Pd (Jeol JUC 5000 sputtering coater). The samples were observed with a scanning

electron microscope (JEOL 5800LV operating at 5 kV) and microanalyses were performed using Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy equipped with a Peltier cooled silicon drift detector (XFlash6 from Bruker).

Collagen staining

After 7, 14, 21, 28, 56 and 90 days of culture, the 3D constructs were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 1 h at room temperature. The samples were washed three times with PBS and then stained with 1% pico-sirius red (100 μ L, 43665 Fluka) for 90 min and the cells were washed with distilled water four times. After imaging, the stain was eluted using a 0.2 M sodium hydroxide and methanol solution (50/50 vol) for 15 min and quantified at 490 nm optical density (O.D.).

Confocal images

MSCs viability at 90 days of culture was assessed on the 3D constructs by Live and Dead assays (Invitrogen) followed by confocal imaging. Live and Dead fluorescence staining was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the 3D constructs were rinsed with PBS and placed in a solution of PBS supplemented with 5 μ M calcein-AM and 2 μ M ethidium homodimer-1. After 10 min, the dye mixture was removed and the 3D construct was rinsed with PBS, before being observed with a Nikon A1R confocal laser-scanning microscope (Nikon France) equipped with an argon laser (488 nm) and a laser diode (561 nm). The images were recorded with a Plan Apo x20 objective N.A : 0.75. For each sample, 3 random positions were chosen within the 3D construct, and a stack of 60-150 planes was taken along the z axis using a 4 μ m step size. The experiment was repeated three times.

Flow cytometry

MSCs viability in the 3D constructs was assessed at 14 days of culture by Sytox green dead cell staining (Invitrogen, France) using flow cytometry. Sytox green assays were performed according to the supplier's instructions. Briefly, the BCP-MSCs constructs were rinsed in PBS and treated with collagenase H for 2 hours at 37°C. To obtain a positive control for cell death, the chemotherapy drug cisplatin (1 mM) and the cytotoxic compound formaldehyde (4 %) were added over night to the cells before the collagenase treatment. The cells were rinsed twice in PBS, filtered on 100 μ m poly-ether sulfone (PES) membrane and centrifuged. The cells were then incubated for 30 minutes at 4°C in Sytox green solution (50 pM in deionised

water). The samples were analysed without washing using 488 nm excitation collected by flow cytometer (Beckman Coulter FC500).

Histology

After fixation in 4% paraformaldehyde (PFA), the 3D constructs were processed for decalcified histology. Briefly, the samples were decalcified in 4.13% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)/0.2% PFA in PBS at 46 °C in an automated microwave decalcifying apparatus (KOS Histostation, Milestone Med. Corp., MI, USA). Complete decalcification was verified by X-ray images. The samples were then impregnated in paraffin. Thin histology sections (3 µm thick) were stained with Masson's trichrome. TRAP staining was performed using a commercial staining kit (Acid Phosphatase Leukocyte Staining Kit, Sigma) following the manufacturer's instructions. Paraffin sections were also used for the immuno-histological chemistry of alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COLL1) and bone sialo protein (BSP). For ALP and Coll1 detection, sections were heated at 95°C with citrate buffer (1X pH6.0, Microm Microtech) for 20 min. After removal of the endogenous peroxydase with 3% H₂O₂, and rinsing in PBS, the sections were incubated with monoclonal rabbit anti-ALP antibody (dilution 1/4000, over night at 4°C, ab10837 Abcam), monoclonal mouse anti-Coll1 antibody (dilution 1/1000, 1 hour at 37°C, ab6308 Abcam), or polyclonal rabbit anti-BSP antibody (dilution 1/100, 1 hour at 37°C, ab52128, Abcam), respectively, rinsed again in PBS, and then incubated with the secondary antibody (dilution 1/100, 30 minutes at 37°C, E0432, E0433 and E0466, Dako).

Reverse transcription- real -time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Each 3D construct was treated with 1 mL of Tri-reagent (Sigma Aldrich) and vigorously shaken to lyse the cells. Phase separation was performed using chloroform. RNA was recovered from the aqueous phase using isopropanol, and this was followed by alcohol precipitation steps. RNA samples (1µg) were reverse transcribed with a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and random primers in a total volume of 20 µL. Real time quantitative PCR was performed in the CFX96 (Bio-Rad Laboratories) with SYBR Green detection according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications involved 39 x 30 s cycles at 98°C, 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Expression of the target gene was normalised to that of the endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The $2^{-\Delta Ct}$ (cycle threshold) method was used to calculate expression levels.

Gene name symbols with corresponding full names and the list of corresponding primer sequences are indicated in Table 1.

Statistical analyses

Experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. Data were expressed as mean +/- standard deviation. Statistical analyses were performed by using the Two - way ANOVA and Bonferroni post tests with GraphPad Prism 6.0 software. Differences were considered significant for p value < 0.05.

Results

Characterisation of the 3D constructs of MSCs and BCP granules in osteogenic medium

The formation of 3D constructs *in vitro* in the 96-well microplates was studied by seeding various quantities of MSCs onto BCP granules in osteogenic medium. The complete aggregation of the granules was only obtained within 72 hours by seeding high numbers of MSCs with a concentration of 1.6×10^5 cells/well, on 8 mg of BCP granules developing a surface of approximately 6.9 cm^2 , namely 23×10^3 cells/cm². At such a high cell density, adhesion on the BCP granules, cell-cell contacts and fibre synthesis were observed by time-lapse videomicroscopy (supplementary data). Contraction of the 3D constructs was increased between days 28 and 90 of culture as shown by SEM (Figure 1). SEM further confirmed the presence of an abundant fibrous extracellular matrix with 10 to 20 spherical mineralised nodules on the 90-day-old 3D constructs (Figure 2A, left panel). Energy dispersive X-ray (EDX) analysis identified rich calcium and phosphate deposits corresponding to the spherical mineralised nodules (Figure 2A, right panel). Interestingly, such nodules were not detected in 28-day-old 3D constructs. Sirius red staining was used to analyse the amount of collagen fibres that were produced during the culture periods. The 3D MSCs-BCP constructs were strongly stained by Sirius red in saturated picric acid, while the BCP granules alone were slightly stained as shown in Figure 2B. The amount of fixed and eluted stain increased by 2 fold between the 14-day-old constructs and the 56-day-old constructs (Figure 2B), indicating an increase in the amount of collagen deposited during this culture period. However, a 3-fold decrease in collagen quantity was observed from days 56 to 90.

Cell viability and histology analyses on miniaturised 3D MSCs-BCP constructs

The 3D constructs that were obtained in the 96-well microplates were used to assess cell viability after 90 days by fluorescence microscopy using a Live and Dead

Viability/Cytotoxicity kit for mammalian cells. Despite the long culture period of 90 days, the vast portion of cells were stained with green-fluorescence which identified viable cells, while fewer cells were stained with red-fluorescence which indicated membrane-compromised cells (Figure 3A). Moreover, viable cells appeared homogeneously distributed within the 3D constructs.

The quantity of viable cells and membrane-compromised cells was detected in these 3D MSCs-BCP constructs using flow cytometry using Sytox green staining (Figure 3B). After culturing for 14 days, some 3D constructs were treated with either formaldehyde or cisplatin, which compromise cell membrane integrity. A large majority, 100% or 90%, of Sytox green positive cells were detected following either the formaldehyde or cisplatin treatment, respectively, in comparison with the untreated MSCs-BCP constructs. These data show that the effects of drugs on cells embedded within a 3D MSCs-BCP construct can be quantified by accurate detection of dead cells using flow cytometry.

3D MSCs-BCP constructs obtained after 90 days in culture were characterised by Masson's trichrome staining on histological sections. Abundant fibrous extracellular matrix was observed between the BCP granules (Figure 4A). Fibroblast-like cells were observed within a loose connective tissue between the BCP granules. In some areas, highly condensed fibres, correlated with the presence of osteoblast-like cells lining the BCP granules, were observed. At high magnification, few lacunae were identified within the dense extracellular matrix, suggesting osteocyte differentiation. Immunological detection of alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COLL1) and bone sialoprotein (BSP) - which are almost exclusively found in mineralised connective tissues - was performed on the 3D MSCs-BCP constructs after 90 days of culture in osteogenic medium. As shown in Figure 4A, these bone proteins were highly and evenly found in the 3D constructs, indicating the osteoblastic differentiation of the MSCs and the formation of an osteoid-like matrix *in vitro*.

Each one MSCs-BCP construct was sufficient to isolate enough total mRNA for relative gene expression analysis by reverse transcription and real time quantitative polymerase chain reaction. The expression of six genes (*COL1A1*, *CBFA1*, *ALP*, *BSP*, *BMP2*, *OC* and *SOST*; official symbols and full gene names presented in Table 1) which are activated in osteoblasts and osteocytes was measured in triplicate for one construct obtained after various culture times. The results obtained for constructs at days 7, 14, 21, 28 and 90, performed in a series of four independent experiments, are shown in Figure 4B. The highest relative expression of *COL1A1*, *CBFA1*, *ALP*, and *BSP* genes was detected in the 90-day-old constructs, indicating osteoblastic differentiation over this long culture period. In contrast, the highest relative

expression of *BMP2* and *OC* genes was observed only from days 7 to 21 of culture. Osteocyte marker *SOST* was also evaluated and its gene expression was detected only for 90 days of culture (Figure 4B).

Seeding of MCSF-RANKL-activated MOs on the miniaturised 3D MSCs-BCP constructs

In order to generate miniaturised 3D bone tissue, progenitors of osteoblasts and osteoclasts were co-cultured on BCP granules in 96-well microplates. Human MOs were first isolated from peripheral blood by CD14-positive selection and stimulated with MCSF and RANKL for 7 days to differentiate into osteoclast precursors as previously described [195]. Then, these cells were loaded onto the 83-day-old 3D MSCs-BCP constructs and co-cultured until day 90 in osteogenic media supplemented with MCSF and RANKL. By using this sequential addition of MCSF-RANKL-activated MOs on to 83-day-old 3D fibrous osteoid tissue, numerous cells were observed at the surface of the constructs at day 90. These cells were spherical in shape with extended pseudopods and were well attached to the fibrous extracellular matrix (Figure 5A). In contrast, MCSF-RANKL-activated MOs did not attach to a 21-day-old MSCs-BCP construct, suggesting that a mineralised collagen matrix is required for cell attachment as observed on bone and dentin slices. Furthermore, these cells were not able to attach to the 90-day-old 3D constructs when not pre-conditioned with MCSF and RANKL before seeding (data not shown). Masson's trichrome staining on histological sections showed some polykaryon cells (Figure 5B, top panels) and the activity of the tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) was revealed by red staining on some cells (Figure 5B, bottom panels). These results indicate that osteoclast-like cells were attached to the surface of the 3D MSCs-BCP constructs. The presence of osteoclast-like cells within those constructs was confirmed by the relative expression of five genes (*TRAP*, *CATHK*, *NFATC1*, *DCSTAMP* and *CTR*) whose transcription is activated in mature osteoclasts, and even restricted to osteoclast for *CTR*. As shown in Figure 5C, a higher relative expression of these five genes was detected within MSCs-BCP constructs plus MCSF-RANKL-activated MOs compared to 90-day-old MSCs-BCP constructs without MOs.

Discussion

In the present study, we aimed to develop a miniaturised 3D culture of human bone cell precursors on calcium phosphate particles in osteoblast and osteoclast differentiation media. At a high cell density, MSCs attached to the BCP granules and produced an abundant extracellular matrix composed of collagen type I. Over long culture periods of 90 days, these cells proliferated and differentiated into osteoblasts as evidenced by both immunohistology and RT-qPCR analysis while nodules of mineralisation were observed by SEM-EDX. Our experimental protocol was further expanded by co-culturing pre-differentiated osteoclast cells derived from MOs. These latter cells exhibited the phenotypes of osteoclasts by being multinucleated, adherent to the osteoid matrix, TRAP-positive and expressing typical osteoclastic genes such as *TRAP*, *CATHK*, *NFATC1*, *DCSTAMP* and *CTR*. Major challenges in the development of this *in vitro* 3D model of bone tissue were the miniaturisation in a 96-well plate, co-culture conditions and the sequence of seeding bone progenitors. Our optimised experimental conditions are summarised in Figure 6.

Several other groups have attempted to form 3D bone tissue *in vitro* using different strategies. In a common approach, exogenous growth and differentiating factors (*i.e.* dexamethasone [196], parathyroid hormone [197], bone morphogenetic protein 4 [74], and oncostatin M [122]) known to act directly on the osteoblastic differentiation of MSCs have been used. However, this approach was not enough to induce the formation of a condensed and mineralised collagenous bone matrix in our model as well as in other studies [74,168,170]. Despite that MSCs differentiation into osteoblasts can be achieved on plastic after only 21 days in osteogenic medium, MSCs cultured tri-dimensionally on BCP granules could not produce a mineralised matrix in 21 days but produced similar osteoblastic proteins in either osteogenic or non-osteogenic medium [170]. Therefore, we have hypothesized that longer culture periods may be needed to obtain mature bone tissue since its formation *in vivo* requires between 28 to 56 days after implantation of MSCs-BCP granules in the subcutis of nude mice [74]. In this study, an increase of collagen gene expression was observed in the 90 days 3D constructs, indicating a late osteoblastic differentiation of MSCs whereas the sirius red assay indicated a decrease in collagen production. This discrepancy may be explained by a strong reduction in size of the 3D constructs over long cultivation time, together with a high collagen condensation (Figure 4) that may have hampered the diffusion of the sirius red reagent. Moreover, the highest level of collagen gene expression at day 90 may be due to continuous differentiation of MSC indicating that the culture model retains the asymmetric stem cell division.

In order to reproduce the cells-ECM interactions encountered in bone tissue, other groups have introduced scaffolds, mainly composed of calcium phosphate and hydroxyapatite [168,170,197]. In line with our results, they obtained an osteoid matrix that was slightly mineralised following *in vitro* culture, while the *in vivo* implantation of these 3D osteoid constructs resulted in significant bone induction. Despite the use of a 3D perfusion-based bioreactor system [168] lamellar bone was not formed *in vitro* prior to *in vivo* implantation.

Osteoclast differentiation has previously been demonstrated on BCP using murine RAW264.7 [198] or human U937 cell lines [194]. Ruggiu *et al.* [199], using X-ray computed microtomography, measured a higher amount of fibrous and mineralised osteoid tissue formed by osteoblasts in co-culture with osteoclasts in comparison with monoculture of osteoblasts. However, as described in the present and previous studies [168,172,193,199], osteoclast complementation to osteoprogenitors did not improve lamellar bone formation during *in vitro* 3D culture. Numerous studies have shown that osteoclasts require podosomes for adhesion on the mineralised bone matrix [200]. In the present study, pre-differentiation of MOs into osteoclasts using MCSF and RANKL 30 was necessary in order to observe adhesion on the 90-day old 3D constructs and was evidenced by cytoplasmic extensions on SEM images (Figure 5). Furthermore, a mineralised bone matrix was required for adhesion of pre-osteoclasts differentiated from MOs, as these cells were not able to attach to 21-day-old constructs that were not mineralised.

In the present study, bone catabolism and anabolism were not demonstrated by measuring bone markers within the culture supernatants. In order to demonstrate bone metabolism in culture, Heinemann *et al.* measured ALP and TRAP activities within osteoblast and osteoclast co-culture media [193]. Additionally, Papadimitropoulos *et al.* measured C-terminal procollagen 1 (CICP) for matrix synthesis and the N-terminal telopeptide of type 1 collagen (NTx) for bone resorption within co-culture supernatants [168]. Our attempts to detect peptides and cytokines related to bone resorption or bone formation were not successful, most likely because they had not accumulated enough given that the culture media were changed every two days and not enough medium samples could be collected using this miniaturised 3D culture. Nevertheless, our 3D model of bone tissue miniaturised in a 96-well plate can be easily set up, has demonstrated the osteoblast phenotype at the protein level (immune detection of bone proteins) and cells can be harvested for flow cytometry analysis. Cell harvesting is not possible from all scaffolds or matrices and has not been previously demonstrated.

This 3D cell culture may be appropriate in drug discovery as a means of decreasing the cellular malfunction of mutant MSCs for various rare genetic bone diseases such as osteogenesis imperfect [201], for which animal models are not always available. Additionally, the role of the bone microenvironment is important in primary tumour development, like osteosarcoma, Ewing's sarcoma and chondrosarcoma [202]. The supportive effect of osteoclasts and MSCs on osteosarcoma growth has been demonstrated using mouse models [203]. However, this miniaturised 3D construct may reproduce the microenvironment of tumours with less complexity than animal tissues. Various normal cells and the ECM may be implicated in tumour development or in the drug resistance of tumour cells [150,204]. The present 3D constructs, where numerous cell types, including tumour cells may be cultured on an abundant osteoid matrix with BCP particles, may help develop new oncology drugs and decrease drug failure during clinical testing [180,205,206]. In this miniaturised 3D model, the 90-days culture time is not required for drug screening as the collagen matrix is produced within 3 days and it can support tumour cell growth.

Conclusion

A miniaturised 3D construct of bone cell precursors was successfully obtained by co-culturing human MSCs on BCP particles and pre-differentiated osteoclasts derived from MOs. Cells expressing bone proteins and embedded into an abundant osteoid matrix, as well as spherical adherent multinucleated osteoclast-like cells, were observed on the 3D constructs *in vitro*. This 3D model of bone tissue may be used for testing drugs against various bone diseases such as osteogenesis imperfecta or for reproducing the microenvironment of tumours.

Acknowledgments

We are very grateful to the members of the European consortium REBORNE for providing the cGMP grade cells used to set up the protocols, in particular Markus Rojdeski and Hubert Schrezenmeier from Ulm University. We also thank the company Biomatlante which provided the MBCP+™ granules. This work was supported by a grant (HEALTH-2009-1.4.2-241879) from the 7th Framework Programme of the European Commission REBORNE (Regenerating Bone defects using New biomedical Engineering approaches). ALG is the recipient of a PhD fellowship from the regional council of "Pays de la Loire".

Table 1

	Official symbol	Official full name ; <i>Alias</i>	Sense primer / Antisense primer
Osteoblastic genes	<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney; <i>ALP</i>	AACACCACCCAGGGGAAC GTAGCTGTACTCATCTTCATAGGC
	<i>BGLAP</i>	Bone gamma-carboxyglutamate protein; <i>OC</i>	GCGCTACCTGTATCAATGG TCAGCCAACTCGTCACAGTC
	<i>BMP2A</i>	Bone Morphogenetic Protein; <i>BMP2</i>	AGGACCTGGGGAGCAGCAA CACACGGCAGGCATACTCATC
	<i>COL1A1</i>	Collagen, type I, alpha 1	CTGGACCTAAAGGTGCTGCT GCTCCAGCCTCTCCATCTTT
	<i>IBSP</i>	Integrin-binding sialoprotein; <i>BSP</i>	CGAATACACGGGCGTCAATG GTAGCTGTACTCATCTTCATAGGC
	<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2; <i>CBFA1</i>	GTGCCTAGGCGCATTTC GCTCTTCTTACTGAGAGTGGAAGG
	<i>SOST</i>	Sclerostin	AGCTGGAGAACAACAAGACCA TCGACCTCTTGTGTTCTGGT
Osteoclastic genes	<i>ACP5</i>	Acid phosphatase 5, tartrate resistant; <i>TRAP</i>	AAGACTCACTGGGTGGCTTTG GGCAGTCATGGGAGTTCAGG
	<i>CTR</i>	Calcitonin receptor	CCCTTTGCTTCTATTGAGCTG GGGAAACGAAGATAACTCGAC
	<i>CTSK</i>	Cathepsin K; <i>CATHK</i>	GCCAGACAACAGATTTCCATC CAGAGCAAAGCTCACCACAG
	<i>DCSTAMP</i>	Dendrocyte expressed seven transmembrane protein	TGCATGCAAAGCTGCTTAAA AGGACTGGAAGCCAGAAATG
	<i>NFATC1</i>	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	GGTCTTCGGGAGAGGAGAAA TGACGTTGGAGGATGCATAG
HKG	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG GGTGCAGGAGGCATTGCT

Table 1. PCR primer sequences with the official symbols and full names of the targeted genes.

Figure 1

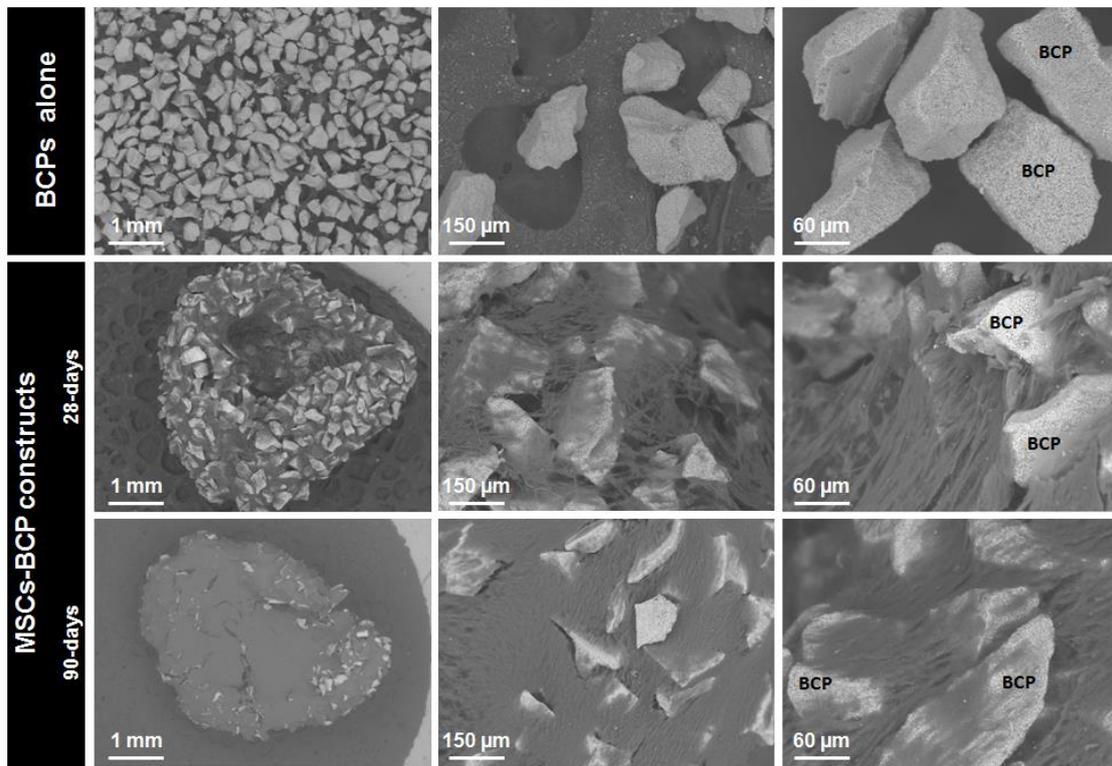


Figure 1. **Imaging of miniaturised MSCs-BCP constructs.** Scanning electron microscopy of BCP granules alone or associated with MSCs in culture in osteogenic media for 28 days or 90 days.

Figure 2

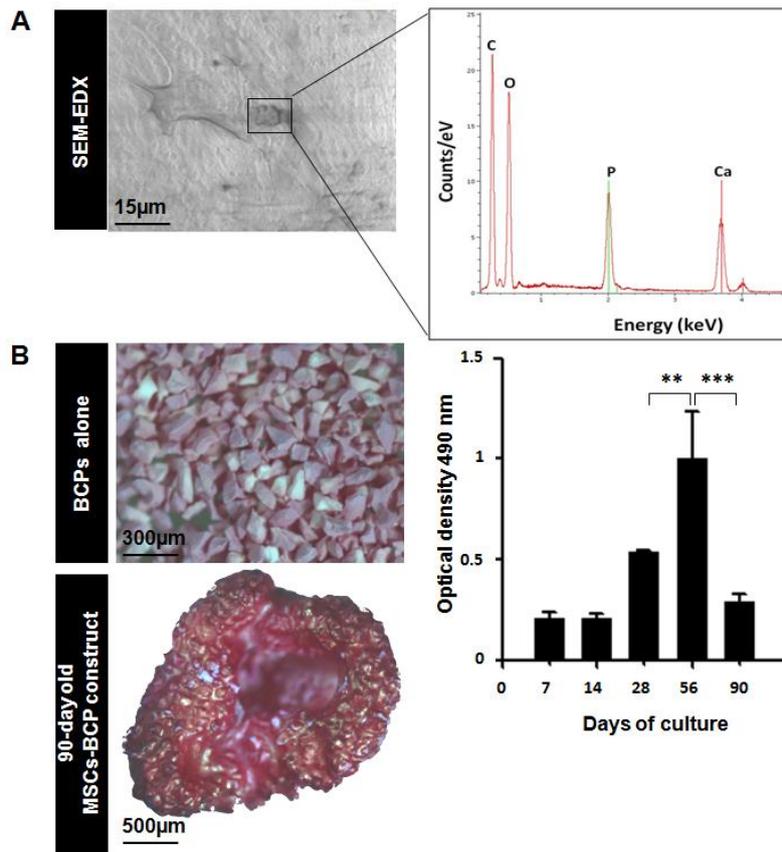


Figure 2. Mineral and collagen content within miniaturised 3D constructs (A) Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) microanalysis of one representative spherical nodule observed by Scanning electron microscopy (SEM) within 90-day-old constructs (n=3). (B) Sirius red staining of collagen within the 3D constructs. Representative image of BCP granules alone and of a 90-day-old 3D construct after sirius red staining. Average \pm SD sirius red absorbance per construct along the culture normalised to a non-loaded BCP scaffold (n=3-6).

Figure 3

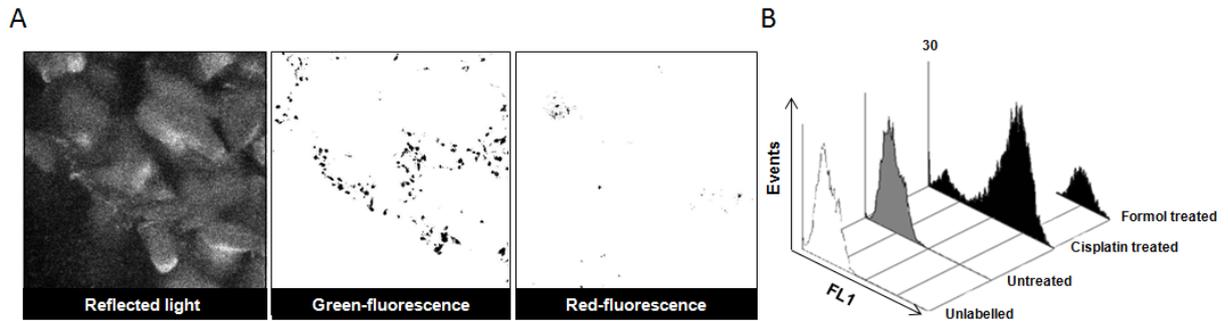


Figure 3. **Cell viability within miniaturised 3D constructs.** (A) Representative confocal image of 90-day-old constructs. Reflected light permits visualisation of BCP granules, while Live and Dead MSCs were detected with green- or red-fluorescence, respectively, after labelling with a Live and Dead Viability/Cytotoxicity assay. (B) Flow cytometry detection of MSCs detached from the 3D construct after 14 days of culture. Histograms of fluorescence intensity of dead cells are presented for Sytox green-labelled cells after cisplatin (1mM, 12h) or formaldehyde (4%, 3h) treatment. The fluorescence intensity (FL1) for unlabelled and untreated cells is shown as a control.

Figure 4

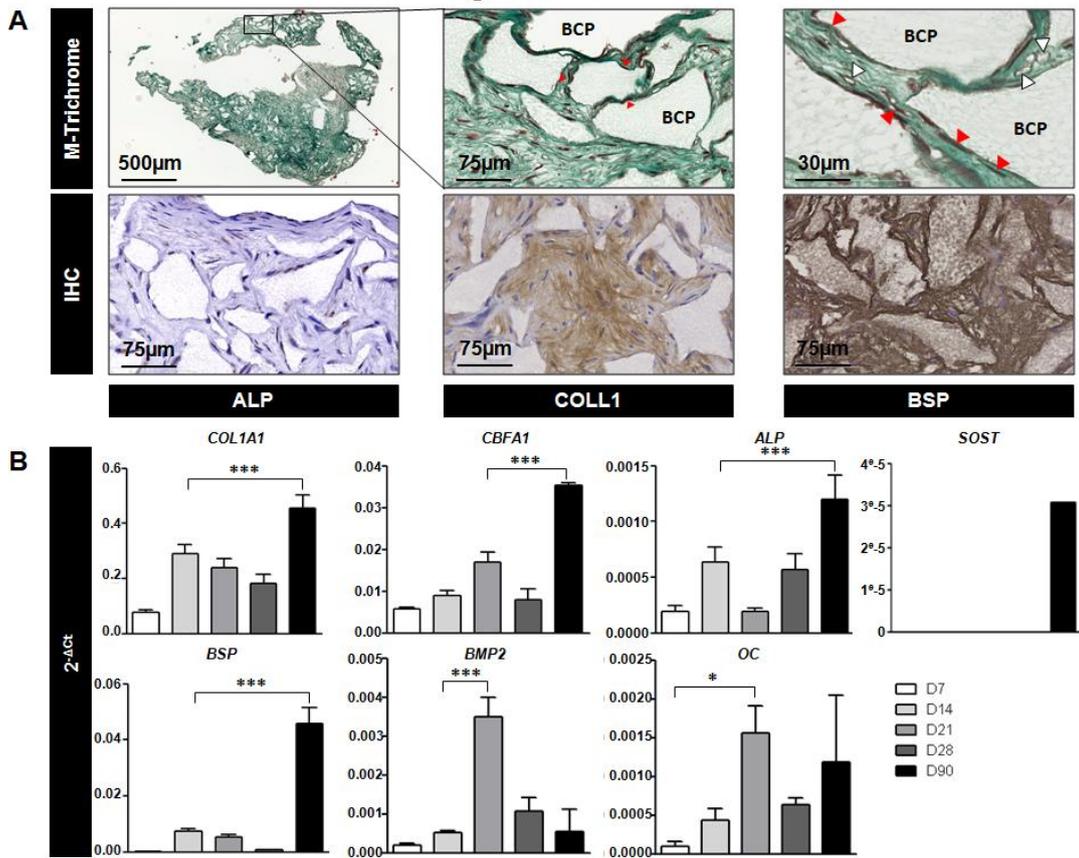


Figure 4. **Osteoblastic differentiation within miniaturised 3D constructs** (A) Representative image of paraffin sections of decalcified 90-day-old constructs. The location of the BCP particles is indicated, while the collagen extracellular matrix is stained dark green with Masson's trichrome staining (M-Trichrome, top panels). Few osteocytes in the lacunae (open arrows) and lining osteoblasts (red arrows) are indicated. Immunohistochemistry (IHC) was performed to detect bone proteins including alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COLL1) and bone sialoprotein (BSP, bottom panels). (B) Relative gene expression of early (*COL1A1*, *CBFA1* and *ALP*) and mature bone markers (*BSP*, *BMP2*, *O* and *SOST*) at different time points (days 7, 14, 21, 28 and 90; n=3). Full gene names are indicated in Table 1.

Figure 5

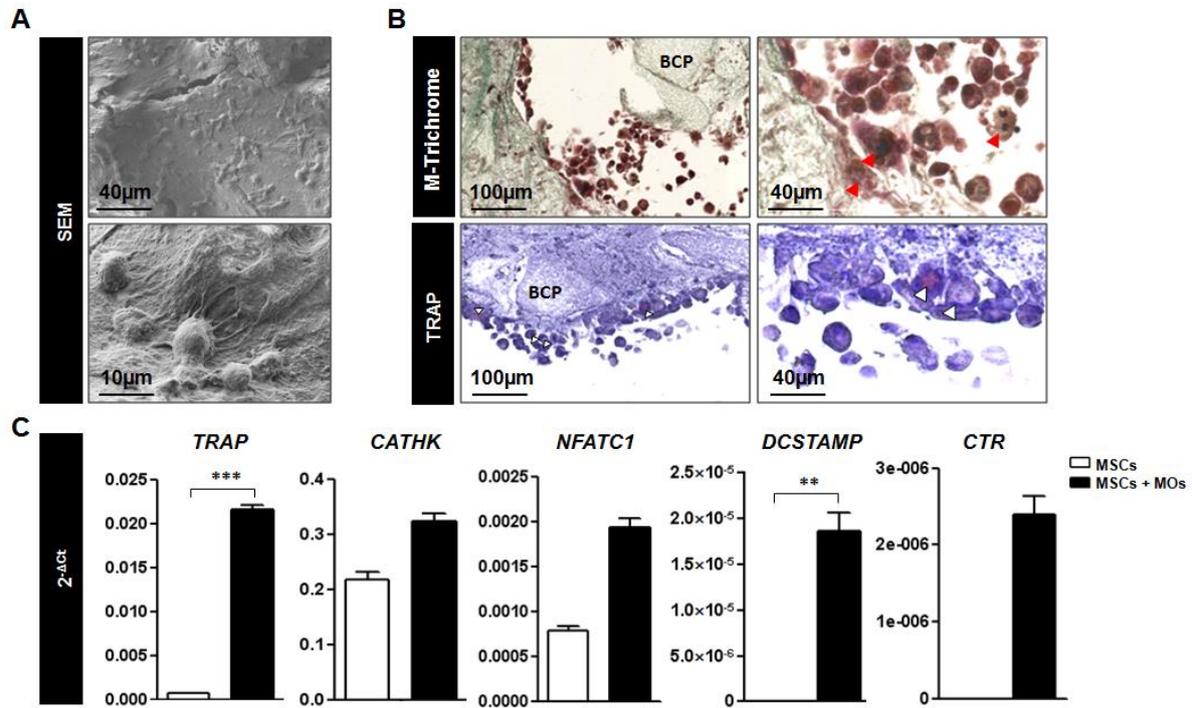


Figure 5. **Osteoclastic differentiation of MOs on miniaturised 3D constructs** (A) Representative scanning electron microscopy (SEM) showing the surface of MSCs-BCP constructs with MCSF-RANKL-activated MOs after 7 days of contact. (B) Representative paraffin sections of decalcified 90-day-old MSCs-MO-BCP constructs after Masson's trichrome staining (M-Trichrome, top panels) and after detection of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) (bottom panels). Osteoclast-like cells are identified as multi-nucleated cells (red arrows) or TRAP positive cells (open arrows). (C) Relative gene expression of osteoclast markers (*TRAP*, *CATHK*, *NFATC1*, *DCSTAMP* and *CTR*) was obtained comparing MSCs-BCP and MSCs-MO-BCP constructs (n=3). Full gene names are indicated in Table 1.

Figure 6

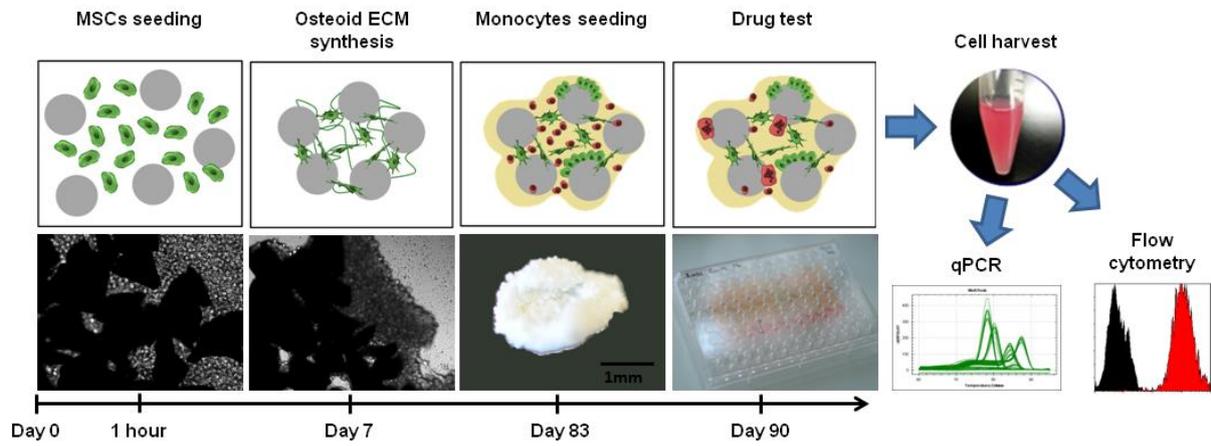


Figure 6. Protocol for generating 3D bone tissue constructs by using MSCs seeded and cultured on BCP particles, production of ECM and seeding of monocytes as pre-osteoclasts. Adhesion of MSCs on BCP particles and ECM production evidenced by light microscopy in 96-well plates. Harvesting of cells from 3D constructs for RT-qPCR gene expression and flow cytometry analysis.

DISCUSSION ET CONCLUSION DU CHAPITRE III

Dans ce chapitre, un modèle 3D de tissu osseux a été obtenu par ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire osseuse utilise des matériaux en céramique comme supports pour la colonisation cellulaire et l'organisation tissulaire. Les particules de BCP présentent une composition minérale très proche de celle de l'os naturel mais ne contiennent pas de collagène et de protéines. Malgré la porosité des particules, à l'échelle cellulaire, la surface d'adhésion proposée par ces particules est presque plane. Cependant, plusieurs études ont auparavant démontré l'intérêt de la composition et de la microporosité des particules de BCP pour la différenciation ostéoblastique dans l'ingénierie tissulaire osseuse [74,197].

Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à miniaturiser la structure 3D obtenue par l'association des biomatériaux et des CSM, afin de valider ce modèle pour des tests de molécules à visée thérapeutiques. Les premiers travaux réalisés ont pu mettre en évidence que seul un ratio surfacique spécifique (16 000 CSM/cm²) permettait la formation d'une structure 3D. La sécrétion de la matrice extracellulaire par les CSM est obtenue en quelques jours. Même si de nombreuses études ont montré la différenciation de ces cellules vers la lignée ostéoblastique après ajout de facteurs spécifiques [18,19,74], aucune ne montre la formation d'ostéocytes emmurés dans une matrice ostéoïde condensée. Au cours de ce travail, plusieurs stratégies ont été envisagées afin d'optimiser la formation d'un tissu osseux. Ainsi, l'ajout de traitements connus pour favoriser la différenciation et l'ostéogénicité a été testé : traitement à la PTH [197], à l'OSM [122] et par des contraintes de cisaillement [207]. Ces traitements n'ayant pas permis d'obtenir ni une matrice minéralisée, ni des ostéocytes, une autre hypothèse a été envisagée. En effet, obtenir un tissu osseux mature au contact de particules de phosphate de calcium nécessite, *in vivo*, entre 28 et 56 jours en sous-cutané. Nous avons donc supposé que, dans des conditions appauvries comme la culture *in vitro*, le temps de formation d'une matrice ostéoïde serait obligatoirement supérieur. Ainsi, des essais ont été réalisés sur une culture de 90 jours. Les données histologiques de notre étude montrent toujours la présence d'une matrice collagénique lâche. Cependant, des cellules, isolées dans une lacune à l'intérieur de cette matrice, ont été observées. La présence d'ostéocytes potentiels a été confirmée par l'expression génique du marqueur spécifique SOST. D'autre part, à la surface de la matrice, des cristaux de minéralisation ont pu être observés et caractérisés par analyse EDX, indiquant une minéralisation de la matrice sécrétée par les ostéoblastes.

Toutefois, aucune matrice collagénique dense n'a pu être observée. Dans notre étude, seules les particules de BCP ont été utilisées comme support de la différenciation ostéogénique. Il serait intéressant, dans une future étude, de tester le potentiel ostéogénique

d'autres supports. Par exemple, des travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence la colonisation et la différenciation des CSM sur des fibres de caprolactone associées à des particules de TCP.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés non pas à la formation osseuse, mais à la résorption osseuse. Pour obtenir des ostéoclastes actifs dans notre culture hybride 3D, différentes stratégies ont été envisagées. Dans un premier temps, la suspension cellulaire contenant les monocytes a été déposée sur les structures 3D obtenues à partir de CSM et BCP. Les monocytes, qui n'ont pas développé de point d'accroche, ont très peu adhéré sur la structure hybride. Les rares cellules ayant adhéré étaient alors trop éloignées pour permettre leur fusion nécessaire à la formation d'ostéoclaste. La pré-différenciation ostéoclastique des monocytes, avant leur dépôt sur la structure hybride, a alors été envisagée. Ainsi, des cellules de type ostéoclastes ont été obtenues en présence de MCS-F et RANK-L. Ainsi, cela a permis de favoriser l'apparition des podosomes qui permettent aux monocytes l'adhésion sur la matrice minéralisée [200] et leur activité résorbante, démontrée par la coloration TRAP et l'expression génique de *TRAP*, *CATHK* et *CTR*.

Cependant, une étude approfondie aurait pu être menée sur les caractéristiques de ces ostéoclastes. En effet, une étude par ELISA du rapport des télopeptides carboxy terminal (CTX) / amino-terminal (NTX), aurait été intéressante afin de valider l'activité de résorption des ostéoclastes présente dans les surnageants de culture. Il s'agit de marqueurs reliés à la formation et à la destruction du collagène [208]. De la même façon, des techniques d'imagerie en confocal auraient pu permettre l'identification des ostéoclastes dans la structure. Ainsi, l'utilisation de sondes calciques (comme l'aequorine) aurait permis d'observer la sécrétion d'ions calcium dans le milieu. Une étude a été réalisée en microscopie confocal permettant d'observer la survie des cellules dans la structure 3D. Cependant, seule la zone en périphérie de la structure a pu être analysée, du fait de la profondeur de champ trop importante au centre.

Enfin, la mise au point de ce modèle 3D de tissu osseux *in vitro* aurait pu être complétée par l'ajout de la composante vasculaire. Les influences de la niche vasculaire sur la niche osseuse sont connues. En effet, de nombreuses études ont montré l'impact des cellules endothéliales sur la différenciation ostéoblastique [209,210], mais aussi la différenciation ostéogénique des péricytes [211].

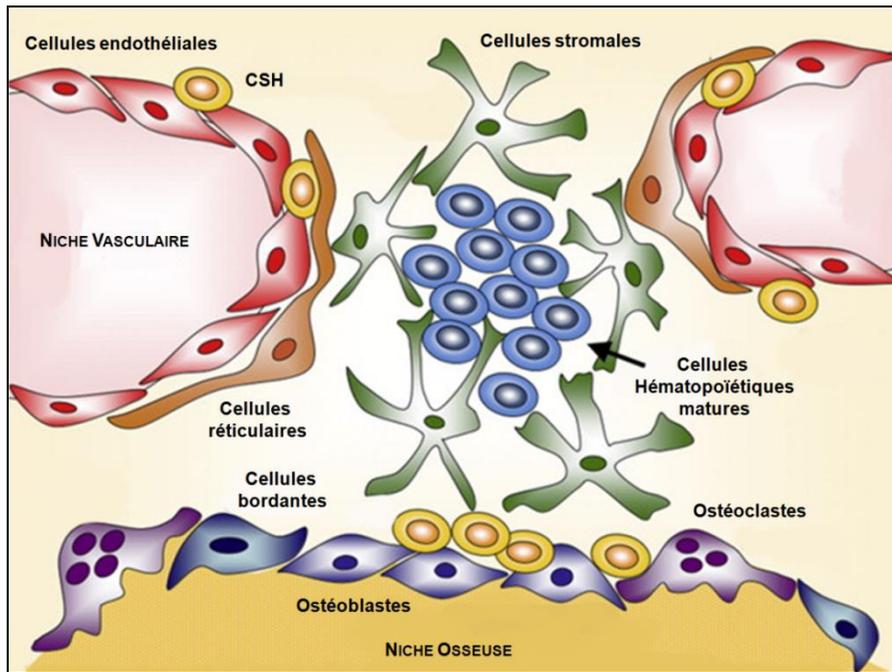


Figure 22 : La niche osseuse est en étroite relation avec la niche vasculaire et les cellules souches hématopoïétiques CSH. Les interactions sont nombreuses entre les ostéoblastes, ostéoclastes, CSH et cellules stromales ou réticulaires, chacune intervenant dans le devenir de l'autre. Modifié à partir de Di Maggio N et al. 2010 [212].

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre au point un modèle 3D *in vitro* miniaturisé à partir de cellules souches humaines et de particules de BCP montrant la formation d'une matrice ostéoïde minéralisée et l'engagement des cellules dans la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique.

CHAPITRE IV :
FORMATION ET VALIDATION
D'UN MODELE 3D D'OSTEOSARCOME

CHAPITRE IV : FORMATION ET VALIDATION D'UN MODELE 3D D'OSTEOSARCOME

I- Ostéosarcome et développement de nouvelles molécules thérapeutiques

A. Les tumeurs osseuses primitives

Les tumeurs osseuses primitives sont des pathologies rares qui peuvent être divisées en deux catégories : les tumeurs osseuses primitives bénignes et les tumeurs osseuses primitives malignes. Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune. Cependant, un deuxième pic d'incidence se situe vers 60 ans avec des tumeurs osseuses primitives qui surviennent à la suite de pathologies du remodelage osseux telles que la maladie de Paget. L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont les deux tumeurs osseuses primitives malignes les plus fréquentes chez l'enfant et l'adulte jeune, représentant environ 90% des tumeurs osseuses primitives.

B. L'ostéosarcome

L'ostéosarcome est une tumeur rare dérivée des cellules souches mésenchymateuses plus ou moins engagées dans la voie ostéogénique [213]. Il se caractérise par l'élaboration d'un tissu osseux ou d'une substance ostéoïde par les cellules tumorales. D'autre part, ce type de tumeurs provoque un remodelage du tissu osseux sain [214,215]. On distingue ainsi trois types d'ostéosarcome : les tumeurs ostéocondensantes, ostéolytiques et mixtes (Figure 23).

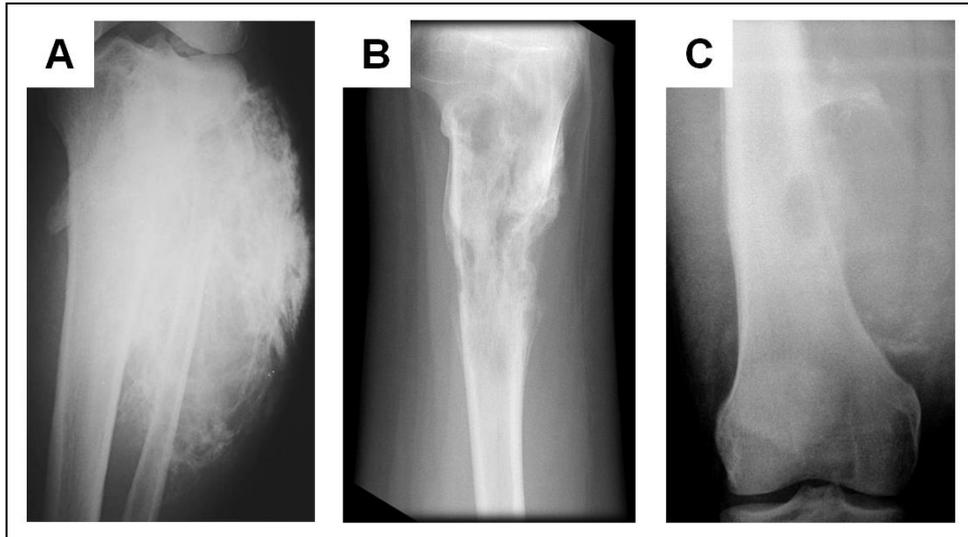


Figure 23 : Radiographies de patients souffrant d'un ostéosarcome (A) ostéocondensant (B) ostéolytique et (C) mixte.

On peut identifier d'une part, les ostéosarcomes de haut grade, représentant 90% des ostéosarcomes et d'autre part, les ostéosarcomes de bas grade, représentant seulement 5 à 6%. Les ostéosarcomes de bas grade, ostéosarcome juxtacortical, intramédullaire et fibroblastique, présentent en général un profil génétique simple. Au contraire, les ostéosarcomes de haut grade, ostéosarcome commun, télangectasique, chondroblastique, ostéosarcomateuse et maladie de Paget, sont des tumeurs très complexes dont le profil génétique présente de nombreuses aberrations.

Un ostéosarcome grandit de manière radiale, formant ainsi une masse : il pénètre dans l'os cortical, puis comprime les muscles environnants (Figure 24). La tumeur peut métastaser à l'os ou encore aux poumons, aux seins, aux reins. L'apparition de métastases distantes de la tumeur est souvent associée à un mauvais diagnostic [216,217].

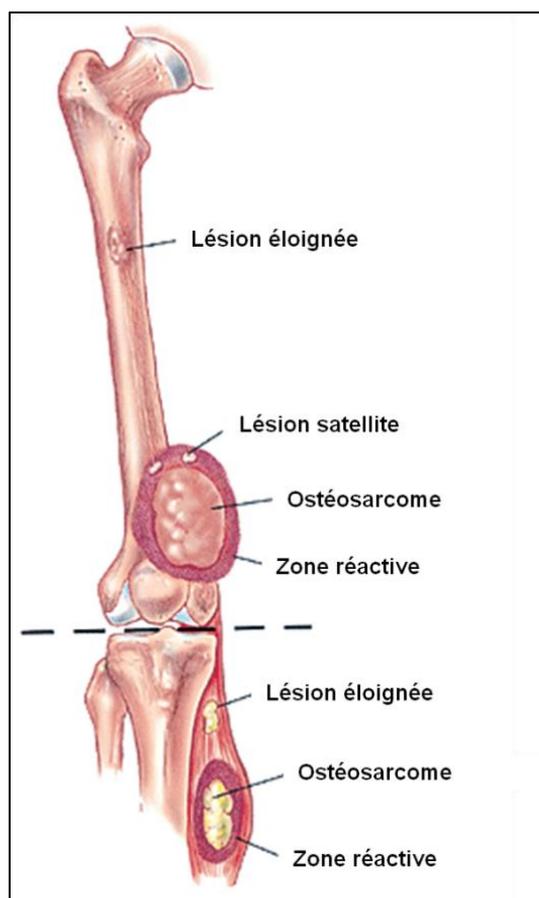


Figure 24 : Schéma de croissance de l'ostéosarcome. (modifié à partir de Bickels J, et al, 1999 [218])

1) Epidémiologie et étiologie

L'ostéosarcome représente la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes, à l'exception du myélome multiple et du lymphome [219], avec 150 à 200 nouveaux cas par an en France, plus fréquent chez les sujets jeunes (moyenne d'âge de 18 ans) [220]. On note une légère prédominance masculine. Les ostéosarcomes peuvent toucher tous les os du squelette mais se développent le plus souvent sur les os longs situés à proximité du genou (50%), hanche (15%) et épaule (15%). On les retrouve aussi près des articulations du bassin et des vertèbres (10%) et de la tête (crâne et mâchoire : 3%) [221].

A ce jour, les causes exactes de la formation d'un ostéosarcome sont inconnues. L'âge moyen et la grande taille des sujets atteints font penser que l'apparition de la tumeur serait due à une croissance rapide des os longs. Aucune anomalie génétique ou moléculaire particulière n'a été mise en évidence dans les ostéosarcomes de haut grade [222]. Les ostéosarcomes de bas grade présentent des altérations de p53 moins fréquentes que dans les ostéosarcomes conventionnels, mais une augmentation des protéines CDK4 et MDM2. Certaines prédispositions ont pu néanmoins être associées à l'apparition d'un ostéosarcome

comme la maladie de Paget ou le syndrome Rothmund-Thompson. Un traitement répété de radiothérapie augmente aussi significativement les risques de développer un cancer de l'os. Enfin, une tumeur osseuse peut apparaître chez des individus présentant des anomalies génétiques (p53 et Rb) favorables à la formation de cancers (syndrome de Li Fraumeni ou rétinoblastome)[223].

2) Diagnostic

Les signes évocateurs d'un ostéosarcome se réduisent habituellement à l'apparition de douleurs osseuses causées par la tumeur. Cette douleur persiste pendant des mois jusqu'à devenir brusquement beaucoup plus intense. La douleur est corrélée avec la pénétration de la tumeur au niveau cortical. L'ostéosarcome peut induire une fracture dite pathologique, spontanée ou provoquée à la suite d'un léger traumatisme.

Le diagnostic repose sur un bilan complet d'imagerie et surtout d'analyse des tissus tumoraux prélevés par biopsie. L'imagerie permet de confirmer la présence d'une tumeur et rechercher d'éventuelles métastases (radiographies, scanner, IRM, scintigraphie osseuse).

Les radiographies à rayons X peuvent montrer, selon le type de tumeurs, des lésions ostéolytiques ou une excroissance du tissu osseux. La sclérose, résultat de la production de tissu ostéoïde, apparaît comme petite, irrégulière et plus ou moins intense. La majorité des ostéosarcomes se manifeste par la destruction du cortex osseux et la formation d'une masse molle. La radiographie permet aussi d'identifier d'éventuelles fractures.

Les images par résonance magnétique (IRM) sont essentielles pour déterminer l'envahissement de la tumeur dans le tissu sain ainsi que la formation d'une excroissance osseuse [224][225]. Les images IRM permettent aussi d'établir le lien entre la tumeur et le réseau neuro-vasculaire. Cette donnée sera très utile dans la décision de résection de la tumeur. Les images IRM permettent aussi de déterminer la présence de métastases osseuses proches du site tumoral.

Les images scanners peuvent être plus précises que les images IRM lorsque la tumeur présente une forme nécrotique ou un œdème. D'autre part, le scanner permet de déterminer la présence de métastases aux poumons. Cette méthode de diagnostic est répétée même après la fin du traitement pour surveiller toute éventualité de récurrence.

La scintigraphie osseuse permet, elle-aussi de déterminer la présence de métastases, et le développement tumoral intra osseux [226]. Elle consiste à injecter un isotope radioactif (Technétium Tc-99m MDP) qui va se fixer sur les zones à haute activité métabolique osseuse.

Enfin, la biopsie est une étape clé dans le diagnostic de l'ostéosarcome. Elle permet de distinguer la tumeur en présence, d'autres tumeurs osseuses telles que le sarcome d'Ewing

ou le chondrosarcome, ainsi que le grade de la tumeur. Elle peut permettre aussi de connaître l'expression de certaines protéines (MMP, OPG et RANK-L) sur le site tumoral et ainsi de définir les protocoles thérapeutiques adaptés à la tumeur.

3) Traitements actuels

La prise en charge de la tumeur osseuse associe généralement la chimiothérapie à la chirurgie (Figure 25) et s'organise le plus souvent en trois temps :

Poly-chimiothérapie pré-opératoire qui permet de réduire le volume de la tumeur initiale, faciliter la chirurgie et limiter les risques de métastases.

Poly-chirurgie qui permet l'exérèse de la tumeur. La résection doit cependant permettre de préserver un maximum de tissu sain.

Chimiothérapie post-opératoire permettra de prévenir les risques de récurrence locale et de métastases.

La combinaison poly-chimiothérapie et chirurgie a modifié radicalement le pronostic autrefois gravissime des patients atteints par un ostéosarcome [227]. En effet, le taux de survie a atteint aujourd'hui les 70% de survie à 5 ans. Néanmoins, ce pourcentage diminue à 20% lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic [228].

Les molécules ayant montré le plus d'efficacité contre la tumeur osseuse sont :

- la doxorubicine : agent intercalant de l'ADN par liaison à la topoisomérase II. Cela permet l'inhibition de la synthèse des ARN ribosomiaux.

- le cisplatine : complexe organométallique se fixant sur les bases puriques de l'ADN (A et G). Cela induit l'inhibition de la transcription.

- l'ifosfamide associé au Mesna : composé entraînant la libération d'ions éthylène-iminium bloquant la réplication de l'ADN. Ces ions sont des métabolites urotoxiques et le Mesna facilite leur détoxification.

- le méthotrexate : inhibiteur de la dihydrofolate réductase. Cela induit un déficit des bases thymine, ralentissant fortement la synthèse de l'ADN. Ce composé est fortement toxique.

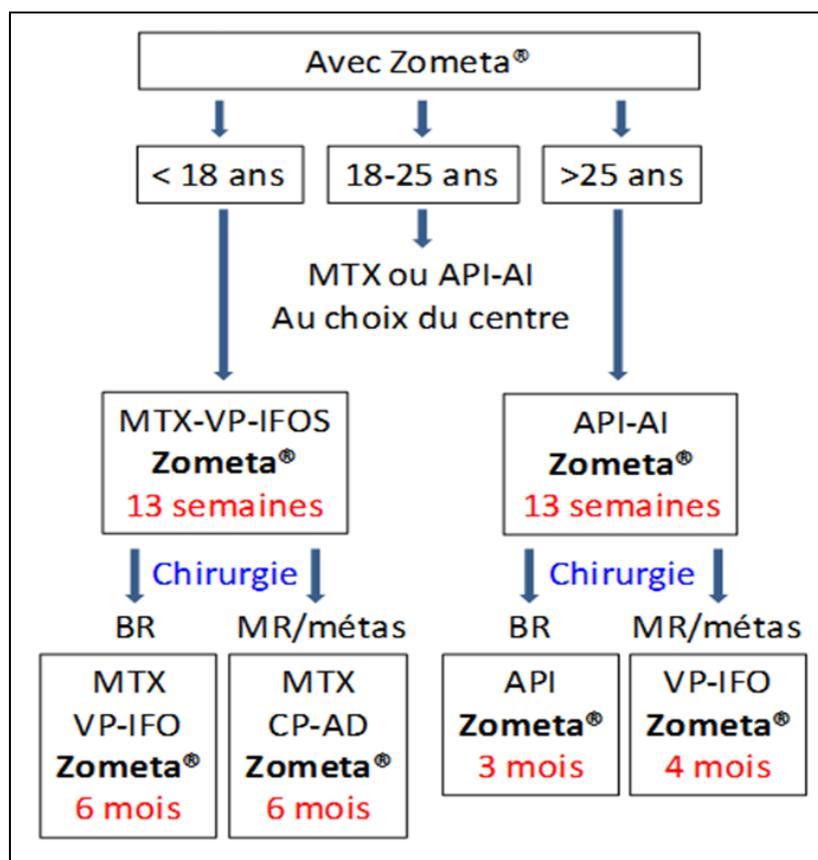


Figure 25 : Exemple de combinaisons de chimiothérapies utilisé dans l'essai clinique OS2006 dans le traitement de l'ostéosarcome en fonction de leur âge et de leur réponse aux traitements (bonne réponse, BR et mauvaise réponse, MR). Le ZOMETA est la forme commerciale de l'acide zolédronique, un biphosphonate testé en combinaison avec les traitements classiques de l'ostéosarcome : métotrexate (MTX), cure VP (VP16 et cis-platinum), cure API (adriamycine, cis-platinum, ifosfamide) et cure AI (adriamycine et ifosfamide)

4) Limites des traitements actuels

Même si cette combinaison chirurgie et poly-chimiothérapie a fait ses preuves du point de vue du traitement de la tumeur ainsi que du développement métastatique, le traitement présente des limites évidentes. Il est source de dégradation pour la qualité de vie du patient mais peut aussi induire des phénomènes de résistance. Enfin, malgré un traitement lourd, la récurrence peut survenir même des années après la disparition supposée de la tumeur (plusieurs cas ont été rapportés jusqu'à 10 ans après [229–231]).

La chimiothérapie, active sur les cellules tumorales, a également un effet sur les autres cellules en renouvellement, ce qui explique sa toxicité. L'effet de la chimiothérapie est d'autant plus important qu'il s'agit d'un tissu à renouvellement cellulaire rapide.

C'est ainsi que plusieurs toxicités sont observées chez le patient.

La toxicité hématologique peut être un facteur limitant du traitement par chimiothérapie. En effet, les 3 types cellulaires (globules rouges, blancs et plaquettes) sont atteints par cette toxicité. Cependant, seule la baisse des globules blancs et celle des plaquettes peut conduire à l'arrêt d'un cycle de chimiothérapie. Des traitements (transfusion sanguine, injection d'érythropoïétine) sont alors envisagés mais une surveillance constante est obligatoire pour s'assurer que le patient ne souffre pas d'infection.

La toxicité la plus connue est la toxicité digestive. En effet, les nausées et vomissements sont fréquents lors des cycles de chimiothérapie. Plusieurs points d'impact du traitement ont pu être notés : la stimulation des sécrétions gastrointestinales, la contraction de l'estomac et de l'œsophage, la contraction des muscles abdominaux du diaphragme et la stimulation des chémorécepteurs gastriques et des centres cérébraux du vomissement. D'autre part, la toxicité digestive se manifeste aussi sous forme de diarrhée ou de constipation.

Le traitement de chimiothérapie peut aussi impacter sur le muscle cardiaque ou sur l'artère coronaire. En effet, certaines molécules, comme la doxorubicine, entraînent des anomalies au niveau des mitochondries et des fibres musculaires du myocarde. Un suivi par échographie cardiaque est donc conseillé à chaque cycle de chimiothérapie. Les insuffisances coronaires peuvent induire des spasmes voire une nécrose des tissus.

La toxicité pulmonaire est principalement le fait d'infections dues à la baisse des cellules hématologiques.

Comme expliqué précédemment, les traitements anti-tumoraux peuvent être source de molécules toxiques pour le système urinaire. Des traitements protecteurs sont donc associés à la chimiothérapie comme le Mesna. Du fait de son rôle de filtre, le rein est rapidement atteint.

Enfin, la toxicité cutanéomuqueuse est classique sous chimiothérapie. La perte des cheveux et des poils est observée lors d'un traitement dont le catabolisme et le temps d'administration sont lents. La peau peut être atteinte par des problèmes de photosensibilisation.

Deux types de résistance à la chimiothérapie ont été observés : la résistance intrinsèque, propre à chaque type de tumeur, et la résistance acquise qui apparaît après sensibilisation de la tumeur au traitement.

Les principaux mécanismes moléculaires expliquant ces phénomènes de résistances sont :

- La surexpression de protéines membranaires, comme la gp170. Cette protéine de membrane est retrouvée naturellement dans les cellules de Kupfer pour détoxifier l'organisme, et surexprimée dans les cellules tumorales ayant acquis une résistance. Elle induit

la formation d'un flux de la molécule thérapeutique du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, ce qui réduit son efficacité.

- La mutation ou la surexpression de la cible de la molécule anti-cancéreuse, par la cellule tumorale, peut expliquer l'inefficacité du traitement.

- Les tumeurs modulent leur micro-environnement en recrutant des cellules inflammatoires et des cellules dérivées de la moelle osseuse [232–234]. Il a été montré récemment que ces cellules, en réponse aux thérapies, présentaient 2 comportements distincts. Elles peuvent aider à la reconstruction tissulaire [235] mais peuvent aussi aider à la progression tumorale [236]. Les CSM sont connues pour stimuler la croissance tumorale, augmenter l'angiogénèse et promouvoir le développement de métastases par la sécrétion d'un large panel de facteurs de croissance et de cytokines [236–239].

Enfin, la récurrence de la tumeur peut être observée après chirurgie et polychimiothérapie. Dans ce cas, les traitements sont fonction de la réponse aux premiers cycles de chimiothérapie. Si la réponse a été importante, la dose est augmentée pour les nouveaux cycles, mais si au contraire, la réponse était faible, alors un traitement par radiothérapie est envisagé.

C. Développement de nouvelles molécules thérapeutiques

Comme expliqué précédemment, les molécules de chimiothérapie actuelles présentent une forte toxicité, pour les cellules tumorales mais aussi pour les cellules saines. Le travail des chercheurs est donc maintenant le développement de thérapies ciblées. Pour cela, 2 types de ciblage sont envisagés : le ciblage du site tumoral et le ciblage des cellules tumorales.

Alors que la chimiothérapie traditionnelle vise à détruire les cellules au cycle cellulaire rapide, induisant de fortes toxicités pour les organes, les nouveaux types de drogues interfèrent au niveau moléculaire sur le développement du cancer. En effet, les traitements ciblent des molécules spécifiques pas ou très peu exprimées par les cellules saines. Dans ce type de thérapie, les drogues bloquent la croissance et la dissémination de la tumeur en interférant avec des molécules cibles qui visent la mort cellulaire, le développement tumoral, l'angiogénèse ou activent le système immunitaire pour favoriser la reconnaissance de la tumeur.

1) Ciblage du site osseux

Les biphosphonates (BP) sont des composés associant 2 groupes phosphonates liés à un carbone (P-C-P) qui ont une haute affinité pour les cristaux d'hydroxy-apatite permettant

ainsi leur concentration en site osseux. On distingue plusieurs classes de BP : les non-amino-BP (étidronate et clodronate) et les amino-BP (risédronate, alendronate, pamidronate, ibandronate, zolédronate) qui présentent une fonction amine terminale.

Ainsi, ils sont utilisés dans l'imagerie osseuse pour le diagnostic, comme vecteur de radio-nucléotides. Les BP se chélatent très facilement avec le technetium (Tc) et le rhenium (Re), tout en conservant leur propriété de ciblage à l'os. Par exemple, l'etidronate a été marqué avec le ^{99m}Tc et permet l'imagerie du squelette. D'autre part, il est plus stable que des agents développés précédemment, comme le ^{18}F -fluoride.

Les biphosphonates sont connus aussi pour leur activité anti-tumorale propre [240]. En effet, les biphosphonates interfèrent avec le microenvironnement osseux en ciblant les ostéoclastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires (macrophages associés à la tumeur et lymphocytes T). Le mode d'action des BP varie selon qu'ils ont ou non une fonction NH_2 . L'étidronate et le clodronate sont internalisés par les ostéoclastes au cours de la résorption de la matrice osseuse. Les molécules sont ensuite métabolisées en donnant des composés non hydrolysables de l'adénosine triphosphate. L'accumulation de ces composés entraîne une apoptose des ostéoclastes. Le mode d'action des amino-BP est surtout basé sur l'inhibition des enzymes clés de la voie du mévalonate dans les ostéoclastes qui empêche la production d'enzymes indispensables à l'activité ostéoclastique [241].

Les biphosphonates ont montré leur intérêt en cancérologie osseuse car ils réduisent le nombre d'événements osseux (hypercalcémie, douleurs, fractures pathologiques) et retardent leur apparition. L'association de l'acide zolédronique avec l'ifosfamide prévient les lésions ostéolytiques et diminue la croissance tumorale [242].

Du fait du ciblage à l'os et des propriétés anti-tumorales des biphosphonates, il semble très intéressant d'utiliser ces composés comme vecteur de molécules thérapeutiques puissantes.

D'autres études portent sur le ciblage à l'os et développent de nouvelles stratégies. Alors que l'alendronate reconnaît aussi bien les surfaces de formation que de résorption osseuse, la séquence de 8 motifs aspartate a montré sa forte affinité pour les zones de résorption. Au contraire, Yarbrough DK *et al.* ont montré en 2010 l'efficacité du peptide $(\text{AspSerSer})_6$ pour le ciblage des surfaces osseuses en formation [243]. Zhang *et al.* ont utilisés cette propriété en liant le peptide à un liposome cationique encapsulant un siARN dirigé contre *Plekho1*, un régulateur négatif de l'activité ostéoblastique [244,245]. Ils ont montré *in vitro* et *in vivo* l'efficacité du ciblage à l'os et de la délivrance du siARN permettant le blocage de la traduction de *Plekho1* et ainsi l'augmentation de la formation osseuse.

2) Ciblage de l'expression génique des cellules tumorales

Le profil moléculaire des tumeurs osseuses primitives a été étudié depuis plusieurs années par de nombreux groupes [246] et a révélé l'existence de 3 groupes spécifiques : les tumeurs avec une translocation spécifique combinée à des translocations chromosomiques accessoires (Sarcome d'Ewing, kyste osseux anévrysmal), les tumeurs avec une mutation ou une amplification génique (chondrosarcome, dysplasie fibreuse, chordome), et les sarcomes présentant une instabilité génique et une grande différence dans leur caryotype (ostéosarcome de haut grade). De ce constat, différentes stratégies de protocoles thérapeutiques ont été développées pour un traitement adapté au patient.

L'une de ces stratégies envisagées est l'utilisation de brins d'ARN comme inhibiteur de la traduction : les siARN. Aujourd'hui, l'ARN interférence est considérée comme un outil important dans l'étude de l'expression génique ainsi que pour l'analyse des mécanismes moléculaires de diverses maladies [247]. Le développement d'un siARN demande seulement de connaître la séquence de l'ARN cible et la molécule peut être combinée à d'autres siARN pour agir sur différentes cibles.

Le marqueur génétique le plus fréquent dans le Sarcome d'Ewing (85%) est la présence d'une translocation $t(11;22)(q24;q12)$ qui induit la fusion du gène EWS/FLI1 et ainsi l'expression d'une protéine chimérique régulant beaucoup d'autres gènes [248]. L'inhibition de la traduction de cette protéine par des stratégies anti-sens a montré son efficacité dans le traitement de la tumeur *in vitro* et *in vivo* [249]. Ce type de traitement permet le ciblage des cellules tumorales sans risque pour les cellules saines, et peut être associé à des vecteurs, comme les nanoparticules ou les liposomes, qui lui permettent d'améliorer son adressage à la cellule cible [249].

3) Ciblage des protéines de surface

Différentes molécules thérapeutiques peuvent cibler préférentiellement les cellules tumorales.

TRAIL, ou Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand est un membre de la super famille TNF capable d'initier l'apoptose à travers ses récepteurs de mort, DR4 et DR5. TRAIL est une protéine transmembranaire découverte indépendamment par deux groupes distincts en 1995 et 1996 [250][251].

Comparées aux cellules saines, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL après un premier traitement par TRAIL. Ceci peut s'expliquer par la forte expression des récepteurs de mort DR4 et DR5 sur les cellules tumorales [252]. Pourtant,

en étudiant les récepteurs à TRAIL, il a été montré que l'expression des ARNm des récepteurs est identique dans les deux types cellulaires [253]. Ce qui peut être expliqué par l'expression des récepteurs régulateurs (DR1 et DR2) par les cellules saines et non par les cellules malignes [254]. Cette différence de sensibilité à l'apoptose entre les cellules cancéreuses et les cellules saines, confère à TRAIL une place privilégiée parmi les molécules thérapeutiques. Les tests *in vitro* laissent présager une forte atteinte des cellules tumorales sans endommagement des cellules saines du micro-environnement [255]. Plusieurs études cliniques ont été menées sur l'effet de TRAIL dans le développement de cancers colorectaux, ovariens, pulmonaires. Durant ces tests, TRAIL a été combiné à des traitements de chimiothérapie. Ces études montrent que le traitement ne présente aucun effet secondaire mais certains effets positifs sur le développement tumoral, allant de la stabilisation de la maladie à une réponse complète [256].

D'autre part, les anticorps thérapeutiques permettent la reconnaissance de protéines telle que la protéine de surface CD99, exprimée par les cellules du sarcome d'Ewing. La protéine CD99 est impliquée dans la migration des leucocytes, l'adhésion entre cellules et l'apoptose des lymphocytes et des cellules de sarcome d'Ewing. Une étude a montré l'efficacité de l'association anticorps anti-CD99/doxorubicine dans le traitement des tumeurs du sarcome d'Ewing et dans le développement des métastases [257]. D'autre part, aucun effet toxique n'a pu être associé à l'utilisation de cet anticorps thérapeutique.

De même, la thérapie anti-CD20 est envisagée dans le myélome multiple. En effet, cet antigène est impliqué dans la prolifération d'une sous-population des lymphocytes B essentielle pour le développement tumoral. Le rituximab est un anticorps chimérique souris/humain anti-CD20. Malgré la promesse de ce traitement, l'effet de l'anticorps thérapeutique anti-CD20 sur le myélome multiple n'est pas encore bien défini (effet dépendant du patient). Cependant, le dosage, la durée du traitement et la combinaison avec d'autres molécules thérapeutiques doivent être testés afin d'améliorer la réponse [258].

II- Stratégies d'étude :

Dans ce contexte, nous avons souhaité optimiser le modèle de tissu osseux, mis au point dans le chapitre précédent, pour l'étude de l'ostéosarcome et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour cela, les cellules d'ostéosarcome ont été cultivées sur la structure 3D hybride constituée des CSM et BCP.

Cet outil a été utilisé par la suite pour le test de différentes stratégies de ciblage de la tumeur osseuse : le ciblage à l'os et le ciblage des cellules tumorales.

III- Matériels et Méthodes :

A. Les biomatériaux : phosphate de calcium biphasé

Nous avons utilisé comme précédemment des particules de BCP (MBCP+®, Biomatlante), dont la composition était de 20% d'HA et de 80% de β -TCP.

Pour ces expérimentations, les particules présentaient une granulométrie comprise entre 125 et 200nm. Des aliquots de 8 mg de particules sont préparés et stérilisés à l'autoclave. Pour l'expérimentation, les particules sont déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits non adhérente et recouvertes de PBS.

B. Les cellules

Les cellules souches mésenchymateuses ont été obtenues à partir de prélèvements de moelle osseuse de patients (l'Institut für Transfusionsmedizin, Ulm, Allemagne). Les CSMs ont été isolées par adhérence au plastique de culture puis amplifiées à raison de 10 000 CSMs/cm² dans un milieu de prolifération.

Une lignée de cellules d'ostéosarcome humain a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection ; MNNG/HOS, ATCC n°CRL-1547). Cette lignée a été isolée à partir d'un ostéosarcome chez une jeune fille âgée de 13 ans dans les années 1970. Ces cellules ont été transformées par un puissant carcinogène qui les rend tumorigènes chez la souris, MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine). Des cellules MNNG/HOS ont été modifiées par un vecteur viral exprimant la luciférase firefly (LucF) et la « green fluorescent protein » (GFP).

C. L'association cellules et biomatériaux

Un agrégat de cellules et de particules est réalisé de la même façon que dans le chapitre précédent. Brièvement, $0,16 \times 10^6$ CSM sont associées dans 50 μ l, aux 8 mg de particules de BCP. Un agrégat se forme dans les 24 heures suivant le dépôt des cellules.

Après 7 jours de culture, 2×10^3 cellules HOS sont déposées, sur l'agrégat de CSM et particules, dans un volume de 100 μ l de milieu de prolifération.

La co-culture est poursuivie pendant 7 jours.

D. Etude de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements phosphonate

L'institut Max Plank (Mainz, Allemagne) a mis au point des nanoparticules biodégradables composées de 5,6-benzo-2-méthylène-1,3-dioxépane (BMDO) [259]. Ces

nanoparticules ont été fonctionnalisées avec du phosphonate lié de façon covalente, permettant une liaison au phosphate de calcium (Figure 26). Plus tard, les nanoparticules devraient être associées à un agent de chimiothérapie comme le paclitaxel, pour une délivrance du traitement en site osseux. Les nanoparticules présentent un marqueur fluorescent (PMI, excitation 488 nm, émission 530 nm).

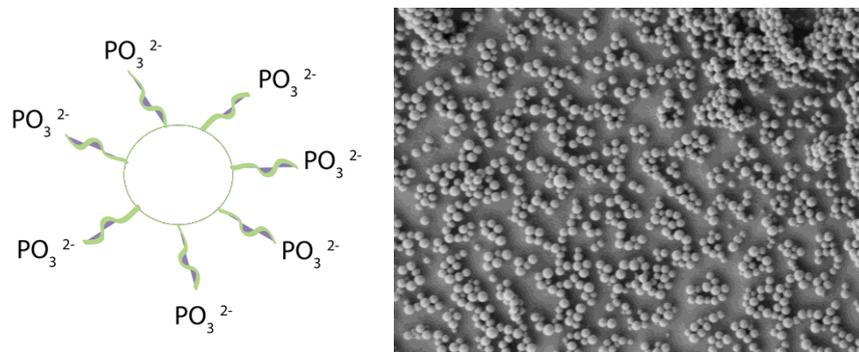


Figure 26 : Schéma et image MEB des nanoparticules de BMDO

E. Etude de l'effet de TRAIL dans un modèle d'ostéosarcome en 3D

Afin de valider l'utilisation d'un modèle 3D de l'ostéosarcome, TRAIL a été étudié comme inducteur de l'apoptose des cellules tumorales. Dans cette expérience, un anticorps monoclonal agoniste de TRAIL, le Conatumumab ou AMG655, a été utilisé. Il se fixe sur les récepteurs DR5 et induit l'apoptose de la cellule. L'AMG a été utilisé à une concentration de 1 µg/ml.

F. Etude de siARN associés à un peptide pour le ciblage des surfaces osseuses

1) Séquences des siARN utilisés

Les siARN sont synthétisés chimiquement par Eurogentec et fournis lyophilisés sous forme double brin. Les siARN sont mis en solution à une concentration finale de 100 µM ou 1.33 µg/µL (solutions stock) dans de l'eau stérile sans RNase. Un siARN ne présentant aucune homologie avec les séquences humaines ARNm a été utilisé comme contrôle négatif et désigné siARN Ct. Un siARN validé précédemment comme ciblant la séquence de la luciférase firefly a été utilisé et désigné siARN LucF [260].

Oligonucléotides	Séquence (5' → 3') Brin sens / Brin antisens	Longueur de la séquence
Séquence contrôle (siCt)	UUCUCCGAACGUGUCACGU ACGUGACACGUUCGGAGAA	21 bases
Séquence luciférase (siLucF)	CUUACGCUGAGUACUUCGA UCGAAGUACUCAGCGUAAG	21 ases

2) Passage de la membrane cellulaire et stratégie de ciblage

Bien que le transfert d'acides nucléiques nus a montré quelques résultats intéressants [261], l'efficacité et la spécificité de la transfection *in vivo* de siARN injectés localement ou par voie systémique dans des modèles de tumeurs requiert des quantités élevées de siARN ainsi qu'un système de pénétration des membranes. En effet, le passage de la membrane plasmique est une étape compliquée. D'autre part, l'efficacité peut aussi être altérée par la stabilité du siARN. En effet, dans le sérum, les siARN nus ont une demi-vie très courte due à la présence de nucléases, à celle des macrophages éliminant les siARN et à l'excrétion très rapide par les reins. Enfin, la matrice extracellulaire peut être aussi un frein à la diffusion des siARN du fait de la présence en grandes quantités de polysaccharides et protéines fibreuses.

C'est pourquoi les équipes de recherche développent des vecteurs pour le transfert de gène afin d'améliorer la stabilité durant le transport par protection du matériel génétique. Les liposomes se présentent comme des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques séparant un milieu intravésiculaire aqueux du milieu extérieur et permettant l'introduction des acides nucléiques via la formation d'endosomes (Figure 27). Ils sont constitués de lipides cationiques présentant 3 parties : une tête polaire chargée positivement permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison séparant les 2 éléments. L'association liposome et acide nucléique est appelé lipoplexe.

Les lipides cationiques sont nombreux et peuvent être remplacés par des co-lipides. Des co-lipides tels que le DOPE (dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine) phospholipide neutre, le cholestérol et ses dérivés permettent de stabiliser les lipoplexes formés et d'atteindre le meilleur taux de transfection *in vivo*.

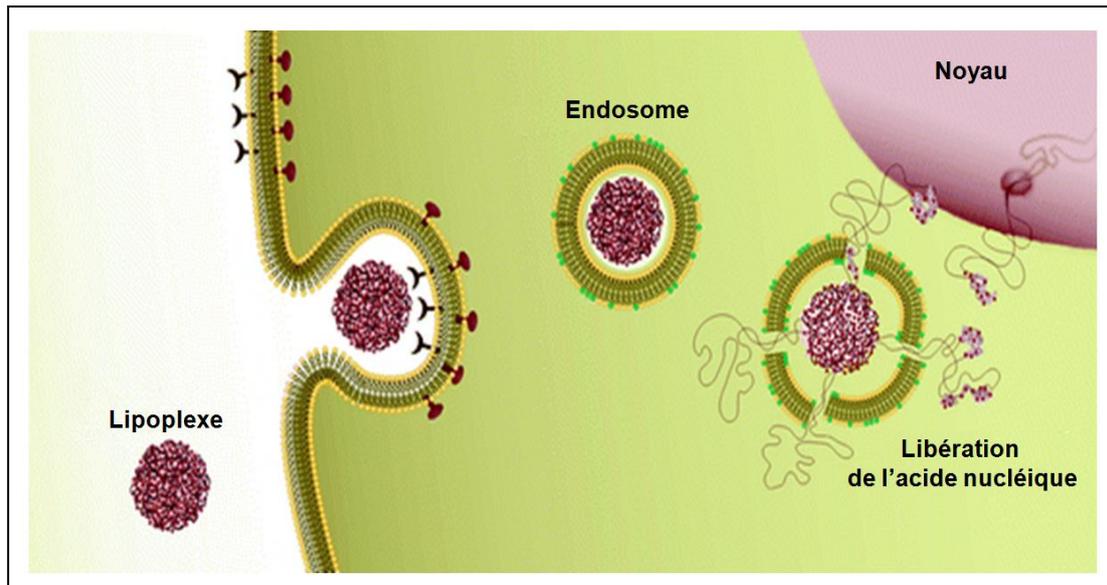


Figure 27 : Système de délivrance des acides nucléiques en utilisant les liposomes cationiques. Modifié à partir de Coelho J et al., 2013 [262]

Dans cette étude, nous avons comparé l'utilisation de deux vecteurs de siARN.

Comme contrôle de notre étude, nous avons utilisé le liposome cationique RPR209120/DOPE [263,264] (fourni par V. ESCRIOU ; UMR 8151, université Paris-Descartes, France) mélangé à l'association du plasmide pSL301 (Addgene, Cambridge, USA) et du siARN dans une solution de NaCl 150 mM. Du fait des 3 groupements positifs du liposome, un ratio de 6 nmol de liposome a été associé à 1 µg d'acide nucléique (comprenant le siARN et le plasmide).

Afin de vectoriser le siARN, un peptide a été utilisé en association à un groupement cholestérol. Le peptide (AspSerSer)₆ a été montré comme ciblant les surfaces osseuses en formation [245]. Le cholestérol devrait permettre le passage de la membrane plasmique [261]. Ainsi, le brin sens du siARN a été couplé en 3' au peptide et en 5' au cholestérol (Figure 28). L'extrémité 5' du brin anti-sens du siARN ne doit pas être modifiée pour activer correctement la dégradation de l'ARN complémentaire. Pour cette expérience, les brins sens et antisens sont mélangés et le mélange est déposé sur les cellules.

Les siARN ont été utilisés à une concentration finale de 1 µg/mL.

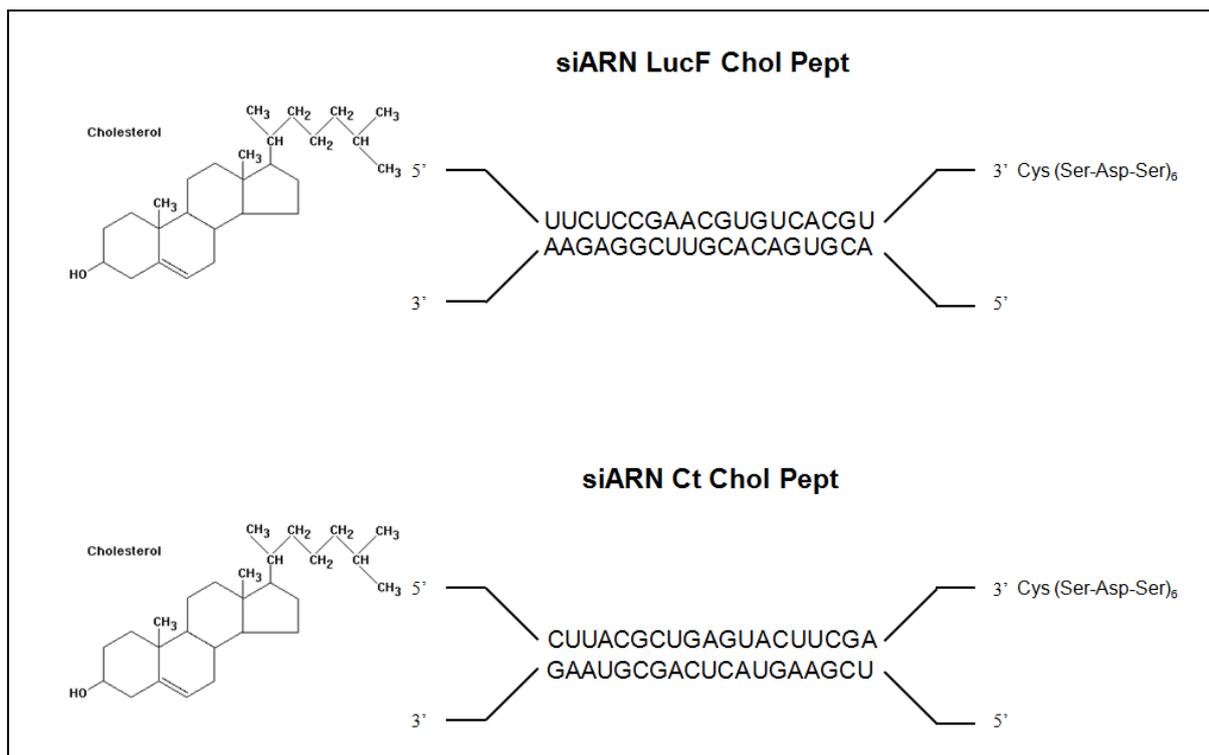


Figure 28 : Association des siARN Ct et LucF au cholestérol en 5' et au peptide en 3' du brin sens.

G. Evaluation de l'efficacité de la transfection par mesure de l'activité luciférase

Un des systèmes rapporteurs de l'efficacité de la transfection les plus utilisés est le système basé sur l'expression de la protéine bioluminescente luciférase. L'enzyme catalyse l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et de O_2 pour générer de l'oxoluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562 nm. La détection de l'activité luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout du substrat luciférine.

Le kit Dual-Luciferase® reporter (DLR™) assay system (Promega) permet d'étudier l'activité des protéines luciférasees *fyrefly* (*photinus pyralis*) et *renilla* (*renilla reniformis*). Dans cette expérience, seule la luciférase *fyrefly* est quantifiée. Pour cela, les cellules sont lysées dans 100 μ l de solution de lyse. Puis, l'agent luciférase est ajouté à 20 μ l du lysat cellulaire. La réaction est alors mesurée par spectrophotométrie. Les résultats correspondant à l'activité luciférase sont exprimés en pourcentage de l'activité contrôle.

H. Etude de la survie cellulaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est utilisée pour évaluer le pourcentage de cellules mortes ou en apoptose dans nos conditions de culture. Apo2.7 est une protéine de la membrane mitochondriale détectée dans les premiers temps de l'apoptose. L'anticorps monoclonal

anti-Apo2.7 couplé à la phyco-érythrine (PE) est utilisé pour détecter l'induction de l'apoptose dans nos conditions de culture. Le fluorochrome TO-PRO-3 (Life Technologies) permet d'identifier les cellules dont la membrane plasmique est compromise.

Pour cela, les cellules décollées de leur substrat sont marquées par l'anticorps anti Apo2.7 (5 µl pour 1×10^5 cellules) pendant 30 minutes sur glace et par le TO-PRO-3 (100 µl de solution à 0,3 µM pour 1×10^5 cellules). Les cellules sont alors immédiatement étudiées à 575 nm et 661 nm.

IV- Résultats :

A. Etude de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements phosphonates

Les nanoparticules de BMDO ont été fonctionnalisées par des groupements phosphonate liés de façon covalente, permettant une liaison au phosphate de calcium. Elles présentent aussi un marqueur fluorescent (PMI).

Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier l'adhésion des nanoparticules à différents supports de phosphate de calcium (BCP et fémur de souris) afin de prouver l'efficacité de la fonctionnalisation par des biphosphonates et leur affinité pour la matrice minéralisée du tissu osseux. Puis nous avons étudié la pénétration des nanoparticules dans les cellules d'ostéosarcome *in vitro* et la distribution *in vivo*.

1) Adhésion des nanoparticules sur différents supports de phosphate de calcium

L'adhésion des nanoparticules a été testée sur un biomatériau de phosphate de calcium biphasé (0,5-1 mm, BCP, Biomatlante) et sur du tissu osseux, un fémur de souris. Quelques microlitres de nanoparticules ont été déposés sur chaque échantillon et un lavage a été effectué avant l'observation au MEB.

Les images en MEB montrent l'adhésion importante et homogène des nanoparticules à la surface des 2 échantillons prouvant ainsi la fonctionnalisation des nanoparticules pour le phosphate de calcium (Figure 29). Les nanoparticules peuvent ainsi être envisagées comme vecteur à l'os de molécules thérapeutiques. Aucune quantification n'a été réalisée pour mesurer le taux d'adhérence.

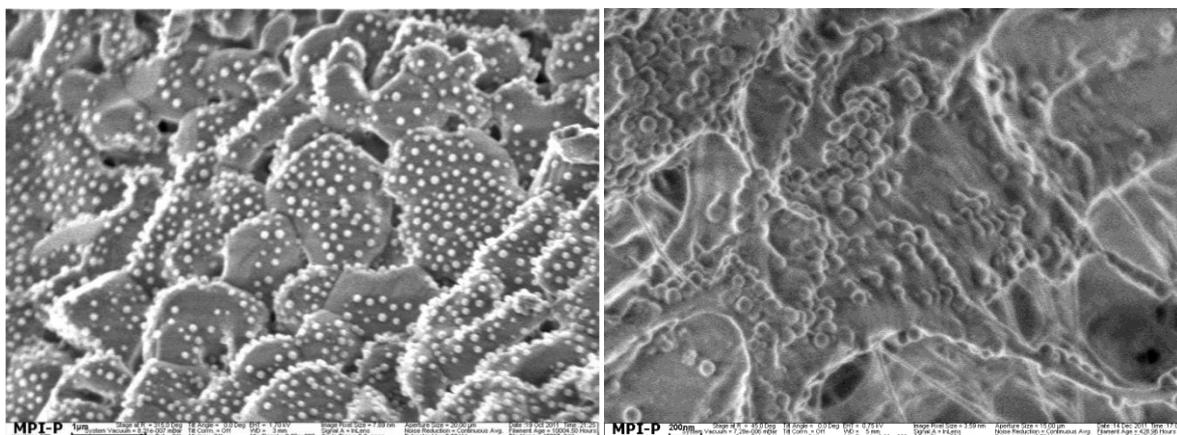


Figure 29 : Images MEB des particules de BMDO fonctionnalisées sur différentes surfaces : BCP 0,5-1mm de Biomatlante et du fémur de souris. Les nanoparticules apparaissent sous forme de sphères de taille nanométrique.

2) Pénétration des nanoparticules dans des cellules d'ostéosarcome

La pénétration des nanoparticules de BMDO a été testée sur des cellules d'ostéosarcome humain MNNG/HOS.

Les études de microscopie confocale et de cytométrie en flux ont été réalisées sur 30 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Les nanoparticules (75 ng/ml) ont été déposées sur la culture après 24h d'adhésion.

L'observation des nanoparticules et des cellules par microscopie confocale a été réalisée sur des cellules fixées au PFA 4%. La membrane a été marquée par cell mask orange (1/1000, 15 minutes, Invitrogen). Ces images nous montrent qu'après 24h de traitement, les nanoparticules sont internalisées dans les cellules (Figure 30). Après 1h de traitement, il semble que les nanoparticules atteignent la périphérie des cellules.

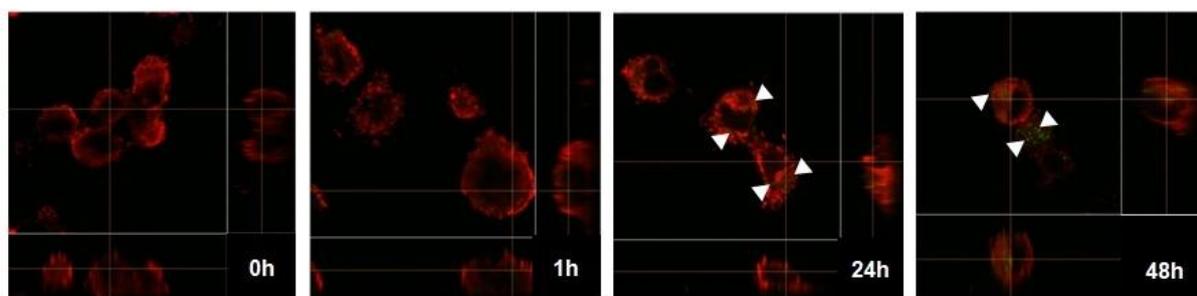


Figure 30 : Observation en microscopie confocale de la pénétration des nanoparticules (flèches blanches), en fonction du temps, dans des cellules MNNG/HOS dont la membrane plasmique a été marquée par du cell mask orange (Invitrogen)

Par la suite, nous avons souhaité vérifier la toxicité des nanoparticules. Ce test a été réalisé par cytométrie en flux en présence de TO-PRO-3 (émission en FL4).

L'observation du pic de fluorescence en FL1, du à la fluorescence des nanoparticules (PMI), montre un décalage dès 1h (Figure 31). Ces résultats confirment l'observation en microscopie. En effet, les cellules ayant subi une perméabilisation afin d'observer l'intégration des nanoparticules, il est impossible de déterminer si les nanoparticules ont pénétré la membrane cellulaire. Le pic de fluorescence est donc décalé même en cas de contact et non pénétration de la membrane.

Moins de 10% de la population cellulaire ayant intégré les nanoparticules conservent une parfaite intégrité membranaire, tandis que plus de 90% sont légèrement marquées par le TO-PRO-3, détecté en FL4), indiquant une atteinte de l'intégrité de leur membrane (Figure 31). Cependant, lors d'un contrôle de mort cellulaire en présence de Formol 4% pendant 12 heures, l'absorption du TO-PRO-3 par les cellules MNNG-HOS était supérieure de 2 logs par

rapport à celle observée en présence des nanoparticules (résultats non montrés), laissant supposer une faible toxicité des nanoparticules.

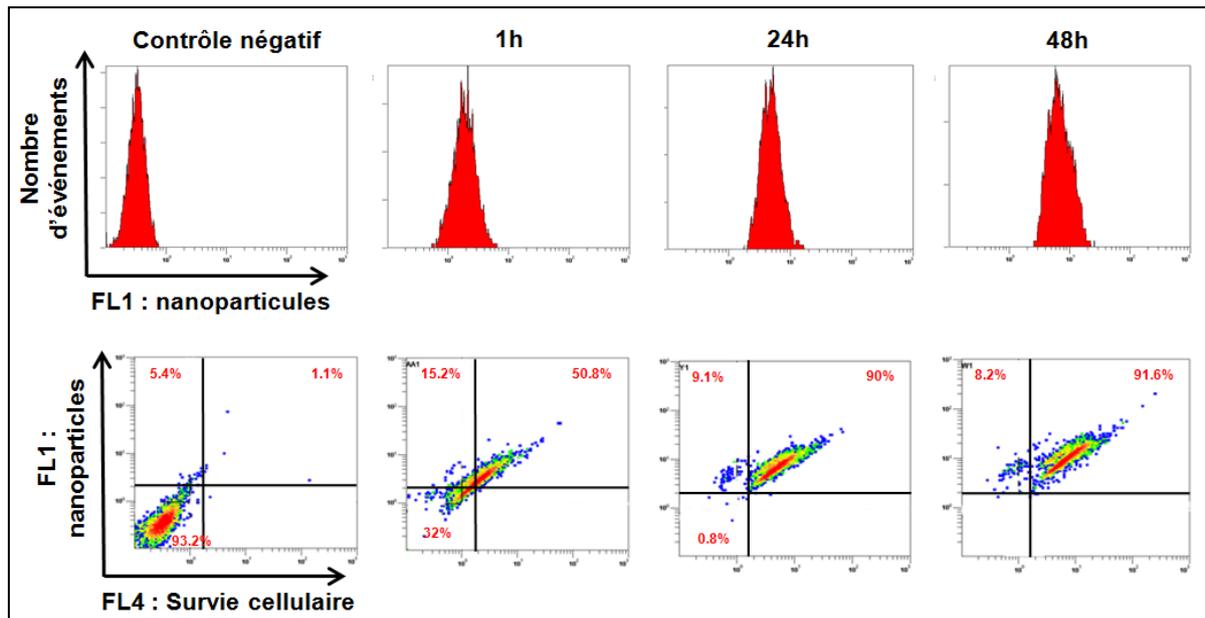


Figure 31 : Survie cellulaire des cellules MNNG/HOS mesurée par cytométrie en flux après traitement avec les nanoparticules et marquage par un intercalant d'ADN, le TO-PRO-3, indiquant la survie cellulaire. Le contrôle négatif correspond aux cellules sans nanoparticule.

Enfin, cette étude a été poursuivie par une expérimentation *in vivo* afin de déterminer la distribution des nanoparticules. Pour cela, 20 ng de nanoparticules ont été injectés en intra-cardiaque chez des souris âgées de 10 jours. Les animaux (n=6) ont été euthanasiés 24h après le traitement. Le corps entier a été décalcifié et cryoprotégé dans 2 solutions de sucrose (3 et 6%) avant d'être inclus puis coupé au cryostat. Enfin, une reconstitution du corps entier a été réalisée par microscopie confocale.

La superposition de l'image en visible (Figure 32 gauche) et de l'image obtenue après excitation dans la longueur d'onde (488 nm) nous a permis de déterminer la localisation des nanoparticules (Figure 32). Le fluorochrome des nanoparticules a permis de les localiser au niveau pulmonaire. Aucun marquage n'a été détecté sur un site osseux. Une étude à fort grossissement des images en confocal a permis d'observer une forte agrégation des nanoparticules. Les amas étant souvent de la taille du nanomètre, il est fort probable que les nanoparticules aient formé des agrégats insolubles qui n'ont pu passer la barrière des alvéoles pulmonaires pour rejoindre la circulation sanguine.

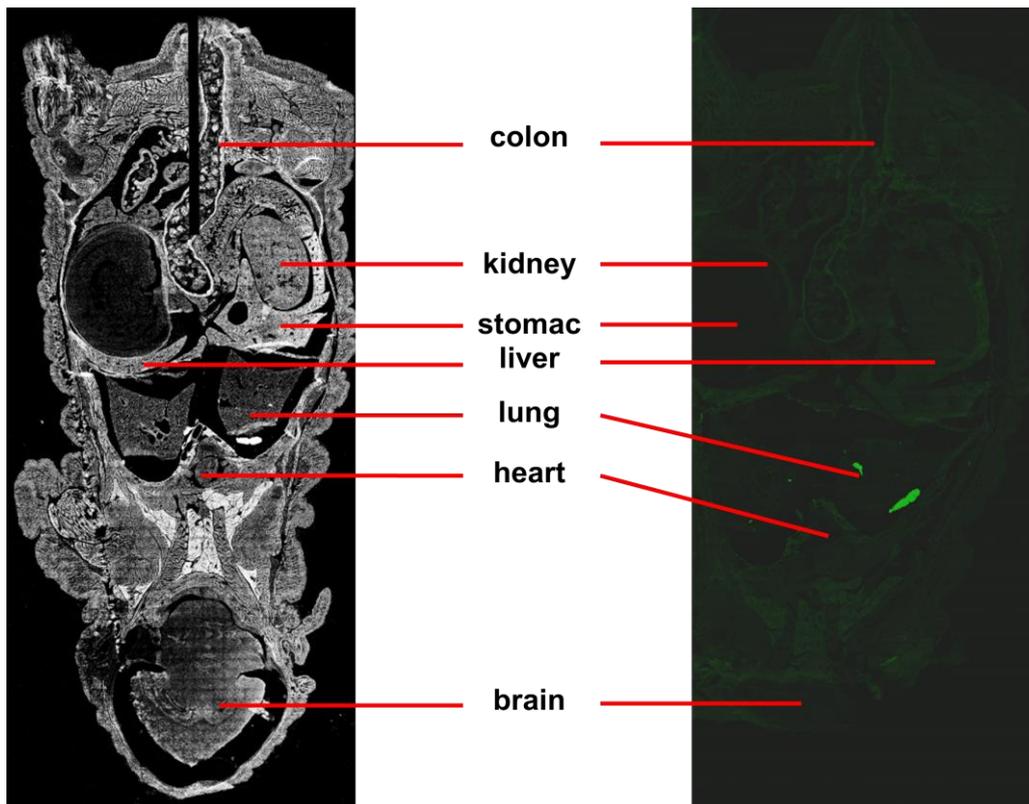


Figure 32 : Observation par microscopie confocale de la distribution des nanoparticules chez une souris jeune après 24h. Les observations sont réalisées par compilation d'images confocale prises en visible (à gauche) et après excitation de la longueur d'onde 488nm (à droite)

Initialement, ce projet devait être de tester un cargo transportant un traitement de chimiothérapie et ciblant les surfaces osseuses. Notre étude a montré l'efficacité des nanoparticules à adhérer aux surfaces osseuses et à pénétrer les cellules. Cependant, aucune nanoparticule, associant les groupements phosphonates et la molécule de taxol, n'a pu être fournie par l'Institut Max Planck, ne nous permettant pas d'évaluer l'effet toxique du traitement de chimiothérapie ainsi couplé.

B. Etude du développement tumoral en 3D

Afin de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques ou étudier le comportement des cellules tumorales dans un microenvironnement 3D, nous avons tenté de développer un modèle 3D de culture *in vitro* de cellules d'ostéosarcome humain. Pour cela, dans un premier temps, des cellules MNNG/HOS ont été déposées sur des particules de phosphate de calcium BCP.

Cette lignée cellulaire étant issue d'un ostéosarcome ostéo-condensant caractérisé par la sécrétion d'une matrice ostéoïde, nous avons supposé qu'en contact avec un support phosphocalcique poreux, les cellules d'ostéosarcome MNNG/HOS sécrèteraient de la

matrice de la même façon que les CSM. Malgré leur forte adhérence aux particules de BCP et leur prolifération, les cellules MNNG/HOS ne sécrètent pas une matrice suffisante pour permettre la formation d'une structure en 3D.

Afin de reproduire le micro-environnement tumoral et étudier le développement des cellules tumorales dans un environnement 3D stromal, nous avons reproduit le modèle de tissu osseux 3D miniaturisé utilisé dans le chapitre précédent. Après la formation de la structure 3D compacte et 7 jours de culture, 2×10^4 cellules MNNG/HOS sont déposées et cultivées pendant 7 jours.

Les observations en MEB de la co-culture à 7 jours montrent la dégradation de la matrice formée par les CSM suite à l'addition des cellules MNNG/HOS (Figure 33). En effet, en comparaison de la structure hybride BCP/CSM (Figure A et C), les fibres reliant les particules entre elles sont moins nombreuses et semblent moins longues dans le cas d'une co-culture avec les cellules d'ostéosarcome.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour ce phénomène : les CSM ne survivent pas à ce contact avec les cellules tumorales ou les cellules tumorales produisent des protéases, telles que les MMP, dégradant la matrice formée par les CSM.

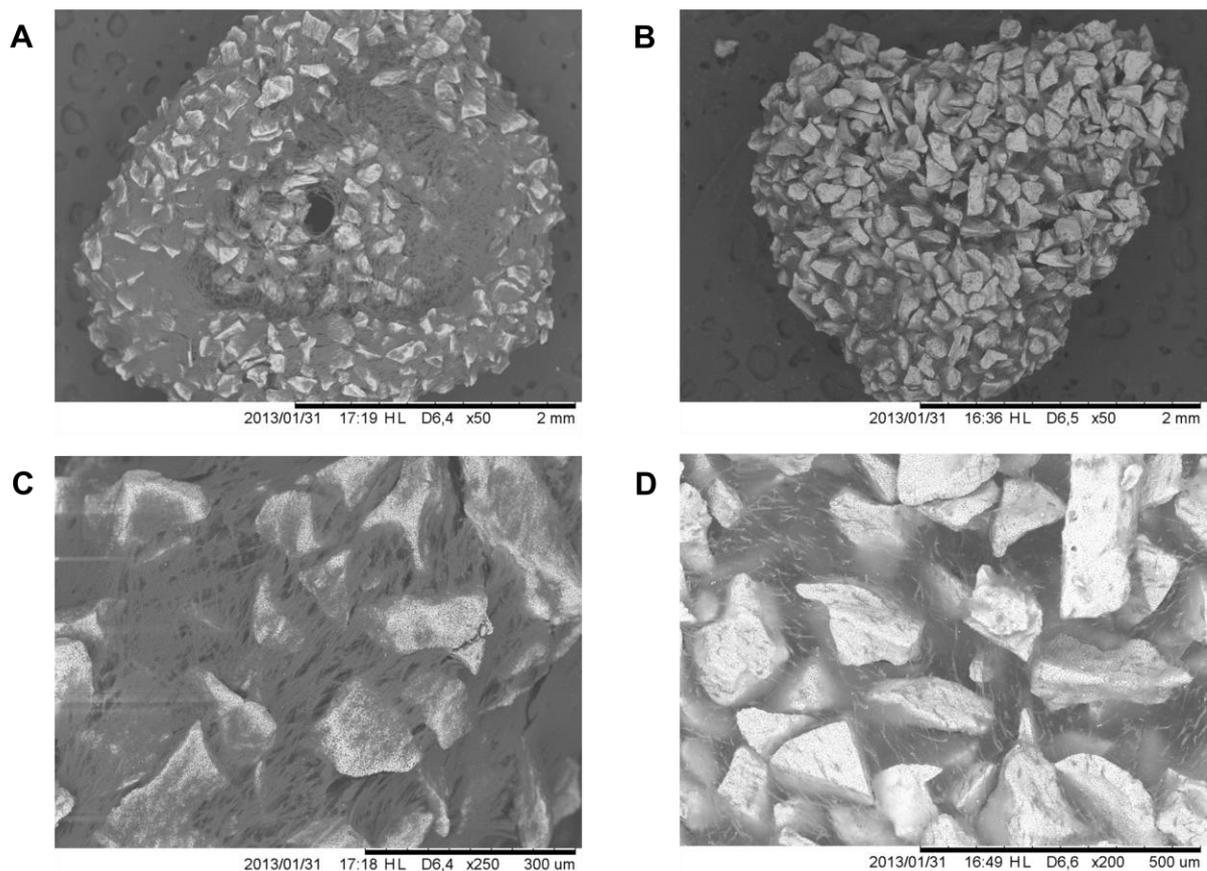


Figure 33 : Observations en MEB des structures 3D obtenues après culture des CSM pendant 14 jours (A et C) et coculture avec les cellules d'ostéosarcome MNNG/HOS pendant 7 jours (B et D). (Grossissement x50 A et B, x200 C et D).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons étudié l'apoptose dans les structures 3D de co-culture.

Pour cela, après 3 et 4 jours de co-culture CSM et cellules MNNG/HOS, les cellules ont été extraites de la structure hybride par un traitement à la collagénase. Les 2 types cellulaires sont distingués du fait de la fluorescence en GFP des cellules MNNG/HOS. La culture des CSM sur les particules de BCP ne semble pas induire d'apoptose des cellules après 3 jours. Une légère augmentation est observée après 4 jours (de 1,57% à 9,07%, Figure 34) mettant en évidence une limite du modèle de culture 3D. Les résultats obtenus pour la co-culture des CSM avec les cellules MNNG/HOS étaient identiques après 3 et 4 jours. Le dépôt des cellules d'ostéosarcome sur la structure 3D hybride semble induire une forte apoptose des CSM (de 70,2% à 94,8%). Aux 2 temps de culture testés, l'apoptose augmente avec la dose de cellules MNNG/HOS déposées sur la structure hybride. Au contraire, peu d'apoptose des cellules d'ostéosarcome est observée dans ces conditions (Figure 34).

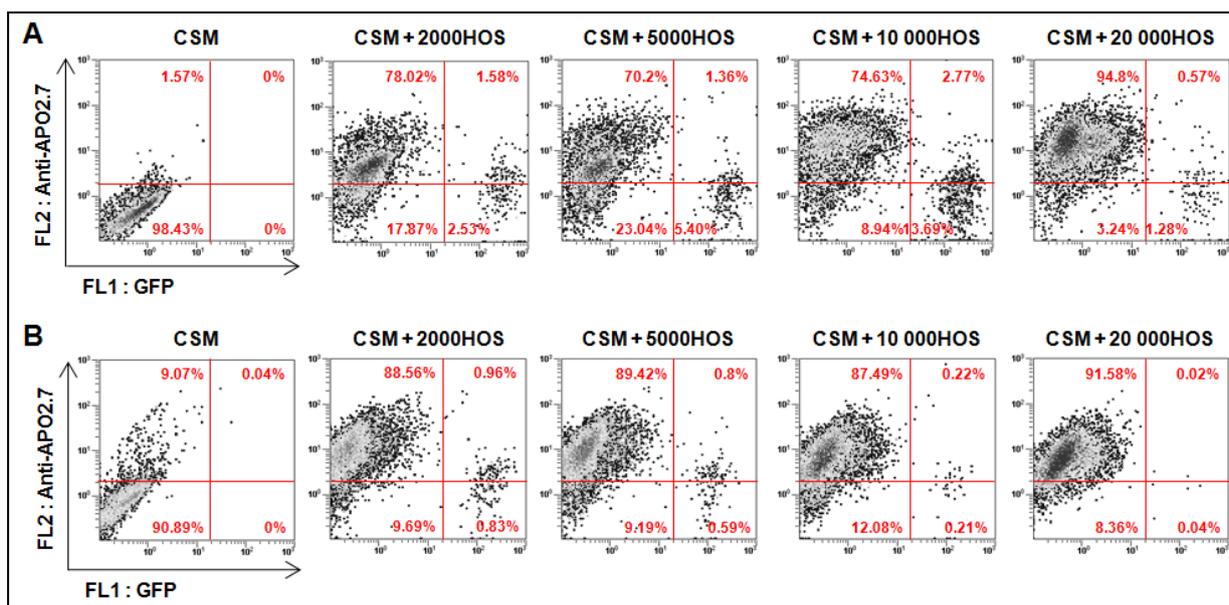


Figure 34 : Etude de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage par l'anticorps anti-Apo2.7 des cellules extraites des structures 3D hybrides, par traitement à la collagénase, après 3 (A) et 4 jours (B) de la co-culture CSM et cellules MNNG/HOS. Différentes quantités de cellules MNNG/HOS ont été testées en co-culture avec les CSM en 3D (de 2000 à 20 000). Les pourcentages représentent la quantification de l'expression protéique de GFP et du marquage Apo2.7.

La destruction de la matrice de la structure 3D semblerait ainsi provenir de l'augmentation de la mortalité des CSM en présence des cellules MNNG/HOS. Cependant, une étude complémentaire de la sécrétion des MMP par zymographie permettrait de comprendre les mécanismes qui interviennent dans cet environnement 3D. Une étude

préliminaire a été réalisée et a montré une augmentation de la MMP9 proportionnelle à la quantité de cellules MNNG/HOS cultivées (résultats non montrés).

C. Etude de l'effet de TRAIL dans un modèle d'ostéosarcome en 3D

Enfin, le modèle de culture 3D d'ostéosarcome a été utilisé pour le test d'un agoniste de Trail, AMG655. L'effet de Trail sur l'apoptose des cellules de sarcome d'Ewing a été montré par Picarda *et al.* en 2013 [202]. Cependant, son action sur les cellules d'ostéosarcome n'est pas prouvée car une résistance se met en place dans ce type de tumeurs.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à montrer cette résistance dans le modèle de cellules MNNG/HOS cultivées en 2D. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet que le microenvironnement pourrait jouer dans ce mécanisme de résistance. Pour cela, la co-culture en 3D de CSM et MNNG/HOS en 3D a été traitée après 3 jours avec l'AMG655.

Ainsi, 10 000 cellules MNNG/HOS ont été exposées à 1 µg/mL d'AMG655, 24h après leur ensemencement en plaque de culture 24 puits. La mesure de l'activité de bioluminescence a été réalisée 48 heures après le début du traitement. On constate que le traitement à l'AMG655 n'a aucun effet sur la quantité de photons émis (Figure 35). Cela suppose que le nombre de cellules dans les 2 conditions est identique. L'AMG655, à cette concentration n'a donc aucun effet sur la viabilité des cellules d'ostéosarcome humain MNNG/HOS alors que le même traitement a été montré efficace dans le sarcome d'Ewing.

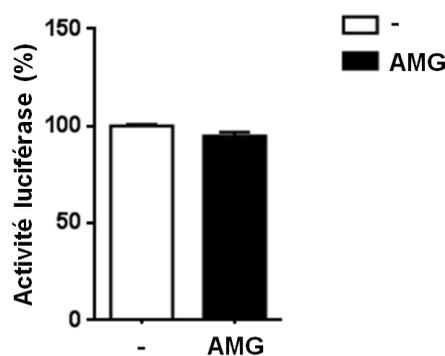


Figure 35 : Activité luciférase après 48 heures de traitement des cellules MNNG/HOS cultivées en plaque 24 puits en présence de 1 µg/mL d'AMG655, agoniste de TRAIL.

Enfin, l'effet du traitement de la co-culture 3D par 1 µg/mL d'AMG655 pendant 48 heures a été étudié. Seules 2×10^3 cellules MNNG/HOS sont déposées sur la structure hybride

pour induire le minimum d'apoptose. Les résultats obtenus montrent que le traitement à l'AMG655 induit la disparition des cellules d'ostéosarcome (Figure 36).

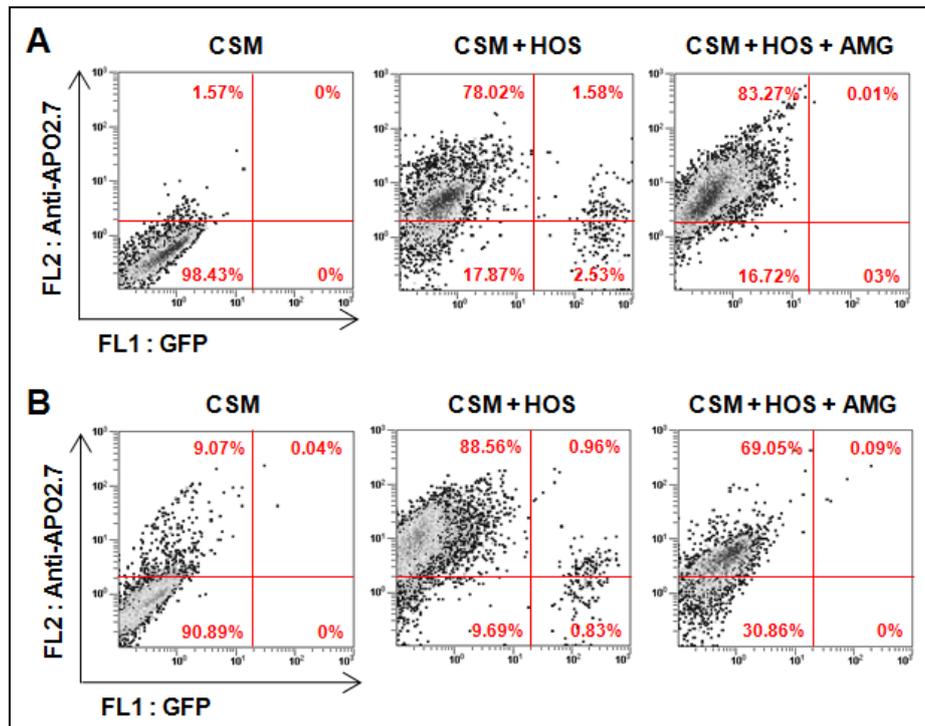


Figure 36 : Etude de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage par l'anticorps anti-Apo2.7 des cellules extraites des structures 3D hybrides après 3 (A) et 4 jours (B) de la co-culture CSM et cellules MNNG/HOS traitées ou non 48 heures avec 1 µg/mL d'AMG655.

En effet, les cellules MNNG/HOS détectées dans la 2eme condition par leur fluorescence en GFP, disparaissent en présence du traitement AMG655.

Les résultats montrent donc que les cellules MNNG/HOS sont sensibles au traitement par l'AMG655. Cette sensibilisation pourrait provenir de la présence des cellules souches mais aussi de la culture en 3D sur une matrice extracellulaire. Afin de discriminer l'effet des CSM dans ce phénomène, des études, de développement des cellules tumorales, pourraient être menées sur la culture hybride CSM et BCP après irradiation des CSM. Cette structure conserverait ses propriétés chimiques et mécaniques propres à la matrice produite par les CSM mais sans celles-ci.

D. Etude de siARN associés à un peptide pour le ciblage des surfaces osseuses

Afin de vectoriser des chaînes d'acides nucléiques au tissu osseux, le peptide (AspSerSer)₆ a été utilisé en association avec du cholestérol. Ce peptide a prouvé son efficacité dans le ciblage des surfaces osseuses [245]. Plusieurs études ont montré l'intérêt du couplage des acides nucléiques au cholestérol pour le passage des membranes et Yuan H,

et al. ont démontré en 2008 son efficacité dans la délivrance *in vivo* dans un modèle de diabète induit [265].

1) Etude de l'efficacité de la transfection en 2D

Afin de vérifier l'efficacité de la transfection avec cette association, 2 siARN ont été utilisés, le siARN Ct (aucune cible intracellulaire) et le siARN LucF (ciblant le transcrite codant pour la luciférase firefly) sur des cellules MNNG/HOS modifiées pour exprimer la protéine luciférase. Cette transfection est comparée à celle obtenue en utilisant le liposome RPR209120/DOPE connu pour son excellente efficacité de transfection [263]. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité luciférase par rapport à l'activité basale des cellules (Figure 37).

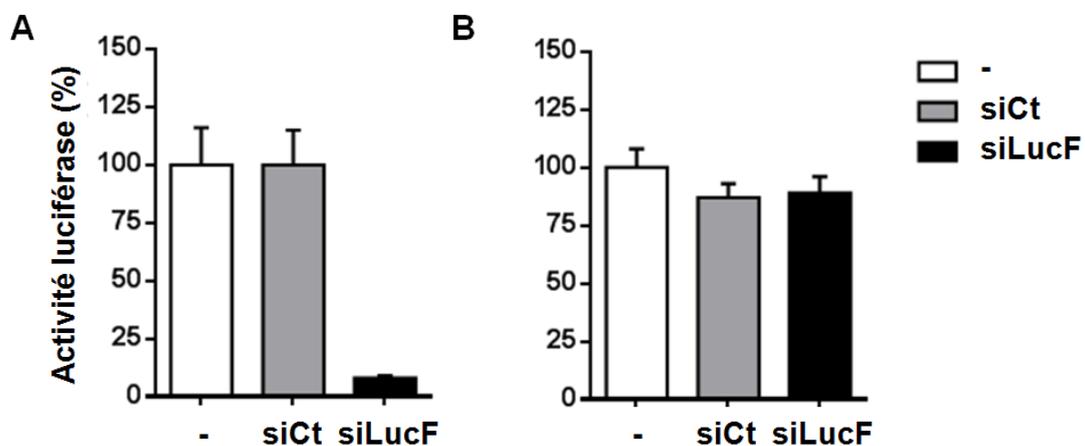


Figure 37 : Activité luciférase après transfection transitoire de siARN dans les MNNG/HOS exprimant la luciférase (A) par encapsulation dans un liposome cationique RPR209120/DOPE ou (B) par l'association des siARN avec le peptide acide et le cholestérol.

Dans le cas de la transfection des siARN avec le liposome cationique, on peut voir que la transfection avec le siARN Ct ne modifie pas l'activité luciférase des cellules MNNG/HOS par rapport à l'activité basale des cellules. Au contraire la transfection du siARN dirigé contre le transcrite codant pour la luciférase firefly (LucF), induit une inhibition de 85% de l'activité enzymatique démontrant ainsi l'efficacité de la transfection par le liposome mais aussi la spécificité des séquences d'acides nucléiques utilisées.

A l'inverse, dans le cas d'une transfection avec l'association cholestérol et peptide acide, l'activité de bioluminescence est diminuée de la même façon pour le siARN dirigé contre le transcrite lucF et le siARN Ct. Ce type de transfection n'induit donc aucune inhibition spécifique de l'activité de la luciférase.

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cette absence d'efficacité du siARN LucF. Les acides nucléiques, ainsi couplés, peuvent ne pas passer la membrane

plasmique de la cellule. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude en microscopie confocale pourrait être réalisée après couplage du siARN avec un fluorochrome.

D'autre part, il est possible que les acides nucléiques entrent dans le cytoplasme mais que leur association avec le cholestérol ou le peptide empêche sa prise en charge par le complexe RISC intracellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, il est possible de tester l'effet des acides nucléiques nus, couplés au peptide ou couplés au cholestérol seulement sur l'activité luciférase.

2) Etude de l'efficacité de la transfection sur la culture d'ostéosarcome en 3D

Cette étude a été poursuivie par une évaluation de l'efficacité de la transfection d'acides nucléiques sur le modèle 3D d'ostéosarcome. Pour cela, après 3 jours de la co-culture CSM et cellules MNNG/HOS, des essais de transfection de siARN avec le liposome cationique RPR209120/DOPE ont été réalisés. Cependant, l'étude de la bioluminescence a permis de mettre en évidence un problème majeur de ce système de co-culture : les différences de prolifération des cellules MNNG/HOS dans les structures hybrides. En effet, l'organisation des particules entre elles et la formation de la structure hybride constituée par les CSM induisent la construction d'une structure 3D différente pour chaque puits (Tableau 1). Cet agencement particulier permet le dépôt des cellules d'ostéosarcome mais surtout un développement cellulaire variable dans chaque échantillon. La bioluminescence n'a ainsi pas pu être rapportée à une condition contrôlée.

			REPRODUCTIBILITE DU TEST	
			Prélèvement 1	Prélèvement 2
CONDITIONS ET VARIABILITE DES ECHANTILLONS	MSC + 2000 HOS	Echantillon 1	23 609	22 577
		Echantillon 2	1 274 599	1 059 044
	MSC + 10 000 HOS	Echantillon 3	412 395	406 848
		Echantillon 4	4 422 431	4 475 347

Tableau 1 : Variabilité des résultats obtenus en bioluminescence (émission de photons). 2 conditions ont été comparées (MSC avec 2000 et 10 000 cellules MNNG/HOS) et chaque échantillon a été mesuré en duplicata (prélèvements 1 et 2) après extraction.

Dans de futures études, le dosage de l'expression du gène codant pour la luciférase firefly pourrait mesurée par RT-PCR et normalisé par rapport à l'expression du gène codant pour la GFP.

DISCUSSION ET CONCLUSION DU CHAPITRE IV

Notre laboratoire de recherche s'intéresse au rôle du microenvironnement dans le développement des tumeurs osseuses primitives, tels que l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome. Le rôle du micro-environnement dans le développement tumoral est connu, notamment, l'influence des CSM dans la progression de l'ostéosarcome [231] et sur la résistance aux traitements de chimiothérapie [239]. D'autre part, la configuration 3D et l'agencement des cellules sont connus pour influencer les communications entre cellules. Ainsi, il apparaît essentiel de créer un intermédiaire entre la culture *in vitro* en monocouche et les études *chez l'animal*. Dans ce chapitre, un modèle 3D d'ostéosarcome a été recherché.

Comme décrit précédemment, les cellules d'ostéosarcome humain ont dans un premier temps été cultivées directement sur les particules de phosphate de calcium. Cependant, malgré le fait que cette lignée provienne d'un ostéosarcome ostéocondensant, elles se sont montrées incapables de former une matrice suffisante à la formation d'une structure 3D agrégée.

Cette étude a donc été poursuivie par le dépôt des cellules d'ostéosarcome sur la structure hybride formée à partir de CSM et de particules de BCP. Néanmoins, la différenciation des CSM en ostéocytes et la minéralisation de la matrice formée n'étaient pas nécessaires, et les cellules tumorales ont donc étéensemencées sur une structure conjonctive et agrégée par une matrice collagénique obtenue après 7 jours de culture des CSM.

La co-culture des cellules d'ostéosarcome et des CSM sur les particules de BCP a induit la dégradation de la structure 3D. Plusieurs hypothèses ont alors été émises et nous avons pu mettre en évidence l'apoptose des CSM en présence des cellules d'ostéosarcome. De plus, les cellules d'ostéosarcome pourraient induire la dégradation de la matrice de collagène. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude par un dosage des métalloprotéases sécrétées. Néanmoins, cette étude nous a permis de mettre au point un modèle qui reproduit certaines des propriétés de l'ostéosarcome observées *in vivo* telles que la dégradation du microenvironnement. Ce travail doit être poursuivi par une comparaison des mécanismes impliqués dans la dégradation de la structure 3D, dans d'autres modèles tumoraux à partir d'autres lignées cellulaires d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing. En outre, le modèle de culture utilisé dans ces travaux repose sur la composition minérale des particules de BCP afin de reproduire le microenvironnement osseux. Cependant, plusieurs équipes se sont intéressées à la phase organique en cultivant les lignées tumorales sur des

matrice de collagène [266,267]. D'autre part, nous pourrions envisager de réaliser notre co-culture CSM et cellules d'ostéosarcome dans un système de culture en multi-couches. Altmann B *et al.* ont réalisé une culture d'ostéoblastes en 3D dans un système de perfusion sous micro-fluidique. Cette culture a permis d'induire la différenciation ostéogénique des cellules [268].

Plusieurs équipes se sont révélées très intéressées par notre modèle 3D d'ostéosarcome et cela a permis de former plusieurs collaborations. Le modèle de culture 3D d'ostéosarcome a ainsi été utilisé pour la validation de molécules à visée thérapeutique. Néanmoins, les résultats étant très préliminaires, ce projet reste très peu abouti. La mise au point de molécules thérapeutiques permettant un ciblage de la zone de développement tumoral ou spécifiquement des cellules cancéreuses, est très complexe et nécessite du temps de développement.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées par des biphosphonates comme vecteurs de molécules de chimiothérapie avec une forte affinité pour le tissu osseux. La fonctionnalisation des nanoparticules a été validée par leur adhérence sur différents supports tels que les particules de phosphate de calcium et de l'os frais de souris. Par la suite, une étude de la pénétration cellulaire de ces nanoparticules a été réalisée. Ces travaux ont mis en évidence la forte toxicité des nanoparticules pour les cellules d'ostéosarcome humain. D'autre part, malgré la fonctionnalisation par des groupements phosphonate, une injection des nanoparticules en systémique a montré leur agrégation dans les capillaires des poumons. Enfin, aucun test n'a pu être réalisé avec les nanoparticules chargées en paclitaxel, une molécule de chimiothérapie puissante. Le développement de nanoparticules ciblant le microenvironnement du tissu osseux semble nécessiter de nombreuses mises au point. Malgré les difficultés rencontrées, de tels efforts de vectorisation doivent être poursuivis au regard de premières études encourageantes. En effet, des études précédentes ont montré l'efficacité de nanoparticules dans le traitement de tumeurs osseuses comme le myélome. L'étude réalisée par Swami *et al.* en 2014 [269], a montré l'association de nanoparticules de PEG-PGLA avec un biphosphonate (alendronate) et une molécule anti-cancéreuse ciblant le protéasome (bortézomib). Ces nanoparticules, ainsi couplées, se fixent à l'hydroxy apatite *in vitro*. L'étude de leur biodistribution *in vivo* a montré que le couplage avec l'alendronate permettait le ciblage ainsi que leur rétention au niveau du tissu osseux. Enfin, l'efficacité du couplage des nanoparticules avec la molécule anti-cancéreuse a permis l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* [269].

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la molécule pro-apoptotique, Trail, sur les cellules d'ostéosarcome humain en culture. En monocouche, nous avons montré que les cellules MNNG/HOS étaient insensibles au traitement par un agoniste de Trail, AMG655. Au contraire, cultivées sur la structure hybride 3D en présence des CSM, le

traitement à l'AMG655 induit une apoptose des cellules d'ostéosarcome. Cette sensibilisation pourrait provenir de la présence des cellules souches mais aussi de la culture en 3D sur une matrice extracellulaire. Afin de discriminer l'effet des CSM dans ce phénomène, des études, de développement des cellules tumorales, pourraient être menées sur la culture hybride CSM et BCP après irradiation des CSM.

Enfin, la dernière stratégie envisagée a été de tester le ciblage à l'os des siARN associés à un peptide acide (AspSerSer)₆ et à un groupement cholestérol. Cette association n'a pas permis de prouver la transfection des cellules d'ostéosarcome en 2D. Différents peptides acides ont été utilisés auparavant dans des études de distribution à l'os : de l'oestradiol [270,271], mais aussi des siARN [245]. D'autre part, des travaux ont été réalisés dans un modèle de diabète *in vivo* et ont montré l'intérêt du couplage des acides nucléiques au cholestérol pour le passage des membranes [265]. Néanmoins, aucune étude ne montre l'efficacité du cholestérol dans le passage des membranes des cellules d'ostéosarcome.

Dans ce contexte, d'autres stratégies de ciblage du tissu osseux peuvent être envisagées. La tétracycline a été introduite comme antibiotique en 1947 [272]. Elle est dérivée de *Streptomyces rimosus* et inhibe le métabolisme de la majorité des bactéries. Lors de son utilisation en clinique, une forte affinité à l'os de la tétracycline a été mise en évidence : liaison à l'hydroxy-apatite des dents et inhibition de la croissance chez l'enfant. Depuis, des études ont montré que sa structure pouvait être modifiée permettant la diminution de ses effets secondaires [273] et ainsi son utilisation comme vecteur thérapeutique.

Le ciblage des surfaces osseuses semble être une stratégie très prometteuse mais reste en développement. Il permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements et de diminuer les effets secondaires dus aux agents de chimiothérapie. C'est pourquoi, il est essentiel de poursuivre la recherche de composés thérapeutiques associés à un vecteur spécifique.

En conclusion, ces travaux nous ont permis de mettre au point un modèle 3D *in vitro* d'ostéosarcome reproduisant certaines propriétés de la pathologie observées *in vivo* : effets délétaires sur les cellules stromales et dégradation de la matrice extracellulaire.

**CONCLUSIONS GENERALES
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Au cours du siècle dernier, les progrès de la médecine et de la science ont permis d'augmenter l'espérance de vie. Néanmoins, cette augmentation de la durée de vie a entraîné l'émergence d'un grand nombre de pathologies osseuses nécessitant la mise au point de traitements adaptés.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, qui présente la propriété de se régénérer. Cette capacité de régénération osseuse est contrôlée par les phénomènes de formation et de résorption. Cependant, dans certains cas, la perte de substance ne peut se réparer de façon spontanée et des stratégies de comblement sont envisagées. Dans ce cadre, le projet Reborne réalise une étude clinique de régénération de défauts osseux à l'aide d'une association de céramiques de BCP et de CSM autologues.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier, dans un premier temps, la réaction cellulaire qui conduit à la formation de tissu osseux lors de l'implantation de particules de BCP et de CSM humaines. Pour cela, une étude chronologique des différents types cellulaires présents sur le site de l'implantation a été réalisée chez la souris Nude en site ectopique. En premier lieu, nous avons pu constater que l'association des CSM avec les particules de BCP induisait une forte augmentation de la formation osseuse en comparaison avec l'implantation de particules seules. Nous avons observé la disparition des cellules humaines après 2 semaines alors que la formation du tissu osseux intervient à 4 et 8 semaines d'implantation. Les CSM ont donc un effet modulateur et non effecteur de la formation osseuse.

Par la suite, la présence des péricytes, des ostéoclastes et des macrophages a été étudiée. Le nombre de cellules vasculaires a été évalué dans les implants et, malgré une grande vascularisation, aucune différence n'a pu être mesurée entre les 2 groupes. La vascularisation ne semble donc pas avoir d'implication directe dans la formation osseuse induite par les particules de BCP et modulée par les CSM humaines. Par contre, notre étude met en évidence une implication de l'activité ostéoclastique dans ce mécanisme. En effet, l'implantation de CSM humaines induit l'augmentation du nombre d'ostéoclastes sur le site, alors que l'inhibition de leur activité résorptive par l'anticorps anti-RANKL bloque significativement la formation osseuse. De la même façon, le rôle des macrophages a été étudié. Le nombre de macrophages MØ et M1 est significativement augmenté dans le cas de l'implantation des cellules humaines, suggérant leur implication dans la formation osseuse. Nous avons tenté de démontrer l'implication de la différenciation des macrophages dans le processus de formation osseuse mais aussi sur l'implication des ostéoclastes. Cependant, le

traitement n'a permis de faire de discrimination entre les différentes voies de différenciation menant aux ostéoclastes et aux macrophages.

Cette stratégie de régénération osseuse, utilisant les CSM associées aux particules de BCP, semble prometteuse. Cependant, elle entraîne un risque pour le patient (2^{ème} intervention chirurgicale et culture des cellules pendant 3 semaines) et un coût très important. Il semble donc toujours intéressant de développer de nouvelles thérapies régénératives. Notre 2^{ème} étude démontre l'efficacité de l'association de BCP avec des monocytes triés à partir de sang périphérique. En effet, l'implantation de ces monocytes permet l'augmentation de la formation osseuse en comparaison du groupe avec particules seules. Les avantages majeurs de cette technique sont la rapidité, le coût et la sécurité de l'obtention des monocytes et leur conservation.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une dose optimale de monocytes à implanter avec les particules : $3,5 \times 10^6$ monocytes par gramme de BCP. La formation osseuse obtenue dans cette condition est équivalente à celle obtenue avec les CSM. L'implantation des cellules a été réalisée avec d'autres biomatériaux, alginate, poly-epsilon caprolactone (PCL). Cependant, seule l'association avec les particules de BCP a permis d'obtenir une formation osseuse. D'autre part, une étude de l'expression génique relative a permis de conclure que le mécanisme de formation osseuse est identique dans les cas d'une implantation de particules avec des monocytes ou des CSM et implique une attraction des cellules souches hématopoïétiques (CSH) sur le site de l'implantation et leur différenciation en macrophages et ostéoclastes.

Ces études ont été menées dans un site ectopique. Il serait donc intéressant de vérifier que le mécanisme est identique dans un site osseux. Les recherches, menées sur l'association des monocytes et des particules de BCP, sont actuellement poursuivies par des implantations de monocytes autologues chez le chien dans des défauts de taille critique au niveau de la diaphyse ulnaire. D'autre part, afin d'optimiser la manipulation chirurgicale, des essais d'implantation sous forme de caillots de fibrine ont été réalisés chez la souris Nude dans des modèles de défaut de taille critique et d'implantation sous cutanée. Les résultats sont en cours d'obtention dans ces différents modèles.

Le développement de nouvelles molécules thérapeutiques reste, à ce jour, basé sur l'étude *in vitro* en monocouche de la toxicité du produit sur des cellules saines et pathologiques et sur l'étude de la biodistribution, de l'efficacité et de la toxicité *in vivo*. La création d'un intermédiaire entre les 2 tests semble essentielle pour optimiser le développement des thérapies.

Dans ce contexte, nous avons mis au point un modèle de culture 3D miniaturisé de cellules engagées dans la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique à partir de CSM et

de monocytes humains cultivés sur des particules de BCP. Les CSM forment une structure 3D grâce à la sécrétion d'une importante matrice ostéoïde, comme déjà développé par d'autres équipes [168,170,197]. La longue période de culture a permis d'observer la différenciation des CSM en ostéoblastes voire en ostéocytes, mais aussi la formation de cristaux de minéralisation. La pré-différenciation et le dépôt des monocytes sur cette structure 3D induit leur différenciation en ostéoclastes actifs.

Ce modèle permet la modélisation d'un tissu osseux présentant les caractéristiques essentielles du tissu ostéoïde : minéraux, matrice, ostéoblastes et ostéoclastes. L'innovation de ce modèle réside dans sa miniaturisation. En effet, il permet de faire divers tests en grande quantité (cytométrie en flux, RT-PCR, histologie, Elisa...) dans une plaque de culture de 96 puits contenant peu de cellules et peu de particules. Cette étude pourrait être complétée par l'ajout de cellules vasculaires afin de modéliser la moelle osseuse nécessaire à l'étude de diverses pathologies : myélome, thalassémie, leucémie. D'autre part, comme proposé dans différentes études, il aurait été intéressant d'étudier l'influence d'un flux de perfusion sur la différenciation des cellules.

Ce modèle a été optimisé par la suite pour l'étude de l'ostéosarcome et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour cela, les cellules d'ostéosarcome ont été cultivées sur la structure hybride 3D formée à partir des CSM et des particules de BCP. Ce dépôt des cellules tumorales a induit la dégradation de la matrice ostéoïde causée par l'apoptose des CSM. D'après les observations, le modèle reproduit des mécanismes observés *in vivo* pour le développement tumoral. Il aurait été intéressant d'étudier la sécrétion de métalloprotéases par zymographie afin de préciser les causes de la dégradation de la matrice.

Plusieurs études de ciblage thérapeutique ont été réalisées sur des cultures d'ostéosarcome en 2D et 3D.

Dans un premier temps, nous avons testé des nanoparticules fonctionnalisées par des groupements phosphonate. Ces nanoparticules permettaient la liaison aux surfaces osseuses et la pénétration dans les cellules tumorales. Cependant, elles sont toxiques pour une grande majorité des cellules. Leur injection *in vivo* a montré une agrégation responsable de leur localisation au niveau pulmonaire. Cette étude n'a pu être complétée par l'association d'une molécule de chimiothérapie à la nanoparticule du fait des difficultés rencontrées au cours de la synthèse chimique (Ritz S. Institut Max Planck de Mainz, Allemagne. Une nouvelle formulation est recherchée pour réduire la toxicité cellulaire et l'agrégation *in vivo*).

Dans un second temps, l'effet d'un agoniste de Trail, une molécule pro-apoptotique ciblant les cellules tumorales, a été testé dans le modèle d'ostéosarcome 3D. Cette étude a montré l'effet apoptotique de Trail sur les cellules d'ostéosarcome en 3D et non en 2D.

L'étude préclinique réalisée chez le petit animal, par Picarda *et al.* en 2010 montre que Trail inhibe la croissance tumorale d'un sarcome d'Ewing et prévient l'ostéolyse induite par la tumeur [274]. Néanmoins, les études cliniques réalisées avec des agonistes de Trail combinés à des molécules de chimiothérapie n'ont pas montré d'amélioration de la survie en comparaison du groupe contrôle [275]. Cette divergence entre les résultats obtenus *in vitro* en monocouche, *in vivo* chez le petit animal ou lors des études cliniques chez le patient montre une nouvelle fois la nécessité de créer un nouveau modèle d'étude.

Enfin, la vectorisation de molécules d'ARN interférents a été étudiée afin de cibler des surfaces osseuses. Pour cela, une première stratégie avait été envisagée : le couplage du siARN avec un biphosphonate. Cependant, des incompatibilités de charges n'ont pas permis à l'équipe collaboratrice (Escriou V. Laboratoire de pharmacologie chimique et génétique et d'imagerie de Paris) de mettre au point ces molécules. La seconde stratégie a été de coupler le siARN à un peptide de vectorisation ciblant les surfaces osseuses, et à un groupement cholestérol, qui facilite la pénétration membranaire. Cependant, cette association du siARN avec le vecteur n'a pas permis d'observer une diminution de l'activité protéique ciblée. Il est probable que l'association de la chaîne d'acides nucléiques avec le cholestérol et le peptide, ne permette pas le passage de la membrane plasmique ou l'intégration dans le complexe d'ARN interférence intracellulaire (complexe RISC).

En comparaison, le liposome cationique RPR209120/DOPE a permis la pénétration du siARN dans les cellules tumorales en 2D. Cette formulation a donc été utilisée pour valider l'utilisation du siARN dans le modèle d'ostéosarcome en 3D. Cependant, le développement variable des cellules d'ostéosarcome dans notre modèle ne nous permet pas de conclure sur l'efficacité des siARN dans les cellules cultivées en 3D.

En conclusion, ces travaux nous ont permis d'affiner la compréhension du mécanisme de formation du tissu osseux. Nous avons pu mettre en évidence l'implication des macrophages MØ et M1 et celle des ostéoclastes dans ce processus. Un protocole de thérapie cellulaire pour la régénération osseuse a ainsi pu être développé à partir de monocytes associés à des particules de phosphate de calcium.

Afin de comprendre les mécanismes qui interviennent au niveau du microenvironnement du tissu osseux, autant dans un contexte de formation osseuse que de développement tumoral, nous avons cherché à mettre au point des modèles 3D de culture *in vitro*. L'association de CSM avec les particules de BCP a induit la sécrétion d'une matrice collagénique permettant la formation d'une structure 3D, support des dépôts de monocytes pré-différenciés ou des cellules d'ostéosarcome.

Les travaux réalisés sur le modèle de tissu osseux ont permis de mettre en évidence la formation de cristaux de minéralisation ainsi que l'engagement des cellules dans les voies de différenciation ostéoblastique et ostéoclastique.

Les cellules d'ostéosarcome ont été cultivées sur la structure 3D hybride, composée des CSM associées aux BCP. Cette co-culture induit une forte altération de la structure 3D formée : apoptose des CSM et dégradation de la matrice collagénique. Lors du développement d'un ostéosarcome, on observe notamment une ostéolyse de la matrice extracellulaire.

ANNEXE

Brevet : Bone regenerating biomaterials with selected cells from peripheral blood

Anne Laure GAMBLIN, Pierre LAYROLLE, Valérie TRICHET

European patent application : EP14306175

Received in july 2014

The present invention relates to the field of bone regeneration.

In particular, the invention relates to a biomaterial useful for bone regeneration, particularly for the filling and regeneration of large bone loss/defects.

With more than 1 million bone graft procedures per year in Europe, bone is the most transplanted tissue in humans. There are many bone defects in patients that need to be regenerated such as non-union fractures following severe trauma, surgical revisions of orthopedic implants and spine fusions. Typically, the volume of bone defects to be regenerated ranges from 5 to 50 cm³ [276]. In these medical indications, several therapeutic procedures have been proposed.

Bone defects are usually filled by an autologous bone graft. In such procedures, bone is taken from a second surgical site (e.g. iliac crest, skull, fibula) and transplanted into the defect on the same patient. The autologous bone graft contains the mineralized extracellular matrix, patient's own cells and growth factors that help bone regeneration with a satisfactory clinical success ranging from 50 % to 70%. However, the autologous bone grafting procedure has drawbacks: the patient's bone stock is limited in quantity, it requires a second surgical site causing complications (risks of infection and fractures, pain) and its effectiveness remains limited due to significant resorption and limited regeneration capacity of the bone graft.

An alternative to transplantation of autologous bone graft is related to cell therapy, particularly tissue engineering. Classically, patient's bone marrow (10 to 50 cm³) is aspirated from iliac crest under local anesthesia using heparinized syringes. Bone marrow contains a very low proportion of pluripotent cells, namely mesenchymal stem cells (MSC), able to differentiate into bone, cartilage or adipose tissues. MSC are isolated from bone marrow by, e.g., their adherence to culture treated plastic and amplified by culturing in media containing human blood derived platelet lysate (PL). Freshly harvested MSC from culture dishes are mixed with a synthetic bone substitute, namely calcium phosphate particles in the surgical room and implanted in the patient's bone defect. The inventors have shown that MSC attached on calcium phosphate particles and that, this biomaterial with patient own MSC cells has osteoinductive properties and bone regeneration capacity. However, a drawback of this cell therapy is related to the very low proportion of MSC contained in bone marrow, typically 0.001 to 0.01 % of mononuclear cells (MNC). As a bone marrow aspirate contains between 15×10⁶ to 30×10⁶ MNC/cm³, only 0.15×10³ to 3×10³ MSC/cm³ are present in bone marrow

[127]. Consequently, MSC must be amplified in culture for several weeks to reach an effective therapeutic dose, typically 20×10^6 MSC for 1 cm^3 or 0.5 g of biomaterial. For clinically relevant volumes of 5 to 50 cm^3 , the procedure requires culturing of MSC for 3 weeks in a pharmaceutical laboratory and clean room environment, many quality controls, transportation of fresh bone marrow as well as MSC suspension between the production laboratory and the operating room. Therefore, this therapeutic approach remains cumbersome and expensive for the patient.

Another bone regeneration method consists in mixing coagulated blood or bone marrow aspirates from the patient (WO 2010/007230) that contain mononucleated cells, platelets and plasma with biphasic calcium phosphate (BCP) particles having an average size between 40 to $500 \mu\text{m}$. However, the inventors have demonstrated by comparative examples given in the present application that the bone regeneration induced with these body fluids remains significantly lower than the bone regeneration induced with the biomaterials of the present application.

Some studies have shown that cell populations containing monocytes-derived mesenchymal progenitors can differentiate into several distinct mesenchymal cell lineages such as osteogenic cells [277,278]. However, these studies have not demonstrated the effectiveness of differentiation of these monocytes-derived mesenchymal progenitors into osteogenic cells *in vivo* in aim to be used in bone regeneration therapy.

Other authors [198] have proposed alternative strategies based on the co-culture of macrophages/monocytes and osteoprogenitor cells *in vitro* onto calcium phosphate biomaterials before transplantation. However, this approach requires extensive culturing steps to amplify and differentiate cells *in vitro* prior to implantation in patients. Furthermore, this study has shown only the differentiation of monocytes into multinucleated osteoclasts. This differentiation demands 5 days of culture with the addition of growth factors, like macrophage-colony stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. Thus, this protocol retains the drawbacks of long cell culturing steps.

Others have hypothesized that by combining biphasic calcium phosphate (BCP) granules with autologous platelet rich plasma (PRP) gel, bone regeneration would then be improved [279]. However, the study failed to demonstrate bone healing at 16 weeks in critical size defects in ulna of dogs. No significant ossification was present, neither with BCP

granules alone nor in association with PRP gel.

Another solution to accelerate bone repair have been proposed by Zhang *et al.* [280]. Thus, the authors have demonstrated that human mono-osteophils, which are generated by cathelicidin-derived peptide LL-37 treated monocytes, mixed with calcium phosphate material induce bone generation in injured sites of NOD/SCID mice [281]. In contrast, bone formation was not observed in the control mice subcutaneously implanted with 40 mg of calcium phosphate material mixed and 5×10^6 mono-osteophils alone or with calcium phosphate material mixed with LL-37 alone after 7 weeks. This study corroborated that a high dose of monocytes in combination with calcium phosphate granules is detrimental for bone tissue formation.

Another proposed strategy is to use polymer gels like alginate to trigger the activity of host macrophages/monocytes *in situ* on implantation [282]. Nevertheless, it is only a hypothesis and as being illustrated in the present application, the inventors have demonstrated that such strategy does not work. Indeed, monocytes encapsulated in alginate gels or mixed with microfibrinous poly- ϵ -caprolactone failed to form bone tissue in muscles of nude mice after 8 weeks.

There remains therefore a significant need for new and improved products for bone regeneration, which are : effective, cheap, quick and easy to produce, easy to insert into subjects and biocompatible. The present inventors have made a significant step forward with the invention disclosed herein.

The purpose of the invention is to fulfill the need of an easy accessible bone graft material by providing innovative bone regenerating biomaterials with selected cells, preferably from peripheral blood of the patient, which makes it possible to solve in whole or part the above mentioned problems, in particular the pre-culturing steps.

Unexpectedly, the inventors have demonstrated that the combination of calcium phosphate particles with selected monocytes isolated from peripheral blood lead to improve bone formation and bone regeneration capacities as compared to direct combination of whole blood with calcium phosphate particles similarly to the one proposed before (WO 2010/007230).

A major advantage of the present invention lies in the easy accessibility of peripheral blood as source of monocytes.

These results are surprising since monocytes are precursors of the inflammatory cells macrophages and they are strongly involved in inflammatory response. It is known in the art that high inflammation leads to fibrosis and that decreasing of inflammation, particularly at the injury site, is highly desired in bone regeneration method.

Interestingly, there are optimal doses of monocytes in unison with calcium phosphate particles to induce bone regeneration. The present invention demonstrates that biomaterials with monocytes at low concentration, i.e. such as that found in peripheral blood (4 to 11 % of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), typically ranging from 0.20×10^6 to 0.95×10^6 monocytes per cm^3 of blood), have a limited bone regenerative capacity. On the opposite, increasing the dose of monocytes above the optimal amount in the biomaterials led to acute inflammation and fibrosis and not to bone tissue regeneration.

In one aspect, the invention relates to a biomaterial comprising:

- calcium phosphate particles having a diameter from 0.2 mm to 4 mm, particularly from 0.3 to 2 mm, more particularly from 0.5 mm to 1 mm; and

- a cell fraction consisting essentially of isolated monocytes;

wherein the number of isolated monocytes per 1 g of calcium phosphate particles ranges from 0.2×10^6 to 50×10^6 , particularly from 1×10^6 to 10×10^6 , and more particularly from 3×10^6 to 5×10^6 .

In the preferred embodiment of the invention the optimal dose found by intramuscular implantation in nude mice is 0.14×10^6 monocytes / 40 mg of BCP, i.e. 4×10^6 monocytes per 1 g of calcium phosphate.

The biomaterial according to the invention has in particular the following advantages:

- It has got a strong bone regeneration efficiency when monocytes are sorted from peripheral blood of the patient and mixed with BCP particles in the appropriate ratio.

- In the patent application WO2010/007230, bone regeneration is claimed when coagulated blood from the patient is mixed with calcium phosphate particles. However, mixing blood with synthetic calcium phosphate bone substitutes is a standard practice for surgical handling and the blood/BCP mixture has proved lower efficacy in bone regeneration

of critical size defects compared to the biomaterial of the present invention. Furthermore, the number of monocytes in blood is around 0.5×10^6 monocytes per cm^3 . This number is four-fold below the efficient dose of 2×10^6 monocytes per cm^3 or 4×10^6 monocytes per g of calcium phosphate particles as determined in the present invention.

- Platelet rich plasma and platelet lysates have been described in several publications as osteoinductive materials [276,279]. Despite these compounds contain significant quantities of growth factors such as vascular endothelial growth factor, basic-fibroblast growth factor, etc., there are controversy reports in the literature regarding their efficacy in bone regeneration [276,279].

- It has no severe side effects since blood sampling is a benign and medical procedure in contrast to bone harvesting;

- It has constant and homogeneous properties since the given examples have been done with several human donors with high consistency in bone regeneration;

- It avoids the drawbacks of autologous bone transplantation as well as those of MSC that require culturing for several weeks prior to surgery. In the present invention, a blood sample of 10 to 100 cm^3 allows isolating in few hours between 5×10^6 to 50×10^6 monocytes. This amount of monocytes is superior to the therapeutic dose of 4×10^6 monocytes per g of calcium phosphate granules. For clinical bone defects ranging from 5 to 20 cm^3 , i.e. 2.5 to 10 g of calcium phosphate particles, respectively, the dose of cells should range from 10×10^6 to 40×10^6 monocytes can be isolated from a patient blood sample of 20 to 100 cm^3 . Since monocytes can be easily cryopreserved after isolation, it is possible to harvest blood samples from the patient at different time intervals or perform cytopheresis prior to the bone regeneration surgery.

Isolation of cell fraction consisting essentially of monocytes is usually performed by blood transfusion centers that have the expertise of magnetic cell sorting from peripheral blood by using specific cell surface antibodies such as CD14 attached to magnetic beads. Normally, the preparation of said cell fraction from blood of the patient is performed within 2 to 4 hours under Good Manufacturing Practices. As the blood transfusion units are located near to the surgical rooms in hospitals, the procedures described in the present invention are compatible with common bone regeneration surgery. Nevertheless, if a high number of monocytes is needed or risks with blood collection are present, it is possible to perform cytopheresis and cryopreserve monocytes in liquid nitrogen for long periods prior to surgery.

The present invention is easy, quick and inexpensive to produce. It avoids cells culture, and thus decreases the risk of contamination. It can be obtained from a simple blood sample of a patient obtained several hours before its delivery to said patient. It avoids the drawbacks associated with the collection of samples of bone marrow, including pains, infection risk, local anesthesia. It avoids the patient coming several times to the hospital for the preparation of the biomaterial and its delivery to said patient, and eventually that the patient undergoes several anesthesia.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one skilled in the relevant art.

For convenience, the meaning of certain terms and phrases employed in the specification, examples and claims are provided.

As used herein, the term “biomaterial” refers to any material, composition that is biocompatible, in particular designed to interact with biological systems, more particularly that is adequate for human body reconstruction.

As used herein, the term “calcium phosphate particles” refers to compound with a molar ratio Ca/P, preferably ranging from 1.5 to 1.67.

Synthetic calcium phosphate materials are calcined and sintered between 800 °C to 1400 °C with organic pore makers to produce porous ceramics. Synthetic materials are preferred to animal or human bone in order to avoid transmission of pathogens or immunological reaction.

According to a particular embodiment of the biomaterial of the invention, at least one of said calcium phosphate particles, particularly at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 99% and more particularly 100% by weight of said calcium phosphate particles based on the total weight of said calcium phosphate particles comprised in said biomaterial, comprises at least one compound selected from the group consisting of hydroxyapatite, tricalcium phosphate including beta-tricalcium phosphate, alpha-tricalcium phosphate, fluorapatite, calcium deficient apatite, octacalcium phosphate, dicalcium phosphate anhydrous or dihydrate, particularly hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate.

Hydroxyapatite and tricalcium phosphate (in particular beta-tricalcium phosphate) have the advantages to be bioresorbable and osteoconductive.

As used herein, the term “hydroxyapatite” refers to the compound also called hydroxylapatite, of formula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ [283].

As used herein, the term “beta-tricalcium phosphate” refers to the compound of formula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [284].

As used herein, the term “fluorapatite” refers to the calcium fluorophosphate compound having the formula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ or the formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$.

According to a particular embodiment of the biomaterial of the invention, at least one of said calcium phosphate particles, particularly at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 99% and more particularly 100% by weight of said calcium phosphate particles based on the total weight of said calcium phosphate particles comprised in said biomaterial, comprises hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate, particularly the weight ratio of said hydroxyapatite to said beta-tricalcium phosphate is from 0 to 100, more particularly from 15:85 to 25:75, even more particularly 20:80 to 30:70 and even more particularly from 40:60 to 50:50 .

Calcium phosphate particles comprising hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate have the advantage of having similar compositions of the mineral of bones and thus, being well approved as synthetic bone substitutes for filling bone defects.

The weight ratio of 20:80 of said hydroxyapatite to said beta-tricalcium phosphate has the advantage to provide with an optimal balance between resorption and re-precipitation of carbonated calcium deficient apatite on its surface from body fluids.

According to a particular embodiment of the biomaterial of the invention, at least one of said calcium phosphate particles, particularly at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 99% and more particularly 100% by weight of said calcium phosphate particles based on the total weight of said calcium phosphate particles comprised in said biomaterial, comprises macropores, in particular open pores, particularly interconnected pores, having a size from 10 to 1000 μm , particularly from 20 to 800 μm and more particularly from 50 to 400 μm .

Particularly, at least one of said calcium phosphate particles, particularly at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 99% and more particularly 100% by weight of said calcium phosphate particles based on the total weight of said calcium phosphate particles comprised in said biomaterial, comprises micro-porosity or micro-pores in the size range of 0.01 to 10 μm , particularly from 0.05 to 5 μm and more particularly from 0.1 to 2 μm . The micro-porosity at the surface of calcium phosphate ceramics is obtained by incomplete sintering.

Micro-porous phosphate calcium particles have the advantage of favoring adsorption of proteins and attachment of cells from body fluids.

Calcium phosphate particles comprising interconnected pores in the size range of 50 to 400 μm have the advantage to allow permeability of body fluids, vascularization and bone tissue ingrowth. Inter particular spaces between particles provide also with interconnected macro-porosity.

As used herein the terms “cell fraction essentially consisting of isolated monocytes” or “hMonocyte fraction” or “hMonocyte CD14+ fraction” refer to cell fraction essentially consisting of monocytes which have been isolated from at least one sample of at least one subject and thus separated from the majority of the other components of said sample(s).

Thus, according to present invention “essentially consisting of” means that specific further components can be present in cell fraction, namely those not materially affecting essential characteristics of isolated monocytes”.

The purity of isolated monocytes in said cell fraction the present invention is at least 90% of total cells. In particular, the biomaterial according to the invention, further comprising :

- less than 10 % of erythrocytes per 1 g of calcium phosphate particles; and/or
- less than 10 % of thrombocytes per 1 g of calcium phosphate particles; and/or
- less than 10 % of other peripheral blood mononuclear cells per 1 g of calcium phosphate particles; and/or
- less than 10% of mesenchymal stem cells per 1 g of calcium phosphate particles.

The cell fraction consisting essentially of isolated monocytes can be obtained by different methods well known by one skilled in the art, including flow cytometry sorting and

magnetic cell sorting, performed from different types of samples including blood sample, bone marrow sample, a sample of peripheral blood mononuclear cells. Particularly, said cell fraction can be obtained according to step (i) of the method for preparing a biomaterial according to the invention. For example, the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes can be obtained according to the method illustrated in the Examples of the present application.

As used herein the term “isolated monocytes” refers to monocytes which are isolated with said cell fraction consisting essentially of isolated monocytes.

The invention also relate to a biomaterial, wherein said calcium phosphate particles and said cell fraction are entrapped in a blood plasma fibrin clot.

According to one embodiment of the invention, the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes is previously suspended in blood plasma supplemented with an anticoagulation agent selected from the group of calcium ions Ca^{2+} chelating agents comprising sodium citrate, CTAD (mixture of Citrate, Theophylline, Adenosine and Dipyridamole), EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid), CPD (Citrate Phosphate Dextrose)

According to the invention, the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes is mixed with calcium phosphate particles and fibrin and treated with an excess of calcium in order to form a fibrin clot. The fibrin clot ensures that non-adherent monocytes are entrapped between calcium phosphate particles and facilitates the handling of the biomaterial. However, the fibrin clot is not a requirement in order to form a bone regenerating biomaterial and simple mixtures of the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes and calcium phosphate particles are effective to induce bone regeneration.

The invention also relates to the biomaterial according to the invention, for use as a medicament, particularly a bone-generating medicament. The advantageous embodiments are as defined above.

As used herein, the term “bone-regenerating medicament” refers to any medicament which is useful for enhanced bone tissue engineering.

The invention also relates to the biomaterial according to the invention for use as a medicament, particularly a bone-regenerating medicament, in the prevention and/or treatment of a bone loss disorder.

A bone regenerating biomaterial is required in the following clinical situations:

- Fusion of vertebra (para spinal and/or filling of intervertebral fusion cages);
- Non-union or delayed union long-bone fractures;
- Revisions of articular joints (hip and knee articular prostheses);
- Reconstruction of large cranial or maxillofacial defects following severe trauma (e.g; ballistic, car accident) or surgical resection of bone tumors.

As used herein, a "bone loss disorder" is any condition wherein the bone mass density and/or volume is reduced. Such disorders include those in which bone loss is a primary or secondary symptom of said disorder. Disorders include diseases with an underlying pathological disturbance relative to a normal individual which may result for example from infection or an acquired or genetic imperfection. Disorders also include those resulting from intentional or unintentional ingestion of certain agents, e.g nutritionally associated conditions or alcoholism. Disorders however also include conditions generally considered to be normal, e.g. through the ageing process, or conditions attributable to physiological or surgical events, e.g. menopause, pregnancy or ovariectomy, respectively, but which exhibit undesirable bone loss. Particularly, the bone loss disorder can be selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, periodontitis, osteoporosis, Paget's disease, hypercalcaemia of malignancy, metastatic bone disease, multiple myeloma, osteogenesis imperfecta, osteomalacia, hyperparathyroidism and hypoparathyroidism.

The biomaterial according to the invention can be delivered at a site wherein a bone generation is needed in a subject in an amount sufficient to generate bone at said site in particular within the range from 5 to 50 cm³. Said amount will be adjusted according to the quantity of bone to be generated.

The biomaterial according to the invention can be delivered at a site wherein a bone generation is needed in a subject, particularly by a surgical intervention as illustrated in the Examples of the present application. For example, after incision, the biomaterial is implanted and the incision is then closed.

The invention also relates to the use of the biomaterial according to the invention for the preparation of a medicament, particularly a bone-regenerating medicament, in particular for the prevention and/or treatment of a bone loss disorder. The advantageous embodiments are as defined above.

The invention also relates to the biomaterial according to the invention, for use in a method of bone generation in a subject, particularly wherein :

- the biomaterial is to be delivered at a site wherein a bone regeneration is needed.

The advantageous embodiments are as defined above.

The invention also relates to a method for preparing a biomaterial, particularly according to the invention, comprising the step of :

- (ii) adding calcium phosphate particles as defined above to the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes; and

wherein the number of isolated monocytes per 1g of calcium phosphate particles ranges from 0.2×10^6 to 50×10^6 particularly from 1×10^6 to 10×10^6 and more particularly from 3×10^6 to 5×10^6 .

Step (ii) can be performed by contacting and mixing calcium phosphate particles as defined above to the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes

In a particular embodiment, the method according to the invention, further comprises, before step (ii), the step of :

- (i) recovering the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes from a biological sample of at least one subject.

Step (i) of recovering the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes can be performed by any method well known by one skilled in the art, including flow cytometry sorting, magnetic cell sorting [285–294], performed from different types of samples including blood sample, bone marrow sample, a sample of peripheral blood mononuclear cells.

Particularly, step (i) recovering the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes from a biological sample, particularly a sample of peripheral blood mononuclear cells of at least one subject is performed by magnetic cell sorting.

As used herein, the term “magnetic cell sorting” refers to method for separation of various cell populations depending on their surface antigens (CD molecules).

Magnetic cell sorting can be performed using at least one antibody directed against at least one specific surface antigen of monocytes, said antibodies can be bound to magnetic beads or recognized by another antibody bound to magnetic beads and directed against said antibodies. Said antibodies reacting to specific surface antigen of monocytes are used to specifically capture monocytes. This approach allows the selective enrichment of monocytes.

As used herein, the term “flow cytometry sorting” refers to Fluorescence-activated cell sorting (FACS). It provides a method for sorting a heterogeneous mixture of biological cells into two or more containers, one cell at a time, based upon the specific light scattering and fluorescent characteristics of each cell. It is a useful scientific instrument as it provides fast, objective and quantitative recording of fluorescent signals from individual cells as well as physical separation of cells of particular interest.

For example, the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes can be obtained by magnetic cell sorting using at least one antibody directed against at least one specific surface antigen of monocytes (including antibodies directed against the CD14 antigen and/or the CD11b antigen), performed on a sample of peripheral blood mononuclear cells; said sample can be obtained by centrifugation of a blood sample.

Particularly, the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes can be obtained according to the method illustrated in the Examples of the present application.

As used herein, the term “biological sample” means a sample of blood from the patient, typically less than 500 ml of blood.

In particular, said biological sample is selected from the group consisting of blood sample, bone marrow sample, a sample of peripheral blood mononuclear cells.

As used herein, the term “subject” refers to mammals in particular, the mammals are selected in the group comprising, human being, dogs, cats, horses, caws, sheep, goats, rats, mice, more particular the subject is human being.

The invention also relate to the method for preparing a biomaterial according to the invention further comprising, before step (ii) and after step (i), the steps of :

(I') suspend said cell fraction consisting essentially of isolated monocytes in blood plasma supplemented with an anticoagulation agent selected from the group of calcium ions Ca^{2+} chelating agents comprising sodium citrate, CTAD, EDTA;

(I'') adding a solution of CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{AcOEt})_2$, or CaSO_4 , to the monocytes/plasma solution obtained in step (I').

Since monocytes are non-adherent cells, the above method allow entrapping monocytes and calcium phosphate granules within a fibrin clot. This procedure also facilitates surgical handling of the bone regenerating biomaterial for filling complex shaped bone defects.

In the method of the present invention the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes are suspended in blood plasma supplemented with an anticoagulation agent (sodium citrate, CTAD, EDTA). A solution of CaCl_2 at 200 mM is added to the monocytes / plasma solution in a 1:10 volume ratio in order to get a final concentration of 20 mM. The mix is added to the calcium phosphate granules while clotting occurred within 30 minutes. The hybrid composite can be used to fill a bone defect.

The invention also relates to a method of bone generation in a subject comprising the step of :

b) delivering the biomaterial according to the invention at a site wherein a bone regeneration is needed in the subject.

The method of bone regeneration according to the invention can comprise, prior to step b), the step of :

a) preparing a biomaterial according to the methods of the invention;

particularly wherein step (i) of recovering the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes is performed from a biological sample of said subject (therefore optimizing the biocompatibility of the biomaterial).

Said biomaterial can be delivered in an amount sufficient to regenerate bone at said site.

The invention also relates to a method for the treatment of a bone loss disorder, comprising the step of :

- administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a biomaterial according to the invention, particularly at a site wherein a bone generation is needed.

The method for the treatment of a bone loss disorder according to the invention can comprise, prior to the biomaterial administration step, the step of:

- preparing a biomaterial according to the methods of the invention;

Particularly wherein step (i) of recovering the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes is performed from a biological sample of said subject (therefore optimizing the biocompatibility of the biomaterial).

The invention also relates to a medical device comprising the biomaterial according to the invention.

As used herein, the term “medical device” refers to any instrument, apparatus, appliance, material or other article, alone or in combination, used specifically for diagnostic and/or therapeutic purposes. In particular, the medical device is selected from the group consisting of any types of syringes and/or tubes.

In specific embodiment of the present invention a syringe containing calcium phosphate particles is connected to a transfusion bag containing the cell fraction consisting essentially of isolated monocytes separated by magnetic sorting of monocytes patient’s blood and plasma. The calcium phosphate particles and the separated monocytes may be mixed in the syringe.

The invention also relates to a kit comprising:

- at least one antibody directed against at least one specific surface antigen of monocytes; and
- calcium phosphate particles as defined above.

Particularly, the kit according to the invention can comprise at least one antibody bound to magnetic beads and that is directed against at least one specific surface antigen of monocytes

Particularly, said at least one antibody directed against at least one specific surface antigen of monocytes can be bound to magnetic beads.

Particularly, said at least one antibody directed against at least one specific surface antigen of monocytes is selected from the group consisting of antibodies directed against the CD14 antigen, antibodies directed against the CD11b antigen, particularly antibodies directed against the human CD14 antigen, antibodies directed against the human CD11b antigen.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 shows the principle of magnetic cell sorting of monocytes from peripheral blood,

Figure 2 shows a flow cytometry of PBMC and CD14⁺;

Figure 3 shows SEM photographs of BCP of 0.5 to 1mm in size (figure 3a) with microporous surface (figure 3b);

Figure 4 shows the histology of intramuscular implants of BCP, hMSC/BCP and h-monocytes/BCP after 1, 2, 4 and 8 weeks in nude mice (Masson Trichrome stain);

Figure 5 shows a histology showing ectopic bone tissue formation after implantation in muscles of nude mice for 8 weeks of BCP granules, hMSC/BCP and h-Monocytes/BCP (Masson Trichrome stain);

Figure 6 shows a histomorphometry results after implantation in muscles of nude mice with BCP alone, BCP+h-monocytesCD14⁺ or BCP+hMSC at 1, 2, 4 and 8 weeks;

Figure 7 shows a regeneration of critical size defects (4 mm) in calvaria of nude mice after 8 weeks;

Figure 8 shows a quantitative intramuscular bone formation of BCP particles with hMSC, blood clot and different doses of CD14⁺ monocyte cells;

Figure 9 shows histology of BCP particles with hMSC, blood clot and different doses of CD14⁺ monocyte cells after intramuscular implantations in nude mice for 8 weeks (Masson Trichrome stain);

Figure 10 shows a quantitative calvaria bone formation of BCP particles with PRP, blood clot, PBMC and different doses of CD14⁺ monocyte cells;

Figure 11 shows histology of calvaria bone defect regeneration in nude mice with BCP and different doses of CD14⁺ monocytes cells after 8 weeks (Masson Trichrome stain),

Figure 12 showshistology of intra muscular bone formation with CD14⁺ monocyte cellsand different biomaterials (alginate gel ; microfibers of poly-ε-caprolactone) after 8 weeks in nude mice (Masson Trichrome stain).

The present invention will be explained in detail with examples in the following text, but the technical scope of the present invention is not limited to those examples.

EXAMPLES

I. Materials and Methods

I.1 Biomaterial

Biphasic calcium phosphate (BCP) particles sizing between 0.5 and 1 mm were obtained from Biomatlante. The BCP particles were composed of 80 % beta-tricalcium phosphate (TCP; Ca₃(PO₄)₂) and 20 % hydroxyapatite (HA; Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). The BCP particles were weighted in aliquots of 40 mg and sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. BCP discs (diameter, 7 mm; thickness, 2 mm) were used for calvaria bone regeneration. The overall porosity (% v/v) of both BCP particles and discs was 75 ± 5 %, with a pore size distribution of 70 % (0-10 μm), 20 % (10-100 μm) and 10 % (100-300 μm).

I.2 Magnetic sorting of human monocytes (h-Monocytes) from peripheral blood

Citrated peripheral blood samples from healthy human donors were diluted with the same volume of phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) and then centrifuged under density gradient (Biocoll separating solution, 1.077 g/mL; Biochrom) to recover the PBMC. After two washes with PBS, PBMC were re-suspended at 125.10⁶ cells/mL in separation buffer (0.5 % w/w bovine serum albumin and 2 mM EDTA in PBS) and anti-human-CD14 microbeads (MiltenyiBiotec) were added according to the supplier instructions. After positive cell sorting using the MACS system (MiltenyiBiotec) according to manufacturer's instructions, human CD14⁺ (hCD14) cells were harvested and stored at -80 °C in foetal calf serum (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich).

I.3 Isolation and culture of human MSC from bone marrow

Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hMSC) were provided by the German blood transfusion centre (IKT, University of Ulm). After receiving informed consent from healthy donors, 30 mL of bone marrow were aspirated using heparinized syringe under local anesthesia on the posterior iliac crest. Serology testing (VIH1, VIH2, VHB, VHC and Syphilis) was done on each donor for safety. Bone marrow MNC were counted, seeded at of $5 \cdot 10^4$ cells/cm² on culture treated polystyrene flasks (Cellstack, Corning), and cultured in α MEM (Gibco) supplemented with 5 % human platelet lysate (PL, IKT) and 1 IU/mL heparin (Choay) at 37 °C and 5 % CO₂. After 14 days of culture, hMSC were detached using trypsin/EDTA (Life Technologies), counted and seeded at $1 \cdot 10^4$ cells/cm² on new cell culture flasks and cultured in α MEM supplemented with 8 % PL for 7 days. Finally, hMSC were harvested by trypsin/EDTA and washed in PBS. For each batch, several controls were done upon delivery: cell viability ≥ 80 % by trypan blue exclusion; hMSC identity (> 80 % CD90⁺, CD73⁺ and CD105⁺ cells, and < 5 % CD45⁺ and HLAcII⁺ cells) by flow cytometry analysis.

I.4 Evaluation of bone regeneration properties of the biomaterials *in vivo*

All animal experimentations were conducted according to the European guidelines after receiving approvals from the local ethic committee (agreement No. 2012.27 and 2012.198). Immune compromised female nude mice (4 weeks old, Rj:NMRI-nu; Janvier Labs) were used. Mice were housed with water and food *ad libitum* and acclimated for at least 10 days before surgery. All procedures were performed under general anaesthesia by inhalation of 2.5 % isoflurane gas (Forene). Appropriate analgesia was used by intramuscular injections of buprenorphine (Buprécare 60 μ L/kg/day, Axience). Euthanasia was performed under general anesthesia by cervical dislocation. Implants were carefully retrieved after euthanasia and then processed for histology.

Ectopic bone tissue formation was tested in para-tibial muscles. Briefly, a skin incision was made to access the paratibial muscle. Muscle dissection was carefully conducted and BCP granules with or without human monocytes or MSC were implanted. Both muscle and skin were finally sutured.

To create critical size bone defects in calvaria, mice were placed on a stereostatic frame (Leica). A skin incision was made to expose the skull. A 4 mm hole was created in the calvaria bone by using a trephine and a dental hand piece (NM3000, Nouvag). Constant saline irrigation was used during drilling. After placing the implant, the skin was carefully put back

to avoid motion of the implant and skin was finally sutured.

I.5 Ectopic bone tissue formation in muscles of nude mice

Three groups consisting of 20 mice each (n=5 animals per time point and per group) were made up: i) 40 mg BCP granules with 70 μ L PBS (negative control) ; ii) 40 mg of BCP granules loaded with 1.4×10^6 hMSC in 70 μ L PBS (positive control) ; and iii) 40 mg of BCP granules loaded with 1.4×10^6 hCD14 in 70 μ L PBS (test material). Cells were seeded onto BCP granules 60 min prior to surgery. Each animal was bilaterally implanted with the same preparation. After 1, 2, 4, and 8 weeks, animals were euthanized.

I.6 Determination of the optimal hCD14 cell dose by implantation in muscles of nude mice

Different preparations of hCD14 with BCP granules (40 mg) in 70 μ L PBS were done : 0.014×10^6 , 0.14×10^6 , 1.4×10^6 , 2.8×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 (not shown), and 20×10^6 human CD14+ cells (figure 8). Mice were implanted bilaterally in para-tibial muscles (n=4 animals per cell dose). Euthanasia was conducted after 8 weeks implantation.

I.7 Bone regeneration of critical size defects in calvaria of nude mice

Implantation was carried out on 40 mice divided into 8 groups (n=5 animals each). Critical size defects of 4 mm in diameter were made on the calvaria of nude mice. BCP discs were placed on top of defects and served as negative controls. As positive control, hMSC were seeded on the BCP disc at a density of 35×10^6 hMSC/disc for 60 min and placed on top of the calvaria defects. hCD14+ Monocytes were seeded onto the top of a BCP disc 60 min prior to implantation and then placed over the calvaria defect. Two doses of hCD14+ cells were tested : 3.5×10^6 (therapeutic dose) and 35×10^6 hCD14+ cells/disc (high dose). Human blood was centrifuged on a density gradient and the PBMC were collected. Similarly, 35×10^6 PBMC were seeded on BCP disc and implanted. Another group consisted of BCP discs and blood clot obtained by adding 100 μ L of whole blood mixed with 20 μ L CaCl_2 at a concentration of 200 mM. Finally, a group of platelet rich plasma (PRP) was prepared by collection of the patient's whole blood (that is anticoagulated with citrate dextrose) before undergoing two stages of centrifugation designed to separate the PRP aliquot from platelet-

poor plasma and red blood cells. After 8 weeks, the mice were sacrificed and samples were processed for histology.

Table 1: *Groups of nude mice treated with BCP discs and different blood components.*

Group	Sample description	Abbreviation
1	Empty hole of 4 mm in diameter	EMPTY
2	BCP disc 7 mm in diameter and 2 mm in thickness	BCP
3	BCP disc + 35×10^6 hMSC (positive control)	BCP + 35 MSC
4	BCP disc + 3.5×10^6 hCD14+ cells	BCP + 3.5 M
5	BCP disc + 35×10^6 hCD14+ cells (Monocytes high dose)	BCP + 35 M
6	BCP disc + 35×10^6 human PBMC	BCP + PBMC
7	BCP disc + 100 μ L whole blood mixed with 20 μ L CaCl_2	BCP + blood clot
8	BCP disc + 100 μ L platelet rich plasma PRP	BCP + PRP

1.9 Histology

After euthanasia, the explants were dissected and fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA, MicromMicrotech) buffer for 24 hours. Then, the samples were decalcified in PBS solution with 0.5% PFA and 4.13% EDTA, and heated at 46°C using an automated microwave decalcifying apparatus (KOS Histostation, Milestone Med. Corp.). Samples were then rinsed with tap water and dehydrated in ascending series of ethanol baths (80 %, 95 %, and 100 %), and finally in butanol for 1 hour each using an automated dehydration station (MicromMicrotech). Samples were then impregnated in liquid paraffin at 56 °C (Histowax) and embedded. Thin sections of 3 μ m were made perpendicular to the plane of the skin for intramuscular implants and calvaria defects using a standard microtome device (Leica RM2250). Sections were stained with Masson's trichrome technique using an automated coloration station (MicromMicrotech). Stained slices were digitally scanned (NanoZoomer 2.0RS, Hamamatsu Corp.) and observed with the virtual microscope (NDP view software, Hamamatsu Corp). The bone incidence was determined as the number of samples containing

bone tissue over the total number of samples. Images histomorphometry was processed on the whole implant sections using ImageJ and the percentages of biomaterial and bone tissue were calculated. The quantity of new bone was measured in separate sections with the software ImageJ. The height was reported as an average by measuring bone surface and BCP granules surface. The bone formation was evaluated as follows:

$$\% \text{ bone} = (\text{bone surface} \times 100) / (\text{total implant surface} - \text{BCP particles surface})$$

II. Results

Figure 1 shows the procedure used to isolate a cell fraction consisting essentially of h-Monocytes CD14+ from patient's whole blood. A sample of patient's whole blood is collected in tubes with citrate dextrose anticoagulant or another anticoagulation agent. After gradient centrifugation of whole blood (Ficoll), the plasma is collected and the mononuclear cells fraction PBMC is recovered by pipetting in a new tube. The PBMC are diluted in PBS and monocytes are labeled with CD14 antibody attached to magnetic micro beads. By applying a magnetic field, the cell fraction consisting essentially of h-monocytes CD14+ is retained in the column while the most of other mononuclear cells such as lymphocytes are eluted. Human monocytes CD14+ cells are recovered when the magnet is removed. The method has a high yield and is rapid. For instance, a blood sample of 100 ml taken from the patient is sufficient to isolate 1×10^9 PBMC by density gradient centrifugation and to sort 200×10^6 Monocytes CD14+ by magnetic antibody labeling in a few hours.

As shown in Figure 2, flow cytometry indicated that the cell population is enriched to a minimum of 90 % with Monocytes CD14+ after magnetic cell sorting of PBMC.

Figure 3 shows the micro porous biphasic calcium phosphate particles having average size from 0.5 to 1 mm. The BCP particles have irregular shape in order to fill and to fit the anatomy of bone defects. The spaces between the BCP granules allow a porosity and permeability of body fluids and cells as well as the ingrowth of tissues. At high magnification, the surface of BCP particles exhibits micro porosity with micropores between 0.1 to 2 μm in size. This micro porosity is due to a relatively low sintering temperature of BCP (e.g. 1050 $^{\circ}\text{C}$).

After isolation, cell fraction consisting essentially of h-Monocytes CD14+ is suspended in patient's blood plasma at the desired cell concentration and a CaCl_2 solution (200 mM,

volume ration 1:10) is added. The mixture is finally added to the BCP granules. After 20 min, the clotting of fibrin entrapped monocytes and calcium phosphate particles to form a paste for filling bone defects of complex shape. This time is compatible with a per surgery association of said cell fraction consisting essentially of Monocytes CD14+ and BCP granules for bone grafting. In a typical experiment, 70 μ l of the said fraction wherein the Monocytes CD14+ at a cell concentration of 1.4×10^6 /ml are mixed with 40 mg of BCP particles. For comparison, bone marrow derived hMSC were isolated and culture amplified for 3 weeks prior to be mixed with BCP granules by using a similar cell/biomaterial ratio.

In order to demonstrate the ability of the cell/biomaterial preparation to induce bone tissue in ectopic sites, intra muscular implantations were performed in immune compromised nude mice. After 1, 2, 4 and 8 weeks, histology revealed that the negative control group consisting of BCP particles was only encapsulated by fibrous tissue until 4 weeks (figure 4). In the negative control BCP group, a sparse amount of bone tissue (<1 % of total implant surface) with a low bone incidence (2/10) was found after intramuscular implantation of BCP for 8 weeks (Figures 4, 5 and 6). In the positive control group consisting of pre-cultured hMSC mixed with BCP particles, the quantity of bone tissue was 4-5% in 6/6 at 4 weeks and 14% in 7/7 samples at 8 weeks. Nevertheless, hMSC require isolation from bone marrow and expansion in culture for 3 weeks prior to implantation. In the h-Monocytes CD14+ fraction /BCP group, a limited quantity of ectopic bone tissue (1-2%) was observed as early as 4 weeks in 3 out of 7 implanted hMonocytes fraction/BCP samples and a significant amount (3-4%) in all samples at 8 weeks (6/6). This experiment demonstrates that cell fraction consisting essentially of h-Monocytes CD14+ isolated from patient's blood and mixed with BCP particles are able to induce bone tissue in ectopic sites that are not favorable for bone tissue formation.

The bone regeneration capacity of h-Monocytes/BCP was tested on calvaria of nude mice. A full thickness critical size defect of 4 mm in diameter was created on the skull and was covered with BCP or h-Monocytes/BCP discs. As shown in Figure 7, the mixture of h-Monocytes/BCP had regenerated the critical size bone defect in 8 weeks while the sole BCP material has a limited effect on bone regeneration.

In another experiment, the optimal dose of monocytes to induce bone tissue was studied. The results obtained after implantation of BCP particles alone, in association of culture expanded hMSC, blood clot and different doses of CD14+ monocytes cells (figure 8)

show that the optimal concentration for bone regeneration is 0.14×10^6 h-monocytes CD14+ for 40 mg of BCP particles. The bone regeneration with this concentration of monocytes is the same as bone regeneration obtained with hMSC that are cultivated for three weeks. Surprisingly, higher doses of h-Monocytes than 0.14×10^6 h-monocytes CD14+ for 40 mg of BCP were not beneficial for bone tissue formation. Furthermore, bone regeneration obtained with this concentration of monocytes is higher than the one obtained with BCP particles mixed to blood clot. These results, distinctly shown in figure 8, demonstrate that very low doses of monocytes is not sufficient to allow bone regeneration and very high doses of monocytes lead to inflammation process and worst bone regeneration. Histology pictures of BCP particles with hMSC, blood clot and different doses of CD14+ monocytes after intramuscular implantations in nude mice for 8 weeks (Masson trichrome stain) are shown in figure 9.

Furthermore, figures 10 and 11 show the same results for bone regeneration in calvaria defects. Bone tissue regeneration is not observed with BCP alone and BCP+PRP. Limited bone regeneration is noticed with BCP+blood clot, with a high dose of PBMC or monocytes. The optimal dosage for bone regeneration is 3.5×10^6 h-Monocytes CD14+ per BCP disc corresponding to a similar dose as mentioned above for intramuscular implantations.

Otherwise, figure 12 shows lack of bone generation when CD14+ monocytes cell are mixed to other biomaterials such as alginate gel and poly-epsilon caprolactone (PCL) microfibers.

Therefore, the above examples demonstrate the advantages of the biomaterial of the present invention compared to the biomaterials of prior art.

Figure 1

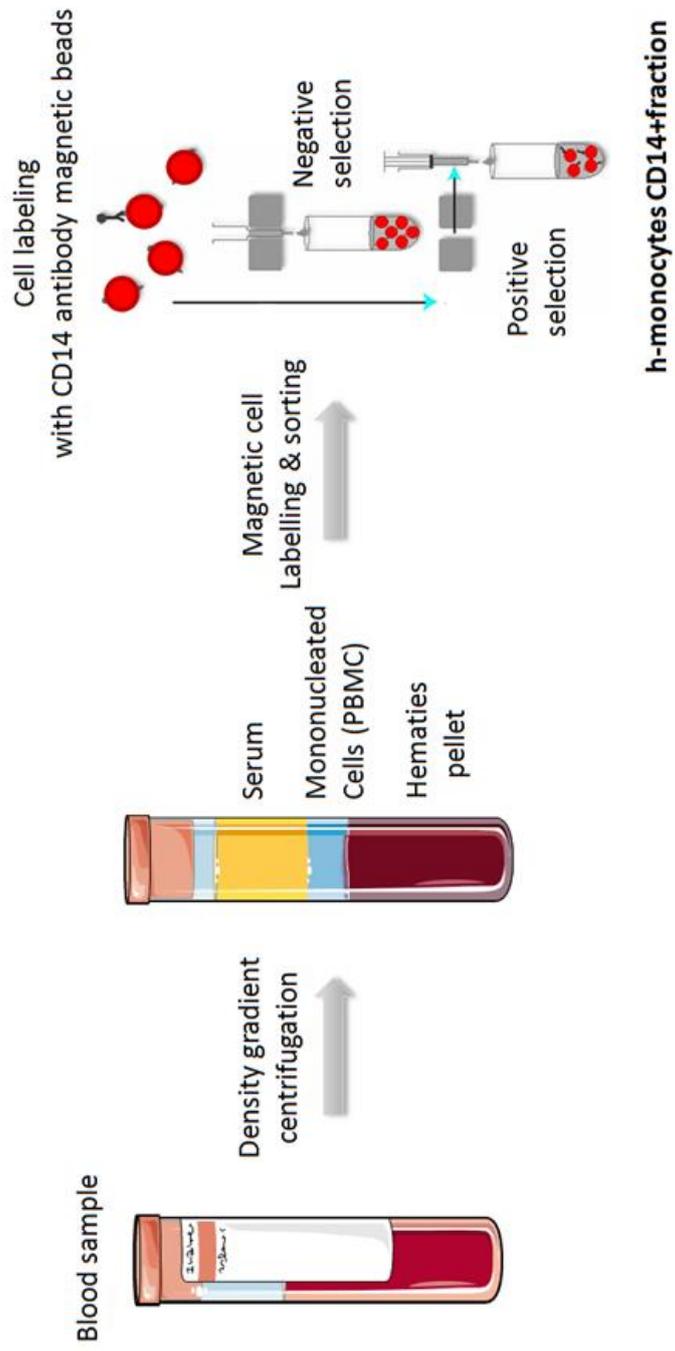


Figure 2

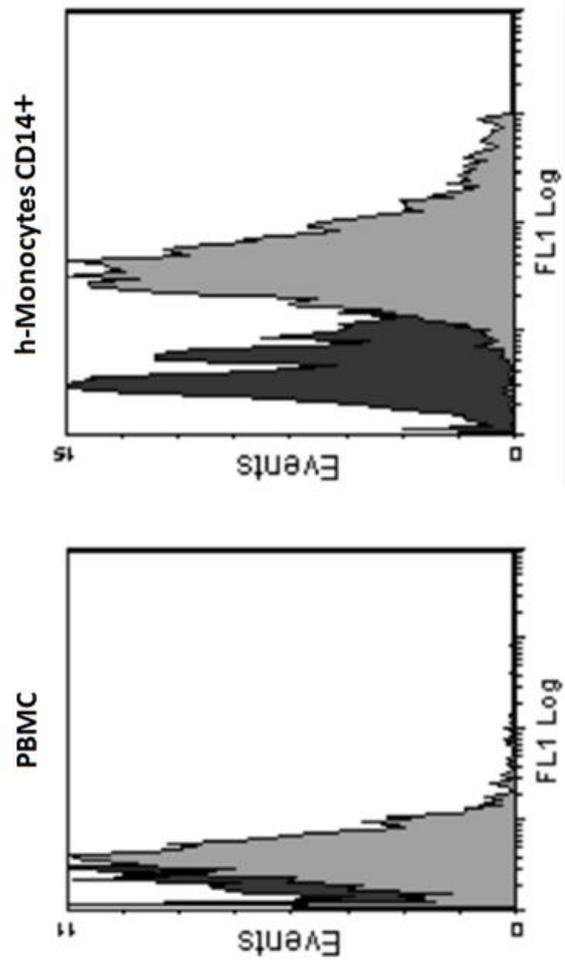
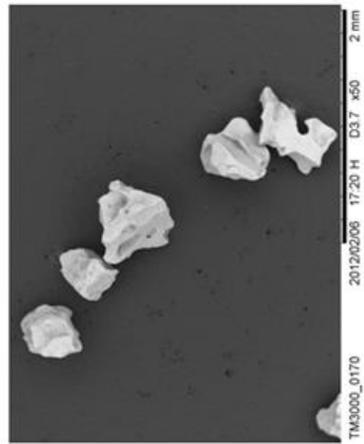
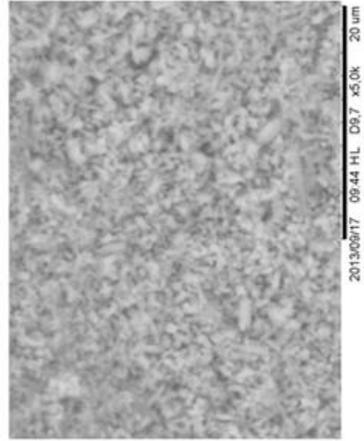


Figure 3



3a



3b

Figure 4

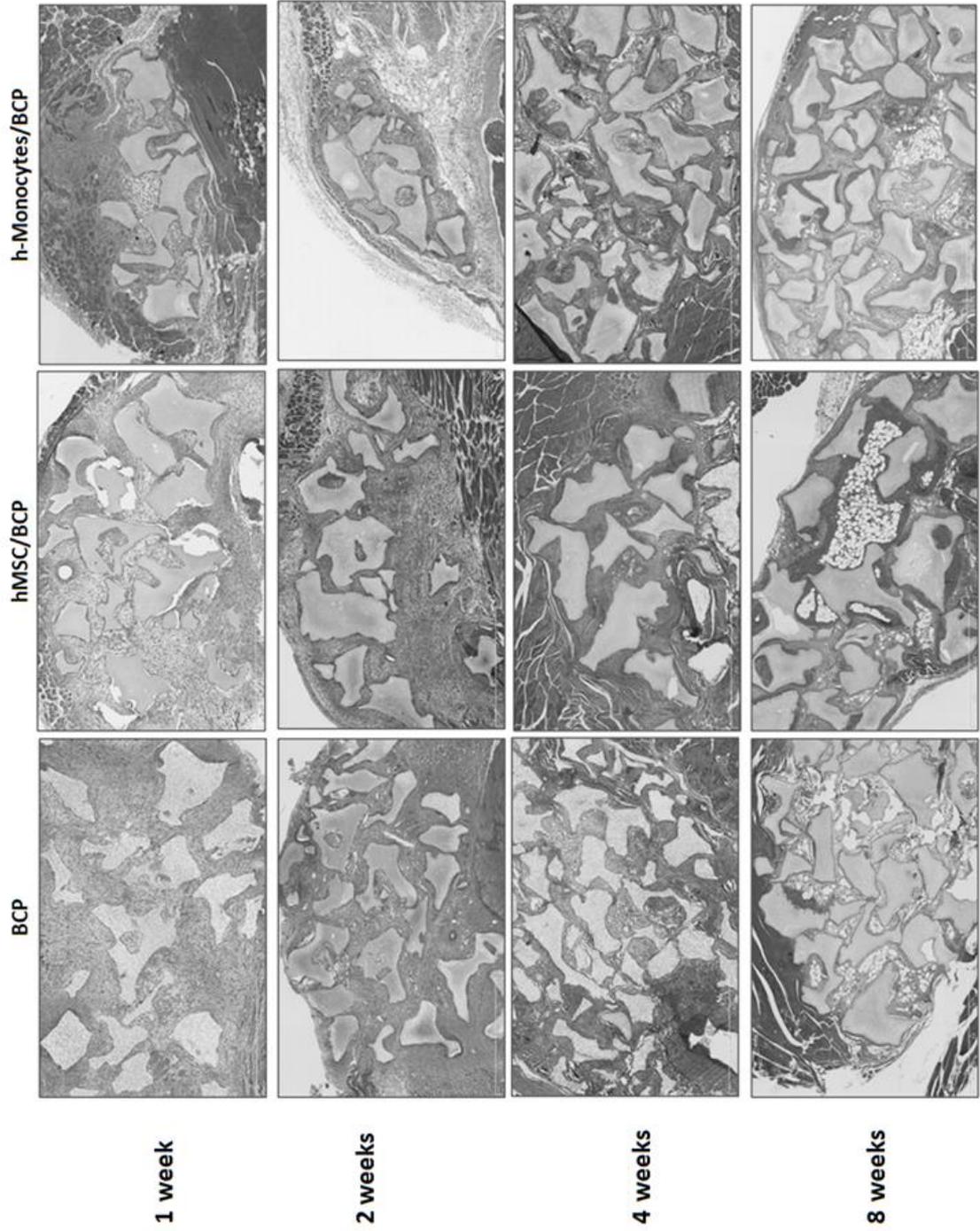


Figure 5

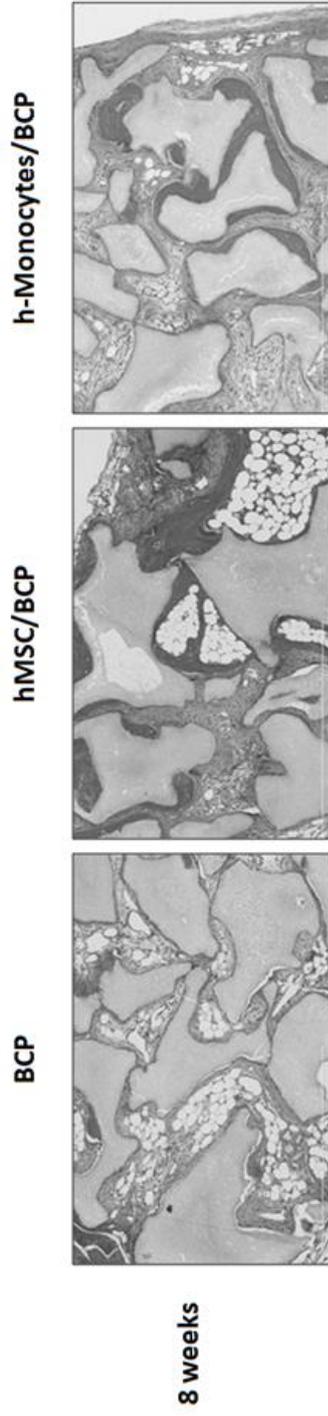


Figure 6

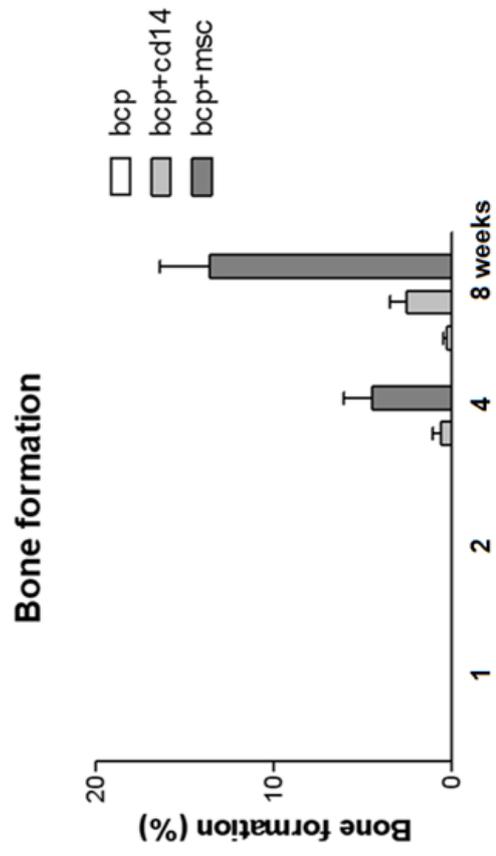


Figure 7

h-Monocytes/BCP



BCP



8 weeks

Figure 8

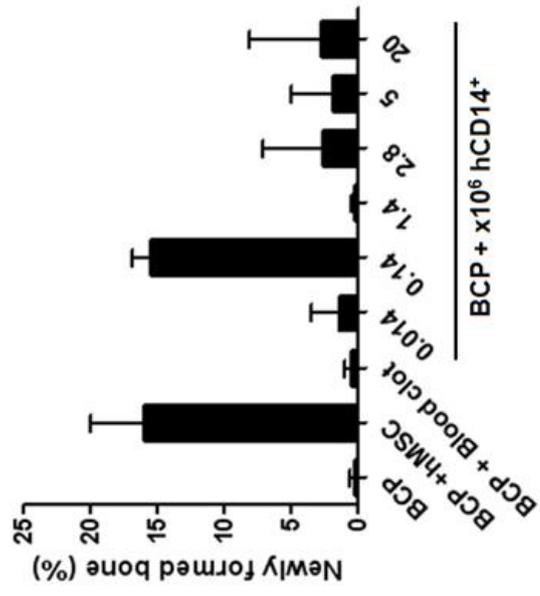


Figure 6

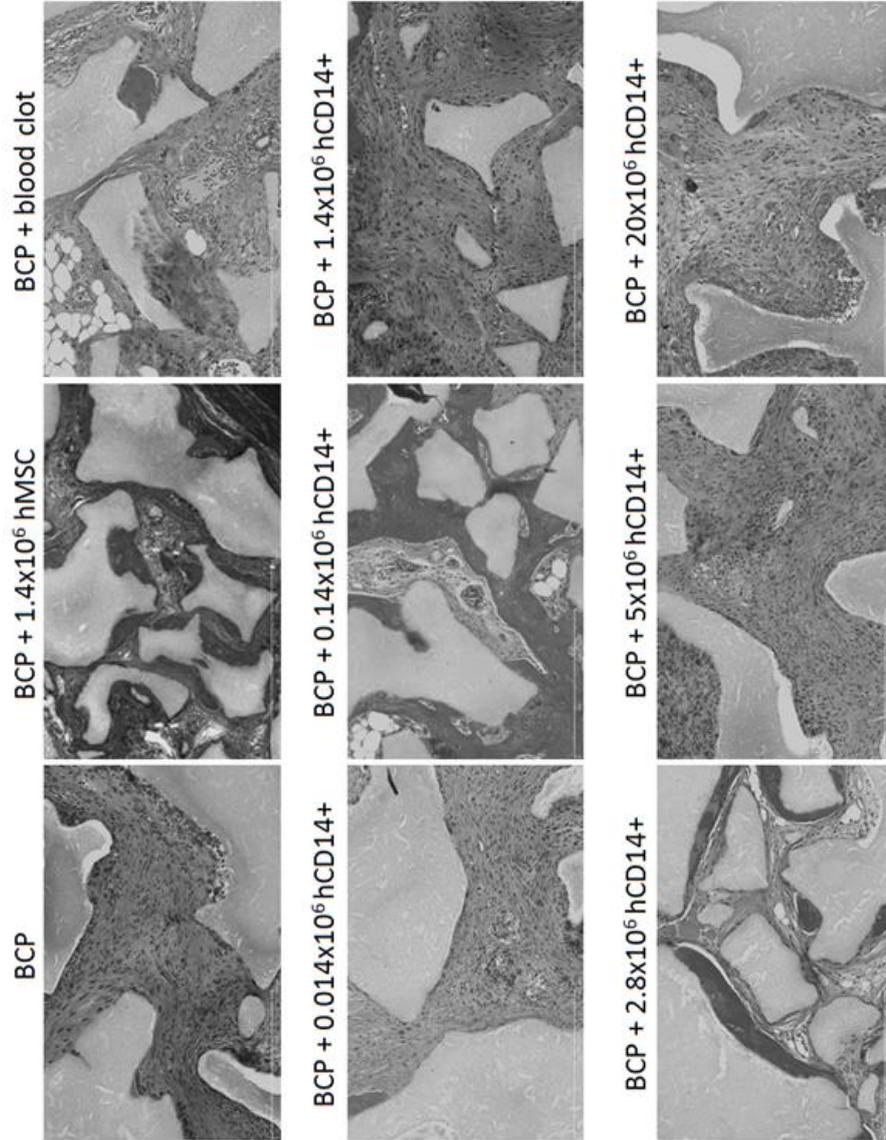


Figure 10

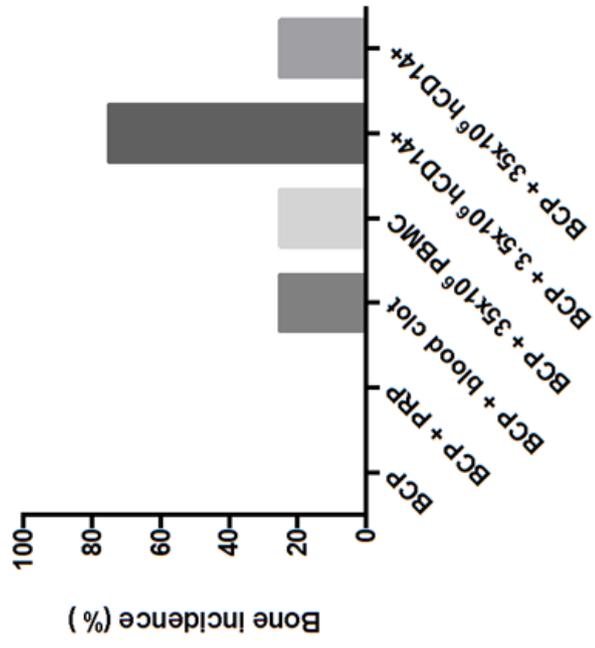


Figure 11

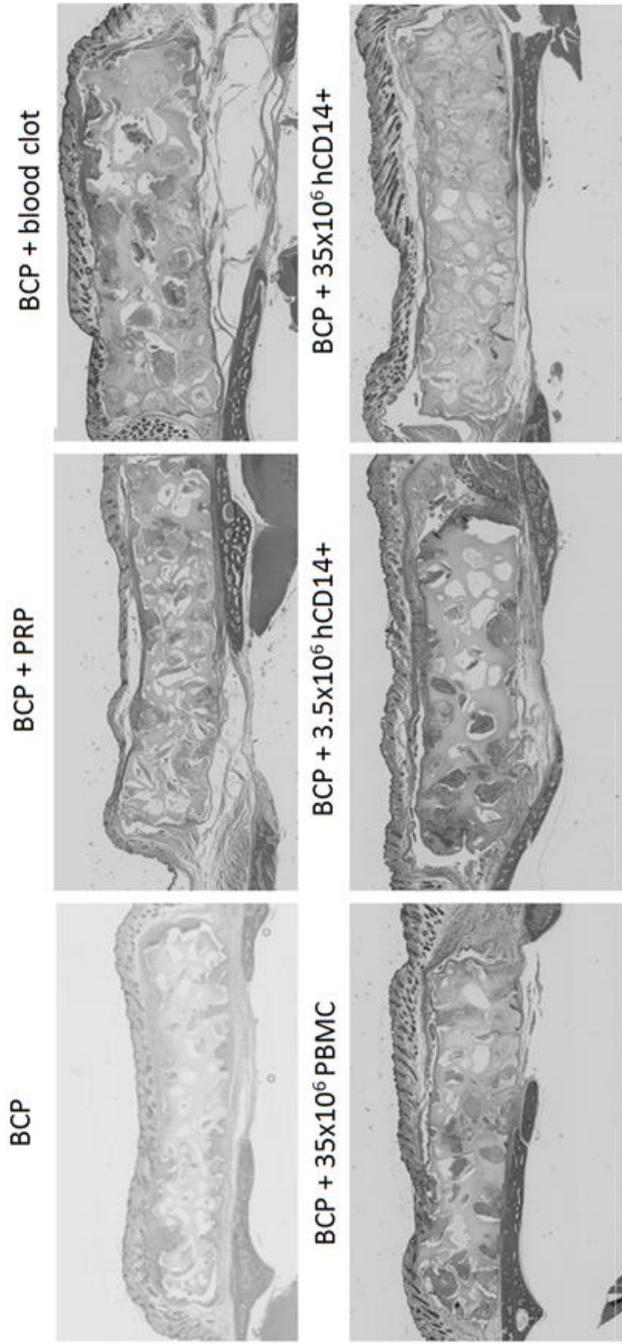
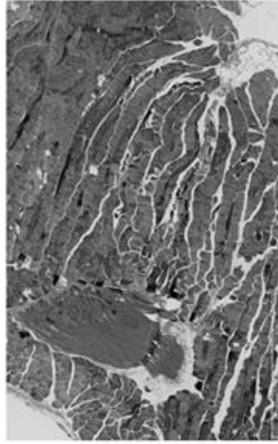
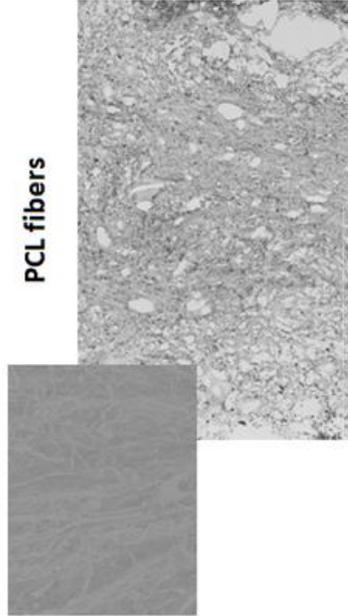


Figure 12

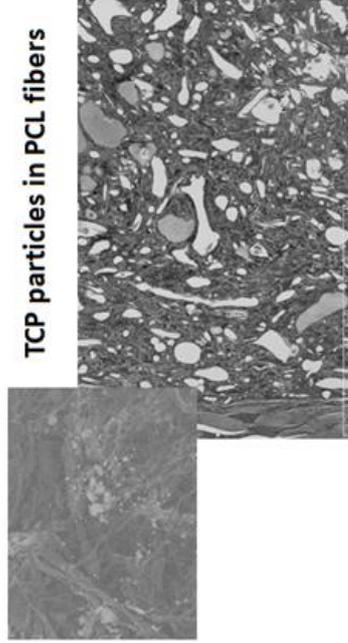
Alginate gel



PCL fibers



TCP particles in PCL fibers



BIBLIOGRAPHIE

- [1] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2008;3 Suppl 3:S131–9. doi:10.2215/CJN.04151206.
- [2] Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005;105:2631–9. doi:10.1182/blood-2004-06-2480.
- [3] Nagasawa T. [Bone and marrow niches for hematopoiesis]. *Clin Calcium* 2012;22:1659–67. doi:CliCa121116591667.
- [4] Taichman RS, Emerson SG. The Role of Osteoblasts in the Hematopoietic Microenvironment. *STEM CELLS* 1998;16:7–15. doi:10.1002/stem.160007.
- [5] Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81:277–81. doi:10.1172/JCI113318.
- [6] Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996;45:371–86.
- [7] Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 1984;15:597–612.
- [8] Posner AS. The structure of bone apatite surfaces. *J Biomed Mater Res* 1985;19:241–50. doi:10.1002/jbm.820190307.
- [9] Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 1995;16:533–44.
- [10] Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994;15:439–61. doi:10.1210/edrv-15-4-439.
- [11] Ripamonti U, Petit J-C. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:489–99. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.016.
- [12] 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.
- [13] Zhang L, Peng L-P, Wu N, Li L-P. Development of bone marrow mesenchymal stem cell culture in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2012;125:1650–5.
- [14] Fekete N, Rojewski MT, Fürst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, et al. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PloS One* 2012;7:e43255. doi:10.1371/journal.pone.0043255.
- [15] Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 2004;6:372–9. doi:10.1080/14653240410004943.
- [16] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 2008;77:289–312. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- [17] De Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 2000;19:389–94.
- [18] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254:317–30.
- [19] Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, Baldini N, Ciapetti G. Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. *Int J Artif Organs* 2011;34:998–1011. doi:10.5301/ijao.5000001.
- [20] Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *BioFactors Oxf Engl* 2010;36:25–32. doi:10.1002/biof.72.
- [21] Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 2004;23:4315–29. doi:10.1038/sj.onc.1207676.
- [22] Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555–72. doi:10.1002/jcp.1041580322.
- [23] Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 2001;28:351–61.

- [24] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17–29.
- [25] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 2006;235:176–90. doi:10.1002/dvdy.20603.
- [26] Javed A, Chen H, Ghori FY. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* 2010;22:283–93, v. doi:10.1016/j.coms.2010.05.001.
- [27] FROST HM. Measurement of osteocytes per unit volume and volume components of osteocytes and canaliculae in man. *Henry Ford Hosp Med Bull* 1960;8:208–11.
- [28] Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol Arch Ital Anat Ed Embriologia* 1996;101:25–79.
- [29] Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55:287–99. doi:10.1002/jcb.240550304.
- [30] Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2005;19:1842–4. doi:10.1096/fj.05-4221fje.
- [31] Sørensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH, et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab* 2007;25:36–45. doi:10.1007/s00774-006-0725-9.
- [32] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992;13:66–80. doi:10.1210/edrv-13-1-66.
- [33] Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 3):377–81.
- [34] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42. doi:10.1038/nature01658.
- [35] Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 8):2729–32.
- [36] Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989;245:855–7.
- [37] Hall TJ, Chambers TJ. Optimal bone resorption by isolated rat osteoclasts requires chloride/bicarbonate exchange. *Calcif Tissue Int* 1989;45:378–80.
- [38] Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 1996;271:12511–6.
- [39] Johnson MR, Polymeropoulos MH, Vos HL, Ortiz de Luna RI, Francomano CA. A nonsense mutation in the cathepsin K gene observed in a family with pycnodysostosis. *Genome Res* 1996;6:1050–5.
- [40] Halleen JM, Räsänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:22907–10.
- [41] Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, et al. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* 1994;269:15006–9.
- [42] Helfrich MH, Crockett JC, Hocking LJ, Coxon FP. The pathogenesis of osteoclast diseases: Some knowns, but still many unknowns. *BoneKEy-Osteovision* 2007;4:61–77. doi:10.1138/20060249.
- [43] Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition. McGraw Hill Professional; 2009.
- [44] Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285:25103–8. doi:10.1074/jbc.R109.041087.
- [45] Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:281–90. doi:10.1196/annals.1402.018.
- [46] Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2006;21:605–15. doi:10.1359/jbmr.060107.

- [47] Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 2002;85:185–97.
- [48] Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem* 2007;282:33098–106. doi:10.1074/jbc.M611781200.
- [49] Insogna KL, Sahni M, Grey AB, Tanaka S, Horne WC, Neff L, et al. Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J Clin Invest* 1997;100:2476–85. doi:10.1172/JCI119790.
- [50] Yang C-M, Chien C-S, Yao C-C, Hsiao L-D, Huang Y-C, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2004;279:22158–65. doi:10.1074/jbc.M401343200.
- [51] Partridge NC, Jeffrey JJ, Ehlich LS, Teitelbaum SL, Fliszar C, Welgus HG, et al. Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology* 1987;120:1956–62. doi:10.1210/endo-120-5-1956.
- [52] McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, et al. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 2000;105:433–40. doi:10.1172/JCI8905.
- [53] Saffig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13453–8.
- [54] Everts V, Delaissé JM, Körper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saffig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2002;17:77–90. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.77.
- [55] Elbeshir El. Spontaneous regeneration of the mandibular bone following hemimandibulectomy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1990;28:128–30.
- [56] Marsh D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop* 1998;S22–30.
- [57] Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:15–24.
- [58] Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 2010;132:15–30.
- [59] Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng [H]* 2010;224:1329–43.
- [60] Giannotti S, Bottai V, Dell'osso G, Pini E, De Paola G, Bugelli G, et al. Current medical treatment strategies concerning fracture healing. *Clin Cases Miner Bone Metab Off J Ital Soc Osteoporos Miner Metab Skelet Dis* 2013;10:116–20.
- [61] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011;9:66. doi:10.1186/1741-7015-9-66.
- [62] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc* 2001;10 Suppl 2:S96–101. doi:10.1007/s005860100282.
- [63] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg* 2014;9:18. doi:10.1186/1749-799X-9-18.
- [64] Keskin D, Gundogdu C, Atac AC. Experimental comparison of bovine-derived xenograft, xenograft-autologous bone marrow and autogenous bone graft for the treatment of bony defects in the rabbit ulna. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent* 2007;16:299–305. doi:10.1159/000102153.
- [65] Nade S. Clinical implications of cell function in osteogenesis. A reappraisal of bone-graft surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 1979;61:189–94.
- [66] Athanasiou VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa CD, Megas P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in

- a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2010;16:BR24–31.
- [67] Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192–5.
- [68] Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop* 2000;38–45.
- [69] Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 2011;21:407–29; discussion 429.
- [70] Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* 2009;8:457–70. doi:10.1038/nmat2441.
- [71] Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomater* 2014. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.037.
- [72] Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater Bristol Engl* 2012;7:015005. doi:10.1088/1748-6041/7/1/015005.
- [73] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36:1086–93. doi:10.1016/j.bone.2005.02.017.
- [74] Cordonnier T, Langonné A, Sohier J, Layrolle P, Rosset P, Sensébé L, et al. Consistent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:249–59. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0387.
- [75] Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008;3:e1886. doi:10.1371/journal.pone.0001886.
- [76] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–22. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
- [77] Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:569–81. doi:10.1517/14712598.8.5.569.
- [78] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726–36. doi:10.1038/nri2395.
- [79] Weiss DJ, Bertonecchio I, Borok Z, Kim C, Panoskaltsis-Mortari A, Reynolds S, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:223–72. doi:10.1513/pats.201012-071DW.
- [80] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML. Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant* 2010;19:823–30. doi:10.3727/096368910X508942.
- [81] Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2008;26:212–22. doi:10.1634/stemcells.2007-0554.
- [82] Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009;113:6576–83. doi:10.1182/blood-2009-02-203943.
- [83] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883–99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
- [84] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–86. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
- [85] Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:87–117. doi:10.1146/annurev-bioeng-070909-105309.

- [86] Mokarram N, Merchant A, Mukhatyar V, Patel G, Bellamkonda RV. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2012;33:8793–801. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.050.
- [87] Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18:349–55. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.004.
- [88] Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:R1173–87. doi:10.1152/ajpregu.00735.2009.
- [89] Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013;45:e54. doi:10.1038/emm.2013.94.
- [90] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–64. doi:10.1038/nri1733.
- [91] Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005;23:344–6. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001.
- [92] Weigert A, Brüne B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc* 2008;19:95–102. doi:10.1016/j.niox.2008.04.021.
- [93] Briken V, Mosser DM. Editorial: switching on arginase in M2 macrophages. *J Leukoc Biol* 2011;90:839–41. doi:10.1189/jlb.0411203.
- [94] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889–96. doi:10.1038/ni.1937.
- [95] Kamijo S, Nakajima A, Ikeda K, Aoki K, Ohya K, Akiba H, et al. Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:124–32. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.098.
- [96] Choi H, Park N-J, Jamiyandorj O, Hong M-H, Oh S, Park Y-B, et al. Improvement of osteogenic potential of biphasic calcium phosphate bone substitute coated with synthetic cell binding peptide sequences. *J Periodontal Implant Sci* 2012;42:166–72. doi:10.5051/jpis.2012.42.5.166.
- [97] Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 2010;132:15–30.
- [98] Veronesi E, Murgia A, Caselli A, Grisendi G, Piccinno MS, Rasini V, et al. Transportation conditions for prompt use of ex vivo expanded and freshly harvested clinical-grade bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for bone regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20:239–51. doi:10.1089/ten.TEC.2013.0250.
- [99] Tour G, Wendel M, Tcacencu I. Bone marrow stromal cells enhance the osteogenic properties of hydroxyapatite scaffolds by modulating the foreign body reaction. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. doi:10.1002/term.1574.
- [100] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:383–96. doi:10.1038/nri3209.
- [101] Shin L, Peterson DA. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:33–42. doi:10.5966/sctm.2012-0041.
- [102] Song G, Habibovic P, Bao C, Hu J, van Blitterswijk CA, Yuan H, et al. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials* 2013;34:2167–76. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.010.
- [103] Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001;69:11–20.
- [104] Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, Asher E, Loberman D, Raanani E, et al. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013;18:78–86. doi:10.1177/1074248412453875.
- [105] Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of

- macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2012;29:1614–25. doi:10.1089/neu.2011.2109.
- [106] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15:42–9. doi:10.1038/nm.1905.
- [107] Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2011;26:1517–32. doi:10.1002/jbmr.354.
- [108] Kreja L, Brenner RE, Tautzenberger A, Liedert A, Friemert B, Ehrnthaller C, et al. Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2010;109:347–55. doi:10.1002/jcb.22406.
- [109] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20764–9. doi:10.1073/pnas.0805133106.
- [110] Davison NL, Gamblin A-L, Layrolle P, Yuan H, de Bruijn JD, Barrère-de Groot F. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2014;35:5088–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.013.
- [111] Redaelli S, Bentivegna A, Foudah D, Miloso M, Redondo J, Riva G, et al. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2012;3:47. doi:10.1186/s13030-012-1138-8.
- [112] Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol* 2003;201:296–302. doi:10.1002/path.1443.
- [113] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 (Pt 2):249–58.
- [114] He L-Z, Crocker A, Lee J, Mendoza-Ramirez J, Wang X-T, Vitale LA, et al. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;178:6259–67.
- [115] Becquart P, Cambon-Binder A, Monfoulet L-E, Bourguignon M, Vandamme K, Bensidhoum M, et al. Ischemia is the prime but not the only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2084–94. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0690.
- [116] Deschepper M, Manassero M, Oudina K, Paquet J, Monfoulet L-E, Bensidhoum M, et al. Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells Dayt Ohio* 2013;31:526–35. doi:10.1002/stem.1299.
- [117] Tasso R, Augello A, Boccardo S, Salvi S, Caridà M, Postiglione F, et al. Recruitment of a host's osteoprogenitor cells using exogenous mesenchymal stem cells seeded on porous ceramic. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2203–12. doi:10.1089/ten.tea.2008.0269.
- [118] Beuvelot J, Pascaretti-Grizon F, Filmon R, Moreau M-F, Baslé MF, Chappard D. In vitro assessment of osteoblast and macrophage mobility in presence of β -TCP particles by videomicroscopy. *J Biomed Mater Res A* 2011;96:108–15. doi:10.1002/jbm.a.32959.
- [119] Velard F, Laurent-Maquin D, Braux J, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, et al. The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation. *Biomaterials* 2010;31:2001–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.066.
- [120] Roh JD, Sawh-Martinez R, Brennan MP, Jay SM, Devine L, Rao DA, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4669–74. doi:10.1073/pnas.0911465107.
- [121] Fernandes TJ, Hodge JM, Singh PP, Eeles DG, Collier FM, Holten I, et al. Cord blood-derived macrophage-lineage cells rapidly stimulate osteoblastic maturation in mesenchymal stem cells in a glycoprotein-130 dependent manner. *PloS One* 2013;8:e73266. doi:10.1371/journal.pone.0073266.

- [122] Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecristin J, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells Dayt Ohio* 2012;30:762–72. doi:10.1002/stem.1040.
- [123] Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 2010;5:e9252. doi:10.1371/journal.pone.0009252.
- [124] Cho D-I, Kim MR, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* 2014;46:e70. doi:10.1038/emm.2013.135.
- [125] Eirin A, Zhu X-Y, Li Z, Ebrahimi B, Zhang X, Tang H, et al. Endothelial outgrowth cells shift macrophage phenotype and improve kidney viability in swine renal artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1006–13. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301164.
- [126] Bouvet-Gerbettaz S, Boukhechba F, Balaguer T, Schmid-Antomarchi H, Michiels J-F, Scimeca J-C, et al. Adaptive Immune Response Inhibits Ectopic Mature Bone Formation Induced by BMSCs/BCP/Plasma Composite in Immune-Competent Mice. *Tissue Eng Part A* 2014. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0633.
- [127] 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.
- [128] Burnett SH, Kershen EJ, Zhang J, Zeng L, Straley SC, Kaplan AM, et al. Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J Leukoc Biol* 2004;75:612–23. doi:10.1189/jlb.0903442.
- [129] Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* 2005;280:1336–45. doi:10.1074/jbc.M406968200.
- [130] Pelleitier M, Montplaisir S. The nude mouse: a model of deficient T-cell function. *Methods Achiev Exp Pathol* 1975;7:149–66.
- [131] Toben D, Schroeder I, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann J-E, Frisch J-T, et al. Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2011;26:113–24. doi:10.1002/jbmr.185.
- [132] Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000;177:134–40.
- [133] Tso GHW, Law HKW, Tu W, Chan GCF, Lau YL. Phagocytosis of Apoptotic Cells Modulates Mesenchymal Stem Cells Osteogenic Differentiation to Enhance IL-17 and RANKL Expression on CD4+ T Cells. *STEM CELLS* 2010;28:939–54. doi:10.1002/stem.406.
- [134] Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. *Mediators Inflamm* 2013;2013. doi:10.1155/2013/491497.
- [135] Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, et al. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol Med Camb Mass* 2013;19:88–98. doi:10.2119/molmed.2012.00306.
- [136] Arrondeau J, Gan HK, Razak ARA, Paoletti X, Le Tourneau C. Development of anti-cancer drugs. *Discov Med* 2010;10:355–62.
- [137] Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:253–4. doi:10.1038/nrd3144.
- [138] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* 2008;4:682–90. doi:10.1038/nchembio.118.
- [139] Kola I. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:227–30. doi:10.1038/sj.clpt.6100479.
- [140] DiMasi JA, Grabowski HG. Economics of new oncology drug development. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007;25:209–16. doi:10.1200/JCO.2006.09.0803.
- [141] Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr* 2009;4:13–22. doi:10.1007/s12263-008-0107-0.
- [142] Bhadriraju K, Chen CS. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 2002;7:612–20.

- [143] Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 2004;9:273–85. doi:10.1177/1087057104265040.
- [144] Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:753–62.
- [145] Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 1997;137:231–45.
- [146] Martins GG, Kolega J. Endothelial cell protrusion and migration in three-dimensional collagen matrices. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006;63:101–15. doi:10.1002/cm.20104.
- [147] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001;294:1708–12. doi:10.1126/science.1064829.
- [148] Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differ Res Biol Divers* 2002;70:537–46. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x.
- [149] Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12378–82.
- [150] Houthuijzen JM, Daenen LGM, Roodhart JML, Voest EE. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer* 2012;106:1901–6. doi:10.1038/bjc.2012.201.
- [151] Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003;5:711–9. doi:10.1038/ncb1019.
- [152] Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JCR, Giancotti F, et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2002;2:205–16.
- [153] Discher DE, Janmey P, Wang Y-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005;310:1139–43. doi:10.1126/science.1116995.
- [154] Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 2011;17:713–24. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0273.
- [155] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8:241–54. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010.
- [156] Schwartz MP, Fairbanks BD, Rogers RE, Rangarajan R, Zaman MH, Anseth KS. A synthetic strategy for mimicking the extracellular matrix provides new insight about tumor cell migration. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro* 2010;2:32–40. doi:10.1039/b912438a.
- [157] Tilghman RW, Cowan CR, Mih JD, Koryakina Y, Gioeli D, Slack-Davis JK, et al. Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PloS One* 2010;5:e12905. doi:10.1371/journal.pone.0012905.
- [158] Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Siemeski A, Mackellar D, Gong H, et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10889–94. doi:10.1073/pnas.0604460103.
- [159] Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:113–27. doi:10.1007/s10555-008-9173-4.
- [160] Pathak A, Kumar S. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro* 2011;3:267–78. doi:10.1039/c0ib00095g.
- [161] Schindler M, Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Liu H-Y, Amor N, et al. Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem Biophys* 2006;45:215–27. doi:10.1385/CBB:45:2:215.

- [162] Yamada KM, Cukierman E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* 2007;130:601–10. doi:10.1016/j.cell.2007.08.006.
- [163] Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891–906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027.
- [164] Kolehmainen K, Willerth SM. Preparation of 3D Fibrin Scaffolds for Stem Cell Culture Applications. *J Vis Exp JoVE* 2012. doi:10.3791/3641.
- [165] Chawla K, Yu T-B, Liao SW, Guan Z. Biodegradable and biocompatible synthetic saccharide-Peptide hydrogels for three-dimensional stem cell culture. *Biomacromolecules* 2011;12:560–7. doi:10.1021/bm100980w.
- [166] Puvanewary S, Balaji Raghavendran HR, Ibrahim NS, Murali MR, Merican AM, Kamarul T. A Comparative Study on Morphochemical Properties and Osteogenic Cell Differentiation within Bone Graft and Coral Graft Culture Systems. *Int J Med Sci* 2013;10:1608–14. doi:10.7150/ijms.6496.
- [167] Rousselle AV, Heymann D, Demais V, Charrier C, Passuti N, Baslé MF. Influence of metal ion solutions on rabbit osteoclast activities in vitro. *Histol Histopathol* 2002;17:1025–32.
- [168] Papadimitropoulos A, Scherberich A, Güven S, Theilgaard N, Crooijmans HJA, Santini F, et al. A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 2011;21:445–58; discussion 458.
- [169] Boukhechba F, Balaguer T, Michiels J-F, Ackermann K, Quincey D, Bouler J-M, et al. Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2009;24:1927–35. doi:10.1359/jbmr.090517.
- [170] Cordonnier T, Langonné A, Corre P, Renaud A, Sensebé L, Rosset P, et al. Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8:364–76. doi:10.1002/term.1529.
- [171] Rosenberg N, Rosenberg O. Extracorporeal human bone-like tissue generation. *Bone Jt Res* 2012;1:1–7. doi:10.1302/2046-3758.11.2000007.
- [172] Clarke MSF, Sundaresan A, Vanderburg CR, Banigan MG, Pellis NR. A three-dimensional tissue culture model of bone formation utilizing rotational co-culture of human adult osteoblasts and osteoclasts. *Acta Biomater* 2013;9:7908–16. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.051.
- [173] Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 2008;149:3688–97. doi:10.1210/en.2007-1719.
- [174] Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012;4:61–76. doi:10.1177/1759720X11430858.
- [175] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007;13:791–801. doi:10.1038/nm1593.
- [176] Atik OS, Gunal I, Korkusuz F. Burden of osteoporosis. *Clin Orthop* 2006;443:19–24. doi:10.1097/01.blo.0000200248.34876.fe.
- [177] Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2006;12:6243s – 6249s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0931.
- [178] Ando K, Heymann M-F, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers* 2013;5:591–616. doi:10.3390/cancers5020591.
- [179] Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:540–57. doi:10.1038/nrendo.2011.81.
- [180] Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2013;18:240–9. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- [181] Wang C-C, Chen C-H, Hwang S-M, Lin W-W, Huang C-H, Lee W-Y, et al. Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009;27:724–32. doi:10.1634/stemcells.2008-0944.

- [182] Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:633–9.
- [183] Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Regulated expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamins and hormones. *Vitam Horm* 1999;55:443–509.
- [184] Livingston TL, Gordon S, Archambault M, Kadiyala S, McIntosh K, Smith A, et al. Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:211–8.
- [185] Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* 2005;26:3631–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.035.
- [186] Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 1998;16:155–62. doi:10.1002/jor.1100160202.
- [187] Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR* 2014;100:S107–12. doi:10.1016/j.otsr.2013.11.010.
- [188] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42. doi:10.1038/nature01658.
- [189] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175–9. doi:10.1038/36593.
- [190] Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, et al. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 2008;58:1299–309. doi:10.1002/art.23417.
- [191] Heymann D. Anti-RANKL therapy for bone tumours: Basic, pre-clinical and clinical evidences. *J Bone Oncol* 2012;1:2–11. doi:10.1016/j.jbo.2012.03.001.
- [192] Jules J, Ashley JW, Feng X. Selective targeting of RANK signaling pathways as new therapeutic strategies for osteoporosis. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:923–34. doi:10.1517/14728222.2010.511179.
- [193] Heinemann C, Heinemann S, Worch H, Hanke T. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur Cell Mater* 2011;21:80–93.
- [194] Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater* 2008;4:139–48. doi:10.1016/j.actbio.2007.03.014.
- [195] Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 2008;149:3688–97. doi:10.1210/en.2007-1719.
- [196] Oshina H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Sugata Y, Maehara H, et al. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone* 2007;41:575–83. doi:10.1016/j.bone.2007.06.022.
- [197] Boukhechba F, Balaguer T, Michiels J-F, Ackermann K, Quincey D, Bouler J-M, et al. Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2009;24:1927–35. doi:10.1359/jbmr.090517.
- [198] Mouline CC, Quincey D, Laugier J-P, Carle GF, Bouler J-M, Rochet N, et al. Osteoclastic differentiation of mouse and human monocytes in a plasma clot/biphasic calcium phosphate microparticles composite. *Eur Cell Mater* 2010;20:379–92.
- [199] Ruggiu A, Tortelli F, Komlev VS, Peyrin F, Cancedda R. Extracellular matrix deposition and scaffold biodegradation in an in vitro three-dimensional model of bone by X-ray computed microtomography. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. doi:10.1002/term.1559.
- [200] Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adhes Migr* 2014;8.
- [201] Gioia R, Panaroni C, Besio R, Palladini G, Merlini G, Giansanti V, et al. Impaired osteoblastogenesis in a murine model of dominant osteogenesis imperfecta: a new target for osteogenesis imperfecta pharmacological therapy. *Stem Cells Dayt Ohio* 2012;30:1465–76. doi:10.1002/stem.1107.

- [202] Redini F, Odri GA, Picarda G, Gaspar N, Heymann M-F, Corradini N, et al. Drugs targeting the bone microenvironment: new therapeutic tools in Ewing's sarcoma? *Expert Opin Emerg Drugs* 2013;18:339–52. doi:10.1517/14728214.2013.823948.
- [203] Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One* 2010;5:e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999.
- [204] Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, et al. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2013;93:1100–14. doi:10.1038/labinvest.2013.101.
- [205] Sieh S, Taubenberger AV, Lehman ML, Clements JA, Nelson CC, Hutmacher DW. Paracrine interactions between LNCaP prostate cancer cells and bioengineered bone in 3D in vitro culture reflect molecular changes during bone metastasis. *Bone* 2014. doi:10.1016/j.bone.2014.02.001.
- [206] Taubenberger AV, Quent VM, Thibaudeau L, Clements JA, Hutmacher DW. Delineating breast cancer cell interactions with engineered bone microenvironments. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2013;28:1399–411. doi:10.1002/jbmr.1875.
- [207] Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, Reilly GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2010;5:713–24. doi:10.2217/rme.10.60.
- [208] Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* 2005;28:8–13.
- [209] Xue Y, Xing Z, Hellem S, Arvidson K, Mustafa K. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biomed Eng OnLine* 2009;8:34. doi:10.1186/1475-925X-8-34.
- [210] Saleh FA, Whyte M, Genever PG. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *Eur Cell Mater* 2011;22:242–57; discussion 257.
- [211] Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 2003;92:1123–9. doi:10.1161/01.RES.0000074881.56564.46.
- [212] 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;32:321–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.041.
- [213] Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol* 2009;219:294–305. doi:10.1002/path.2603.
- [214] Ando K, Mori K, Rédini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol* 2008;5:263–8.
- [215] Endo-Munoz L, Evdokiou A, Saunders NA. The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826:434–42. doi:10.1016/j.bbcan.2012.07.003.
- [216] Bacci G, Picci P, Briccoli A, Avella M, Ferrari S, Femino FP, et al. Osteosarcoma of the extremity metastatic at presentation: results achieved in 26 patients treated with combined therapy (primary chemotherapy followed by simultaneous resection of the primary and metastatic lesions). *Tumori* 1992;78:200–6.
- [217] Meyers PA, Heller G, Healey JH, Huvos A, Applewhite A, Sun M, et al. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1993;11:449–53.
- [218] Bickels J, Jelinek JS, Shmookler BM, Neff RS, Malawer MM. Biopsy of musculoskeletal tumors. Current concepts. *Clin Orthop* 1999;212–9.
- [219] Whelan J, McTiernan A, Cooper N, Wong YK, Francis M, Vernon S, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007. *Int J Cancer J Int Cancer* 2012;131:E508–17. doi:10.1002/ijc.26426.
- [220] Linabery AM, Ross JA. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* 2008;112:416–32. doi:10.1002/cncr.23169.

- [221] Marcove RC, Miké V, Hajek JV, Levin AG, Hutter RV. Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one. A review of one hundred and forty-five operative cases. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52:411–23.
- [222] Ng AJ, Mutsaers AJ, Baker EK, Walkley CR. Genetically engineered mouse models and human osteosarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2012;2:19. doi:10.1186/2045-3329-2-19.
- [223] Ferrís I, Tortajada J, Berbel Tornero O, Ortega García JA, Claudio-Morales L, García I, Castell J, Martí Perales V, et al. [Risk factors for pediatric malignant bone tumors]. *An Pediatría Barc Spain* 2003 2005;63:537–47.
- [224] Bohndorf K, Reiser M, Lochner B, Féaux de Lacroix W, Steinbrich W. Magnetic resonance imaging of primary tumours and tumour-like lesions of bone. *Skeletal Radiol* 1986;15:511–7.
- [225] Sundaram M, McGuire MH, Herbold DR. Magnetic resonance imaging of osteosarcoma. *Skeletal Radiol* 1987;16:23–9.
- [226] Fox MG, Trotta BM. Osteosarcoma: review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging. *Semin Musculoskelet Radiol* 2013;17:123–36. doi:10.1055/s-0033-1342969.
- [227] Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, Hendifar A, Chawla S, Fedenko A, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012;2012:704872. doi:10.1155/2012/704872.
- [228] Miller BJ, Cram P, Lynch CF, Buckwalter JA. Risk factors for metastatic disease at presentation with osteosarcoma: an analysis of the SEER database. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95:e89. doi:10.2106/JBJS.L.01189.
- [229] Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, Pinto D, et al. Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 1997;8:765–71.
- [230] Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1992;10:5–15.
- [231] Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One* 2010;5:e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999.
- [232] Jain RK, Duda DG. Role of bone marrow-derived cells in tumor angiogenesis and treatment. *Cancer Cell* 2003;3:515–6.
- [233] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438:820–7. doi:10.1038/nature04186.
- [234] Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194–201. doi:10.1038/nm1101-1194.
- [235] Shaked Y, Henke E, Roodhart JML, Mancuso P, Langenberg MHG, Colleoni M, et al. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008;14:263–73. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.001.
- [236] Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, et al. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99:622–31. doi:10.1038/sj.bjc.6604508.
- [237] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557–63. doi:10.1038/nature06188.
- [238] Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penfornis P, et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:293–300. doi:10.1007/s10549-009-0458-2.
- [239] Roodhart JML, Daenen LGM, Stigter ECA, Prins H-J, Gerrits J, Houthuijzen JM, et al. Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of

- Platinum-Induced Fatty Acids. *Cancer Cell* 2011;20:370–83. doi:10.1016/j.ccr.2011.08.010.
- [240] Moriceau G, Ory B, Gobin B, Verrecchia F, Gouin F, Blanchard F, et al. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2010;16:2981–7.
- [241] Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:209–57. doi:10.1196/annals.1402.089.
- [242] Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74–86. doi:10.1016/j.bone.2005.02.020.
- [243] Yarbrough DK, Hagerman E, Eckert R, He J, Choi H, Cao N, et al. Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcif Tissue Int* 2010;86:58–66. doi:10.1007/s00223-009-9312-0.
- [244] Lu K, Yin X, Weng T, Xi S, Li L, Xing G, et al. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1. *Nat Cell Biol* 2008;10:994–1002. doi:10.1038/ncb1760.
- [245] Zhang G, Guo B, Wu H, Tang T, Zhang B-T, Zheng L, et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy. *Nat Med* 2012;18:307–14. doi:10.1038/nm.2617.
- [246] Szuhai K, Cleton-Jansen A-M, Hogendoorn PCW, Bovée JVMG. Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors. *Cancer Genet* 2012;205:193–204. doi:10.1016/j.cancergen.2012.04.001.
- [247] Hong K, Zheng W, Baker A, Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett* 1997;400:233–7.
- [248] Maksimenko A, Malvy C. Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9:825–30. doi:10.1517/14728222.9.4.825.
- [249] Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, Bertrand J-R, Fattal E, Maccario J, et al. Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 2003;20:1565–7.
- [250] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687–90.
- [251] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673–82.
- [252] Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003;22:8628–33. doi:10.1038/sj.onc.1207232.
- [253] Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 1997;7:821–30.
- [254] Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 1997;277:768.
- [255] Picarda G, Trichet V, Teletchea S, Heymann D, Redini F. TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment. *Am J Cancer Res* 2011;2:45–64.
- [256] Wu GS. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Lett* 2009;285:1–5. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.029.
- [257] Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, Nicoletti G, Nanni P, Lollini P-L, et al. Targeting CD99 in association with doxorubicin: An effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 2006;42:91–6. doi:10.1016/j.ejca.2005.09.015.
- [258] Kapoor P, Greipp PT, Morice WG, Rajkumar SV, Witzig TE, Greipp PR. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008;141:135–48. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07024.x.
- [259] Siebert JM, Baumann D, Zeller A, Mailänder V, Landfester K. Synthesis of polyester nanoparticles in miniemulsion obtained by radical ring-opening of BMDO and their

- potential as biodegradable drug carriers. *Macromol Biosci* 2012;12:165–75. doi:10.1002/mabi.201100236.
- [260] Rousseau J, Escriou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scherman D, et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther* 2010;17:387–97. doi:10.1038/cgt.2009.89.
- [261] Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008;452:591–7. doi:10.1038/nature06765.
- [262] Coelho J. *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*. Springer Science & Business Media; 2013.
- [263] Rousseau J, Escriou V, Lamoureux F, Brion R, Chesneau J, Battaglia S, et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2011;26:2452–62. doi:10.1002/jbmr.455.
- [264] Khoury M, Escriou V, Courties G, Galy A, Yao R, Largeau C, et al. Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis Rheum* 2008;58:2356–67. doi:10.1002/art.23660.
- [265] Yuan H, Lanting L, Xu Z-G, Li S-L, Swiderski P, Putta S, et al. Effects of cholesterol-tagged small interfering RNAs targeting 12/15-lipoxygenase on parameters of diabetic nephropathy in a mouse model of type 1 diabetes. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2008;295:F605–17. doi:10.1152/ajprenal.90268.2008.
- [266] Kojima T, Wang X, Fujiwara K, Osaka S, Yoshida Y, Osaka E, et al. Inhibition of Human Osteosarcoma Cell Migration and Invasion by a Gene Silencer, Pyrrole–Imidazole Polyamide, Targeted at the Human MMP9 NF-κB Binding Site. *Biol Pharm Bull* 2014;37:1460–5. doi:10.1248/bpb.b14-00147.
- [267] Charoen KM, Fallica B, Colson YL, Zaman MH, Grinstaff MW. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. *Biomaterials* 2014;35:2264–71. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.038.
- [268] Altmann B, Löchner A, Swain M, Kohal R-J, Giselsbrecht S, Gottwald E, et al. Differences in morphogenesis of 3D cultured primary human osteoblasts under static and microfluidic growth conditions. *Biomaterials* 2014;35:3208–19. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.088.
- [269] Swami A, Reagan MR, Basto P, Mishima Y, Kamaly N, Glavey S, et al. Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10287–92. doi:10.1073/pnas.1401337111.
- [270] Sekido T, Sakura N, Higashi Y, Miya K, Nitta Y, Nomura M, et al. Novel drug delivery system to bone using acidic oligopeptide: pharmacokinetic characteristics and pharmacological potential. *J Drug Target* 2001;9:111–21.
- [271] Yokogawa K, Miya K, Sekido T, Higashi Y, Nomura M, Fujisawa R, et al. Selective delivery of estradiol to bone by aspartic acid oligopeptide and its effects on ovariectomized mice. *Endocrinology* 2001;142:1228–33. doi:10.1210/endo.142.3.8024.
- [272] Griffin MO, Ceballos G, Villarreal FJ. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* 2011;63:102–7. doi:10.1016/j.phrs.2010.10.004.
- [273] Neale JR, Richter NB, Merten KE, Taylor KG, Singh S, Waite LC, et al. Bone selective effect of an estradiol conjugate with a novel tetracycline-derived bone-targeting agent. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:680–3. doi:10.1016/j.bmcl.2008.12.051.
- [274] Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2010;16:2363–74. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779.
- [275] Tabernero J, Chawla SP, Kindler H, Reckamp K, Chiorean EG, Azad NS, et al. Anticancer activity of the type I insulin-like growth factor receptor antagonist, ganitumab, in combination with the death receptor 5 agonist, conatumumab. *Target Oncol* 2014;1–12. doi:10.1007/s11523-014-0315-z.

- [276] Balaguer T, Boukhechba F, Clavé A, Bouvet-Gerbetaz S, Trojani C, Michiels J-F, et al. Biphasic calcium phosphate microparticles for bone formation: benefits of combination with blood clot. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3495–505. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0227.
- [277] Pignolo RJ, Kassem M. Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2011;26:1685–93. doi:10.1002/jbmr.370.
- [278] Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, et al. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol* 2003;74:833–45. doi:10.1189/jlb.0403170.
- [279] Rabillard M, Grand J-G, Dalibert E, Fellah B, Gauthier O, Niebauer GW. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar osteotomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol VCOT* 2009;22:460–6. doi:10.3415/VCOT-09-04-0048.
- [280] Zhang Z, Shively JE. Acceleration of bone repair in NOD/SCID mice by human monoosteophils, novel LL-37-activated monocytes. *PloS One* 2013;8:e67649. doi:10.1371/journal.pone.0067649.
- [281] Zhang Z, Shively JE. Generation of novel bone forming cells (monoosteophils) from the cathelicidin-derived peptide LL-37 treated monocytes. *PloS One* 2010;5:e13985. doi:10.1371/journal.pone.0013985.
- [282] Dong L, Wang C. Harnessing the power of macrophages/monocytes for enhanced bone tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2013;31:342–6. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.001.
- [283] Zhang HG, Zhu Q. Preparation of porous hydroxyapatite with interconnected pore architecture. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:1825–9. doi:10.1007/s10856-007-3036-3.
- [284] Jarcho M. Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent Clin North Am* 1986;30:25–47.
- [285] Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, et al. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 1996;157:3850–9.
- [286] De Baey A, Lanzavecchia A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* 2000;191:743–8.
- [287] Salio M, Cerundolo V, Lanzavecchia A. Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells. *Eur J Immunol* 2000;30:705–8. doi:10.1002/1521-4141(200002)30:2<705::AID-IMMU705>3.0.CO;2-P.
- [288] Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Fürhapter C, Herold M, Fritsch P, et al. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;168:6199–207.
- [289] Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman K-A, Shin A, Beecroft T, et al. Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood* 2003;102:1753–63. doi:10.1182/blood-2002-12-3854.
- [290] Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;171:3154–62.
- [291] Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, et al. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9479–84. doi:10.1073/pnas.0400733101.
- [292] Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4560–5. doi:10.1073/pnas.0400983101.
- [293] Vitale S, Schmid-Alliana A, Breuil V, Pomeranz M, Millet M-A, Rossi B, et al. Soluble fractalkine prevents monocyte chemoattractant protein-1-induced monocyte

migration via inhibition of stress-activated protein kinase 2/p38 and matrix metalloproteinase activities. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:585–92.

- [294] Ryan EJ, Marshall AJ, Magaletti D, Floyd H, Draves KE, Olson NE, et al. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;169:5638–48.

ETUDE DE L'ENVIRONNEMENT 3D DU TISSU OSSEUX : APPLICATIONS EN THERAPIES REGENERATIVE ET ANTI-TUMORALE

L'étude du micro-environnement apparaît comme un défi majeur tant dans un contexte de régénération osseuse que dans le développement de nouvelles thérapies ciblant les tumeurs osseuses primitives. Avec plus d'un million de greffes réalisées chaque année en Europe, l'os est le tissu le plus transplanté. Afin de traiter un certain nombre de ces affections osseuses, des avancées cliniques telles que la régénération, ont pu être développées. L'approche combinatoire, cellules souches mésenchymateuses (CSM) et biomatériaux de phosphate de calcium (BCP), a montré son potentiel dans différentes études *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, le mécanisme d'ostéoinduction est à ce jour inconnu. Les travaux présentés dans cette thèse identifient les populations cellulaires, macrophages et ostéoclastes, intervenant dans le processus de régénération osseuse à partir des CSM mais aussi d'un autre type cellulaire, les monocytes.

Le développement de nouvelles molécules de traitement suivent, dans la majorité des cas, un même processus de recherche. Ces étapes demandent de nombreux tests ; dans un premier temps, sur des cellules primaires ou des lignées cultivées en 2D, et par la suite sur des modèles *in vivo* adaptés à la pathologie concernée. Malgré ce lourd processus, seul un très faible pourcentage de ces composés est mis sur le marché. La nécessité de créer un intermédiaire entre les 2 systèmes de tests *in vitro* et *in vivo* semble essentiel. Dans cette étude, nous avons ainsi mis au point un modèle de culture 3D miniaturisé de cellules engagées dans la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. Par la suite, ce modèle a été modifié pour l'étude des cellules d'ostéosarcome (tumeur osseuse primitive) et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Pour cela, les cellules d'ostéosarcome ont été cultivées sur la structure 3D hybride constituée des CSM et BCP. Cet outil a été utilisé par la suite pour le test de différentes stratégies de vectorisation de molécules : le ciblage à l'os et le ciblage des cellules tumorales.

Mots clés : Ingénierie tissulaire, Thérapie régénérative, Tissu osseux, Ostéosarcome, Modèle 3D, Cellules souches mésenchymateuses et monocytes

STUDY OF 3D ENVIRONNEMENT OF BONE TISSUE : APPLICATIONS FOR REGENERATIVE AND ANTI-TUMOR THERAPIES

The study of the micro-environment appears as a major challenge both in a context of bone regeneration and in a development of new therapies targeting the primitive osseous tumors. With more than a million transplants realized every year in Europe, the bone is the tissue the most transplanted in human. To handle a number of these osseous affections, clinical advances such as the regeneration, were able to be developed. The combinatorial approach, the mesenchymal stem cells (MSC) and calcium phosphate biomaterials (BCP), showed its potential in various *in vitro* and *in vivo* studies. Nevertheless, nowadays, the mechanism of osteoinduction is unknown. The works presented in this thesis identify the cellular populations implied in the process of regeneration from MSC but also from another cellular type, the monocytes.

The discovery and the development of new molecules of treatment follow, in the majority of the cases, the same process of research. These steps ask for numerous tests; at first, on primary cells or cell lines cultivated in 2D, and afterward on *in vivo* models adapted to the concerned pathology. In spite of this heavy process, only a very low percentage of these compounds is launched on the market. The necessity of creating an intermediary between the culture and *in vivo* models seems essential. In this study, we so finalized a miniaturized model of 3D culture by cells committed in the osteoblastic and osteoclastic differentiation. Afterward, this model was modified for study of osteosarcoma cells (primitive osseous tumor) and the development of new therapeutic molecules. For that purpose, the osteosarcoma cells were cultivated on the hybrid 3D structure established with CSM and BCP. This tool was afterward used for the test of various strategies: the drug targeting to bone surface and specifically cancer cells.

Key words : Tissue engineering, Regenerative therapies, Bone tissue, Osteosarcoma, 3D model, Mesenchymal stem cells and Monocytes