

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

									4	7
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

Nouvelles approches d'ingénierie tissulaire pour la reconstruction osseuse en territoire irradié

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : ORL ; Biomatériaux

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Florent ESPITALIER

Le 21 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président :

Rapporteurs : M. Marc BENDERITTER, Directeur de Recherche, Fontenay-aux-roses
M. Dominique CHEVALIER, Professeur, Lille

Examineurs : M. Jean LACAU SAINT GUILY, Professeur, Paris
M. Pierre WEISS, Professeur, Nantes

Membres invités : M. Philippe BORDURE, Professeur, Nantes
M. Jérôme GUICHEUX, Directeur de Recherche, Nantes

Directeur de Thèse : M. Olivier MALARD, Professeur, Nantes

Co-Directeur de Thèse : M. Olivier LABOUX, Professeur, Nantes

Sommaire

INTRODUCTION.....	6
I. CANCERS DE LA CAVITE BUCCALE ET DE L'OROPHARYNX.....	9
I.1. GENERALITES	10
I.2. DIAGNOSTIC.....	13
I.2.1. Circonstances de découverte.....	13
I.2.2. Examen clinique.....	13
I.2.3. Examens complémentaires	14
I.3. TRAITEMENT.....	15
I.3.1. Chirurgie	15
I.3.2. Radiothérapie	16
I.3.2.1. Généralités.....	16
I.3.2.2. Modalités techniques de la radiothérapie (18)	17
I.3.2.3. RTE exclusive	19
I.3.2.4. RTE adjuvante	20
I.3.2.5. Radiochimiothérapie concomitante exclusive.....	20
I.3.2.6. Radiochimiothérapie postopératoire	21
I.3.3. Chimiothérapie.....	21
I.4. PRONOSTIC	21
I.4.1. Survie.....	21
I.4.2. Facteurs pronostiques.....	21
I.4.2.1. Statut HPV	21
I.4.2.2. Facteurs pronostiques liés à la radiothérapie.....	22
II. EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS.....	23
II.1. EFFETS SECONDAIRES DE LA RADIOTHERAPIE	24
II.1.1. Effets précoces	25
II.1.1.1. Radiomucite aiguë	25
II.1.1.2. Radiodermite aiguë.....	27
II.1.2. Effets tardifs.....	27
II.1.2.1. Radiomucite chronique	28
II.1.2.2. Radiodermite chronique.....	29
II.1.2.3. Xérostomie radio-induite	29
II.1.2.4. Fibrose musculaire radio-induite	29
II.1.2.5. Ostéoradionécrose.....	30
II.1.2.6. Cancers radio-induits.....	32
II.2. EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS SAINS.....	32
II.2.1. Effets tissulaires	33
II.2.1.1. Fibrose radio-induite.....	33
II.2.1.1.1. Inflammation aspécifique.....	33
II.2.1.1.2. Fibrose constituée	35
II.2.1.1.3. Cascade de cytokines.....	36
II.2.1.1.4. Rôle des cellules souches.....	39
II.2.1.2. Lésions vasculaires radio-induites.....	39
II.2.1.3. Bases du traitement de la fibrose radio-induite	40
II.2.2. Effets moléculaires et cellulaires.....	42
II.3. EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR L'OS.....	44
II.3.1. Os normal (93,94).....	44
II.3.1.1. Constitution de l'os.....	44
II.3.1.2. Remodelage osseux.....	46
II.3.1.3. Cicatrisation osseuse.....	49
II.3.2. Os irradié.....	51
II.3.2.1. Aspects mécaniques.....	51
II.3.2.2. Aspects cellulaires	52
II.3.2.3. Effets vasculaires.....	55
II.3.2.4. Ostéoradionécrose.....	57
II.3.2.5. Effets sur la cicatrisation osseuse	62

III. SUBSTITUTION OSSEUSE	64
III.1. BIOMATERIAUX POUR LA RECONSTRUCTION OSSEUSE EN ORL	66
III.2. PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASÉ (BCP)	78
III.3. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE	79
III.3.1. <i>Les cellules souches</i>	79
III.3.2. <i>La moelle osseuse</i>	86
III.3.3. <i>Les facteurs de croissance</i>	87
IV. RECONSTRUCTION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE	88
IV.1. EVALUATION DE LA NEOFORMATION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE APRES IMPLANTATION DE CSM ASSOCIEES AU BCP	92
IV.2. EVALUATION DE LA NEOFORMATION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE APRES IMPLANTATION D'UNE ASSOCIATION DE CSM ET DE MOT AU BCP	101
IV.3. EVALUATION DE LA NEOFORMATION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE APRES IMPLANTATION D'UNE ASSOCIATION DE FRACTION VASCULAIRE STROMALE DU TISSU ADIPEUX AU BCP	119
V. DEVENIR DES CELLULES GREFFEES	150
V.1. IMMUNOTOLERANCE D'UNE ALLOGREFFE DE MOELLE OSSEUSE INDUITE PAR LA CICLOSPORINE A SANS INTERACTION AVEC LA REPARATION OSSEUSE	152
VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	176
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	179
VIII. COMMUNICATIONS ISSUES DE CES TRAVAUX.....	199

Liste des principales abréviations utilisées

ADN : acide désoxyribonucléique

BCP : biphasic calcium phosphate

BMP : bone morphogenetic protein

BMU : basal multicellular unit

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSMMO : cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse

CSMTA : cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux

CTGF : connective tissue growth factor

FGF : fibroblastic growth factor

FVS : fraction vasculaire stromale

GM-CSF : granulocyte macrophage – colony stimulating factor

HPV : human papilloma virus

IGF : insulin-like growth factor

IL : interleukine

IRM : imagerie par résonance magnétique

MOT : moelle osseuse totale

NCI-CTC : national cancer institute-common toxicity criteria

OMS : organisation mondiale de la santé

ORL : oto-rhino-laryngologie

ORN : ostéoradionécrose

PDGF : platelet-derived growth factor

RCMI : radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité

RTE : radiothérapie externe

RTOG : radiation therapy oncology group

TEP: tomographie par émission de positrons

TNF : tumor necrosis factor

TNM : tumor node metastasis

TGF : transforming growth factor

VADS : voies aéro-digestives supérieures

VEGF : vascular endothelial growth factor

Introduction

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) se situent au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France, et constituent la septième cause de décès chez l'homme (1). Le traitement de ces tumeurs peut se faire exclusivement par chirurgie ou radiothérapie, mais nécessite le plus souvent une association des différentes modalités thérapeutiques que sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les progrès réalisés dans les différents traitements ont permis d'accéder à un taux de survie à 5 ans de 50%, tous stades et localisations confondus (2). Cette augmentation de survie a mis au premier plan les complications engendrées par les traitements sur le long terme, et leurs conséquences sur la qualité de vie. La radiothérapie est une modalité importante et efficace pour le traitement des tumeurs malignes et a été un facteur déterminant dans la réduction des taux de mortalité par cancer. Cependant, un traitement plus efficace signifie que les survivants éprouvent de plus en plus les effets secondaires à long terme causés par le rayonnement sur les tissus normaux proches de la tumeur. Parmi les effets secondaires de la radiothérapie, l'un des plus redoutables est l'ostéoradionécrose qui concerne essentiellement l'os mandibulaire et qui est rencontré après le traitement des cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx. Cette complication pouvant survenir des années après la fin du traitement du cancer alors en rémission, affecte particulièrement la qualité de vie du patient (3). Au stade débutant, un traitement médical peut suffire à enrayer cette nécrose, mais l'évolution souvent irréversible nécessite à terme une ablation large de l'os atteint. Une situation chirurgicale similaire est rencontrée en cas de récurrence d'une tumeur atteignant la mandibule après irradiation thérapeutique. La question de la réparation de la mandibule est alors primordiale pour le bien-être du patient, afin de conserver les fonctions de phonation, déglutition, et aussi limiter les séquelles esthétiques. La technique chirurgicale aujourd'hui la plus répandue est la

transposition d'un lambeau microanastomosé de péroné (4). Cette technique lourde n'est pas dépourvue de séquelles, et le terrain irradié favorise la survenue de complications (5). De plus, le terrain altéré sur lequel survient l'ostéoradionécrose peut en lui-même être une source d'échec et constituer une contre-indication aux lambeaux libres.

La question d'une alternative à cette greffe osseuse autologue s'est donc naturellement posée chez certains patients, devant la difficulté de réalisation de la technique mais également devant la quantité limitée d'os disponible. Dans les disciplines chirurgicales orthopédique et dentaire, l'utilisation de matériaux de substitution osseuse de la classe des phosphates de calcium comme alternative aux greffes osseuses s'est développée depuis plusieurs décennies. Les biomatériaux phosphocalciques ont largement démontré leur intérêt en territoire non irradié, reposant sur des propriétés de biocompatibilité et d'ostéoconduction favorables à la repousse osseuse au sein de pertes de substance (6). L'utilisation de ces biomatériaux n'a toutefois pas été réalisée en territoire osseux irradié, en rapport avec l'aspect paucicellulaire et mal vascularisé de l'os (7). Des études précliniques chez le rat au sein du laboratoire INSERM U791 ont montré qu'il était nécessaire d'associer une greffe de moelle osseuse au biomatériau phosphocalcique pour lui conférer une capacité de régénération en territoire irradié (8,9). Cependant, les mécanismes de régénération osseuse en territoire irradié restent mal connus et peu étudiés, et le remplacement d'un os irradié reste un des principaux challenges de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Lors des trois premières études de ce travail, le modèle de séquelles d'irradiation osseuse chez le rat développé au sein du laboratoire INSERM U791 mimant les séquelles de l'irradiation thérapeutique chez l'homme a été utilisé. L'optimisation de la réparation

osseuse et la meilleure compréhension des différents mécanismes intervenant dans la cicatrisation osseuse ont été les objectifs principaux de ces trois études. Des associations de différents types cellulaires avec le biomatériau phosphocalcique ont été réalisées, qu'il s'agisse de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, d'une association de cellules souches mésenchymateuses et de moelle osseuse totale, ou de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux.

Une quatrième et dernière étude a eu pour but de mettre au point un modèle animal immunotolérant aux allogreffe de moelle osseuse, et de vérifier dans un premier temps l'inocuité du traitement immunosuppresseur par ciclosporine A sur la réparation osseuse. Le but à terme est de permettre le suivi de cellules implantées, afin d'améliorer les connaissances sur le devenir des cellules greffées et la réparation tissulaire osseuse en territoire irradié.

I. Cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx

I.1. Généralités

Les cancers des VADS se situaient en 2005 au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France (derrière les cancers de la prostate, du sein, du côlon-rectum, et du poumon) avec une incidence estimée de 16 000 nouveaux cas par an. Ils atteignent la cavité buccale, le pharynx (nasopharynx, oropharynx et hypopharynx) et le larynx. Les principaux facteurs de risques qui sont la consommation d'alcool et de tabac expliquent la prédominance de ces cancers chez l'homme (80%). Ils constituent respectivement la 7^{ème} et 18^{ème} cause de décès chez l'homme et la femme. Leur forme histologique est, dans plus de 90% des cas, le carcinome épidermoïde.

Les données sur le cancer des lèvres, de la cavité buccale et du pharynx permettent



Figure 1. Exemple d'image utilisée pour la lutte contre le tabac

d'estimer son incidence en 2011 à 10 700 nouveaux cas. Il survient dans 71% des cas chez l'homme, et se situe au 8^{ème} rang des cancers les plus fréquents (5^{ème} chez l'homme et 11^{ème} chez la femme). Les cancers de l'oropharynx représentent 15 à 20% des cancers des VADS (1).

L'évolution de l'incidence se fait vers la diminution du nombre de cas depuis 1985. Cette diminution touche fortement la population masculine, alors que l'incidence tend à augmenter progressivement chez la femme (figure 2). Contrairement aux autres localisations des VADS, les cancers de l'oropharynx sont en augmentation croissante en France (+2,1 à 3, 9% d'augmentation entre 1973 et 2001) (10).

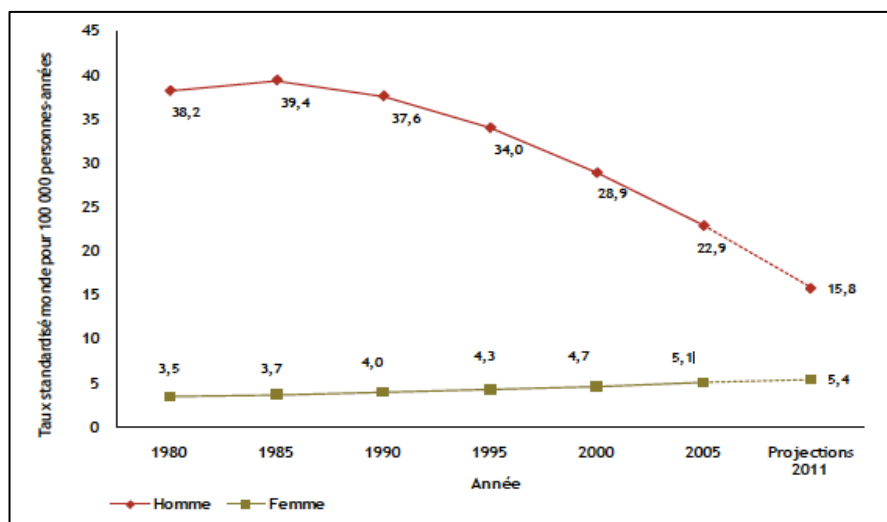


Figure 2. Evolution de l'incidence (taux standardisé monde estimé) des cancers des lèvres, de la cavité orale et du pharynx de 1980 à 2005 selon le sexe. Projections pour l'année 2011.

Sources: période 1980 à 1985 (11); période 1990 à 2011 [HCL/InVS/INCa/Francim/Inserm, 2011]. Traitement : INCa 2011

L'âge moyen au diagnostic est estimé à 63 ans chez l'homme comme chez la femme.

La répartition du cancer des lèvres, de la cavité buccale et du pharynx est très variable en fonction des régions en France (figure 3). Il existe un gradient Nord-Sud avec une incidence plus marquée dans les régions situées au nord de la Loire (incidence la plus élevée pour les régions Nord-Pas de Calais et Bretagne).

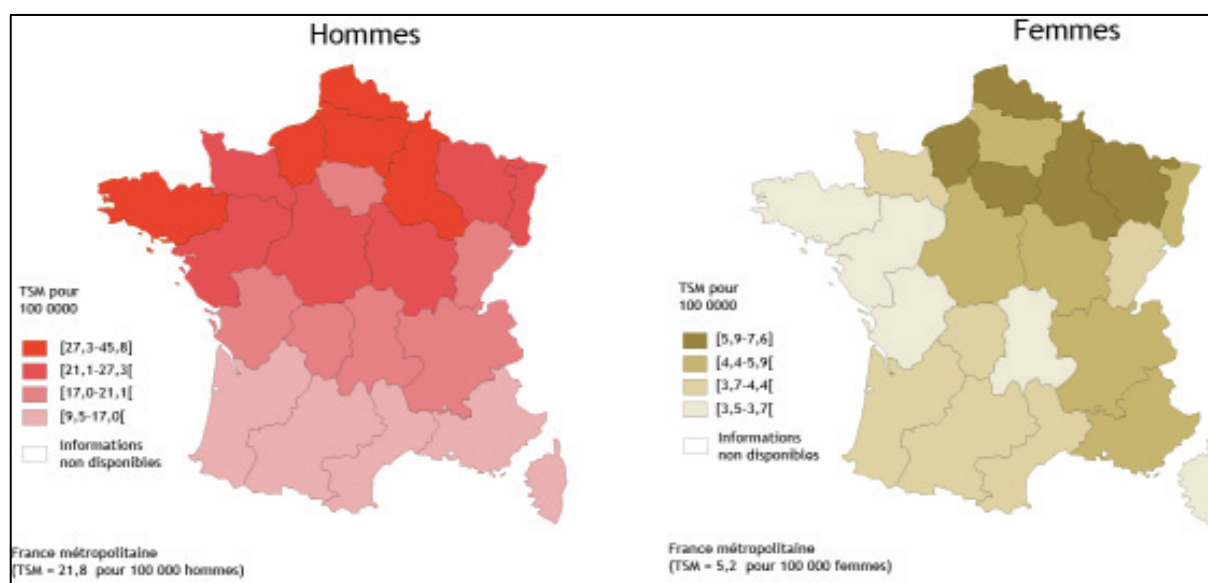


Figure 3. Taux standardisé à la population mondiale d'incidence des cancers des lèvres, de la cavité orale et du pharynx à l'échelle régionale en France métropolitaine en 2005. Source : situation du cancer en France en 2012, INCa.

Le nombre de décès par cancer des lèvres, de la cavité orale et du pharynx est estimé à 3270 cas pour 2011, dont 78 % chez l'homme. Ces cancers se situent au 11^{ème} rang des décès par cancer, et représentent 2,2 % de l'ensemble des décès par cancer.

L'évolution du taux de mortalité lié à ces cancers suit celle de l'incidence, avec une forte diminution de la mortalité chez l'homme entre 1984 et 2008, et un taux quasiment stable chez la femme sur la même période (figure 4).

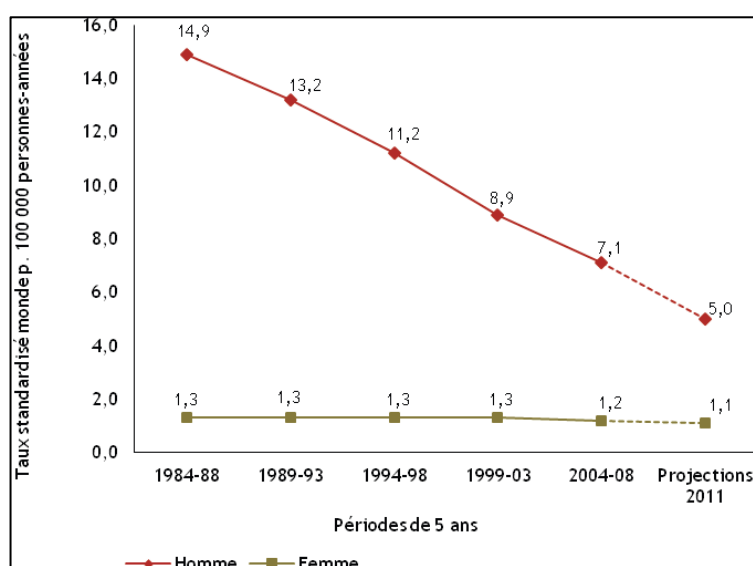


Figure 4. Evolution de la mortalité observée (taux standardisé monde) par cancer des lèvres, de la cavité orale et du pharynx de 1984-88 à 2004-08 selon le sexe. Projections pour l'année 2011. Source : situation du cancer en France en 2012, INCa.

L'âge médian au décès au cours de la période 2004-2008 est de 61 ans chez l'homme et 69 ans chez la femme.

Les évolutions favorables de l'incidence et de la mortalité des cancers des lèvres, de la cavité buccale et du pharynx semblent liées à la diminution de la consommation d'alcool plus que du tabac chez l'homme. En revanche, l'augmentation de la consommation du tabac chez la femme semble responsable de la faible augmentation de l'incidence.

L'infection par le papillomavirus (HPV) est un facteur de risque plus récemment identifié de survenue de ces cancers, ce qui explique en partie l'augmentation de l'incidence des cancers de l'oropharynx. Selon les séries, 30 à 50% des cancers de l'oropharynx seraient liés à une infection HPV (12).

I.2. Diagnostic

I.2.1.Circonstances de découverte

Les circonstances de découvertes des cancers de la cavité buccale ou de l'oropharynx sont variables en fonction du stade tumoral, de la localisation tumorale et des individus. De manière schématique, une tumeur de l'oropharynx peut simuler un tableau d'angine unilatérale trainante, associant douleurs pharyngées et dysphagie, voire odynophagie, et otalgie réflexe homolatérale. Au sein de la cavité buccale, les lésions muqueuses sensibles peuvent simuler un aphte trainant. Il n'est pas rare que le patient lui-même ressente une lésion dont la sensibilité est augmentée par la consommation d'alcool ou de produits acides ou épicés. Les tumeurs évoluées de la langue entraînent volontiers des troubles de l'élocution et de la déglutition, voire une dyspnée.

Une masse cervicale peut également être révélatrice d'une tumeur de la cavité buccale ou de l'oropharynx, en faveur d'une métastase ganglionnaire. Les adénopathies sont habituellement dures et indolores, mais peuvent évoluer vers des masses fixées et douloureuses.

I.2.2.Examen clinique

Il comprend un examen complet des VADS au fauteuil. L'examen à la lampe frontale et aux abaisse-langues permet de préciser l'étendue et les caractéristiques de la tumeur, son aspect bourgeonnant, végétant, ulcéré ou serpigneux, son saignement au contact. Une biopsie pour analyse histologique est également réalisée lors de cet examen. La palpation permet de préciser le caractère induré de la tumeur, son extension au sein des parties molles. L'ensemble du reste de la muqueuse de la cavité buccale, du pharynx et du larynx est observé à la recherche d'une deuxième lésion synchrone, à l'aide notamment du miroir laryngé et du nasofibroscope. Une limitation de l'ouverture

buccale doit être recherchée en faveur d'une infiltration des muscles masticateurs. L'examen des mouvements de la langue et du voile du palais est indispensable, ainsi que de la sensibilité de la muqueuse et de la houppe du menton (nerf mandibulaire, branche du nerf trijumeau). La palpation des aires ganglionnaires cervicales est ensuite réalisée lors de ce premier examen, ces tumeurs étant très lymphophiles (70% des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx présentent des métastases ganglionnaires au moment du diagnostic initial (13)). Un schéma initial des lésions est associé au dossier médical.

I.2.3.Examens complémentaires

Après découverte de la lésion, un examen plus approfondi sous anesthésie générale lors d'une panendoscopie permet de préciser les extensions de la tumeur, de rechercher une tumeur synchrone et de réaliser éventuellement de nouvelles biopsies. Lors de cet examen, une lésion synchrone œsophagienne doit être recherchée par endoscopie digestive ; des photos, voire une vidéo de la tumeur doivent être réalisées (14–16). Un schéma est réalisé en fin d'endoscopie. Ce temps opératoire permet également de préciser les possibilités d'extirpation chirurgicale de la tumeur, ainsi que d'exposition en vue d'une exérèse par voie endoscopique éventuellement robot-assistée.

Un scanner cervico-thoracique sans et avec injection de produit de contraste en coupes millimétriques permet de préciser l'extension locale, régionale et à distance de la tumeur. Il est complété par une IRM sans et avec injection de gadolinium pour notamment mieux apprécier les extensions musculaires et parapharyngées de la tumeur, ainsi qu'une éventuelle atteinte de la médullaire osseuse en cas de lésion venant au contact de la mandibule ou du maxillaire sur le scanner. Les examens radiologiques sont réalisés idéalement avant la panendoscopie pour apprécier au mieux les extensions tumorales avant biopsie. Le TEP scanner n'est indiqué que pour les tumeurs à haut

risque métastatique (adénopathies classées N2b, N2c, N3 ou adénopathies des secteurs IV et V) et en cas de lésion suspecte sur le scanner thoracique.

Les examens complémentaires permettent d'obtenir la classification TNM de la tumeur basée sur la taille de la tumeur et de l'envahissement ganglionnaire à visée essentiellement pronostique (tableau 1), permettant de discuter les différentes options thérapeutiques en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Tumeur (T)	Adénopathies (N)	Métastases (M)
	N0 : pas de signe d'atteinte ganglionnaire	M0 : absence de métastases
T1 : tumeur inférieure ou égale à 2 cm de grand diamètre	N1 : 1 adénopathie métastatique unique homolatérale < ou = à 3cm	M1 : présence de métastases
T2 : tumeur > à 2cm et < ou = à 4cm	N2 : a : adénopathie unique homolatérale entre 3 et 6cm b : adénopathies multiples homolatérales inférieures ou égales à 6cm c : adénopathies bilatérales ou controlatérales inférieures ou égales à 6cm	
T3 : tumeur > à 4cm	N3 : adénopathie(s) métastatique(s) > à 6cm	
T4 : tumeur envahissant les structures adjacentes		

Tableau 1. TNM des cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx

I.3. Traitement

Les modalités thérapeutiques utilisées pour traiter les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale et de l'oropharynx sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (et les thérapies ciblées), seules ou en association.

I.3.1. Chirurgie

La chirurgie n'est proposée que si elle peut permettre une exérèse complète de la tumeur, avec des séquelles fonctionnelles acceptables. Lorsque la tumeur est au contact de la mandibule ou lorsqu'elle l'envahit, l'exérèse de la mandibule est nécessaire. Il peut s'agir d'une mandibulectomie non interruptrice lorsque la tumeur est au collet des dents, ou d'une mandibulectomie interruptrice en cas d'envahissement osseux. En cas de

mandibulectomie interruptrice s'étendant vers l'avant, la technique de reconstruction de choix est le lambeau osseux de fibula microanastomosé.

Une chirurgie ganglionnaire est le plus souvent associée, homolatérale à la lésion ou bilatérale si elle est mal latéralisée.

I.3.2. Radiothérapie

I.3.2.1. Généralités

La radiothérapie correspond à l'utilisation thérapeutique des radiations ionisantes. L'unité de dose des radiations absorbées est le Gray (Gy), qui correspond à l'énergie absorbée par une quantité de matière donnée ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Il faut différencier l'énergie émise par une source radioactive, exprimée en Sievert (Sv) de l'énergie absorbée par le tissu. Les propriétés de pénétration tissulaire dépendent de la nature et de l'énergie de la radiation. L'énergie libérée, pour un volume tissulaire défini, décroît proportionnellement avec la profondeur de pénétration du rayonnement dans les tissus. Il existe deux types de radiations ionisantes : d'une part, les rayonnements électromagnétiques (rayons X et rayons γ) qui sont assimilés à un faisceau de photons, et d'autre part, les rayonnements particulaires, constitués de particules chargées (électrons, protons) ou de particules neutres. Les rayonnements non chargés (photons et neutrons) sont indirectement ionisants, alors que les particules chargées (électrons et protons) sont directement ionisantes. Les électrons ionisés sont responsables des effets biologiques observés. Lors de la radiothérapie, l'ADN cellulaire va être directement lésé par la particule incidente, et indirectement par les radicaux libres obtenus par la radiolyse de l'eau cellulaire (17)(Figure 5).

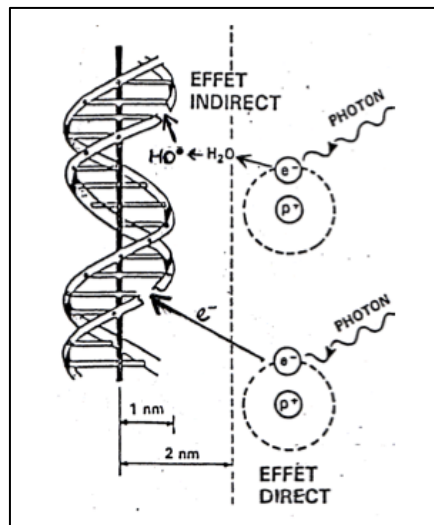


Figure 5. Effets direct et indirect des rayonnements ionisants sur l'ADN

En pratique, les radiations ionisantes utilisées pour le traitement des cancers des VADS sont des photons issues d'accélérateurs linéaires de particules.

La dose délivrée totale est de 50 à 70 Gy en 25 à 35 fractions de 2 Gy, à raison de 5 séances par semaines, pour un traitement d'une durée totale de 5 à 7 semaines. Le fractionnement de la dose correspond au nombre de séances effectuées. Le but du fractionnement est de limiter les effets secondaires tout en assurant les meilleurs résultats carcinologiques.

1.3.2.2. Modalités techniques de la radiothérapie (18)

Avant les années 1990, la radiothérapie bidimensionnelle (2D) reposait sur le placement des faisceaux se basant sur des limites osseuses. A partir du milieu des années 1990, la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle (3D) est apparue avec l'utilisation du scanner de repérage et des collimateurs multilames, et de la possibilité d'un calcul de la distribution de dose à un volume donné. Les plans de traitement ont donc pu être adaptés aux données cliniques du patient, aux volumes tumoraux macroscopiques et à risque d'extension microscopiques, et aux organes à risque. L'apparition de la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) à la fin des années

1990, a permis de maintenir des niveaux de dose élevés dans les cibles tumorales, tout en diminuant la dose au niveau des organes à risque, favorisant ainsi le contrôle tumoral tout en conservant le mieux possible la qualité de vie, diminuant essentiellement les effets sur les glandes salivaires (19).

L'apparition récente de la radiothérapie stéréotaxique permet un traitement focalisé. Sa principale indication repose sur les récidives tumorales traitées par réirradiation, mais elle est actuellement en cours d'évaluation (20).

Pour réaliser une irradiation thérapeutique de l'oropharynx en pratique, la qualité du système de contention est primordiale. La contention permet que la dose délivrée lors de chaque séance soit toujours ciblée sur la tumeur. Le masque thermoformable permet d'immobiliser la tête, le cou et les épaules. Un scanner de simulation (ou de centrage) permet de sélectionner les volumes à irradier. Le contourage de l'ensemble des volumes à irradier et des organes à risque est indispensable en RCMI.

En cas de radiothérapie conventionnelle (2D) les faisceaux couvrent l'ensemble du site tumoral primitif ainsi que les aires ganglionnaires envahies ou susceptibles de l'être (Figure 6).

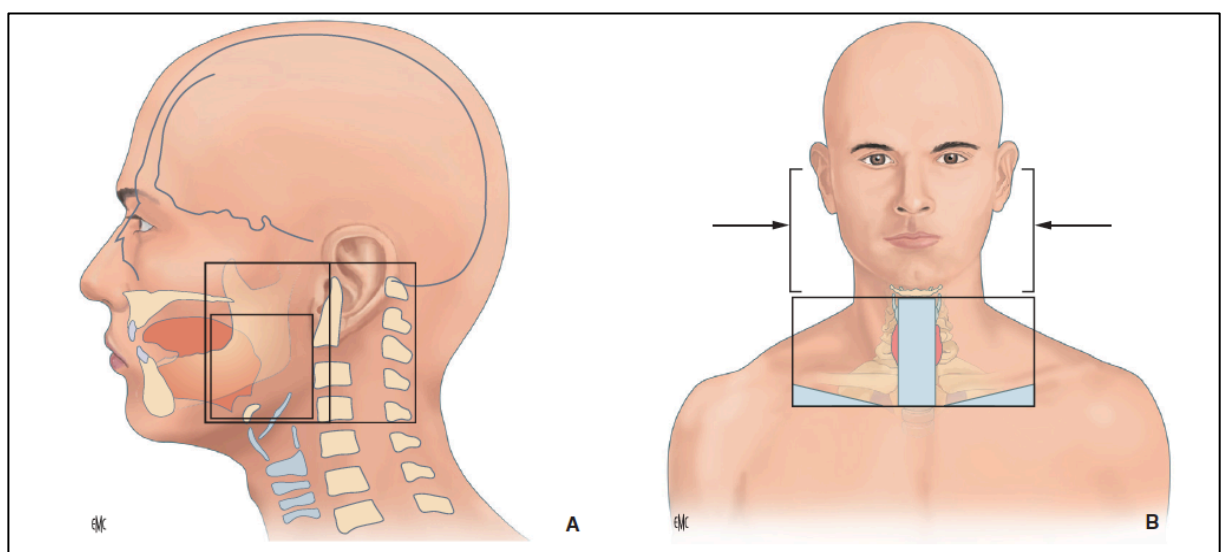


Figure 6. Mise en place de faisceaux de traitement en technique 2D (cancer de la base de langue). A. Site tumoral. B. Aires ganglionnaires (d'après l'EMC, Bensadoun)

En cas d'utilisation de la RCMI, le gross target volume (ou volume tumoral macroscopique et ganglionnaire), les clinical target volume (ou volumes à risque d'extension microscopique) et les organes à risque doivent être déterminés et contourés (figure 7).

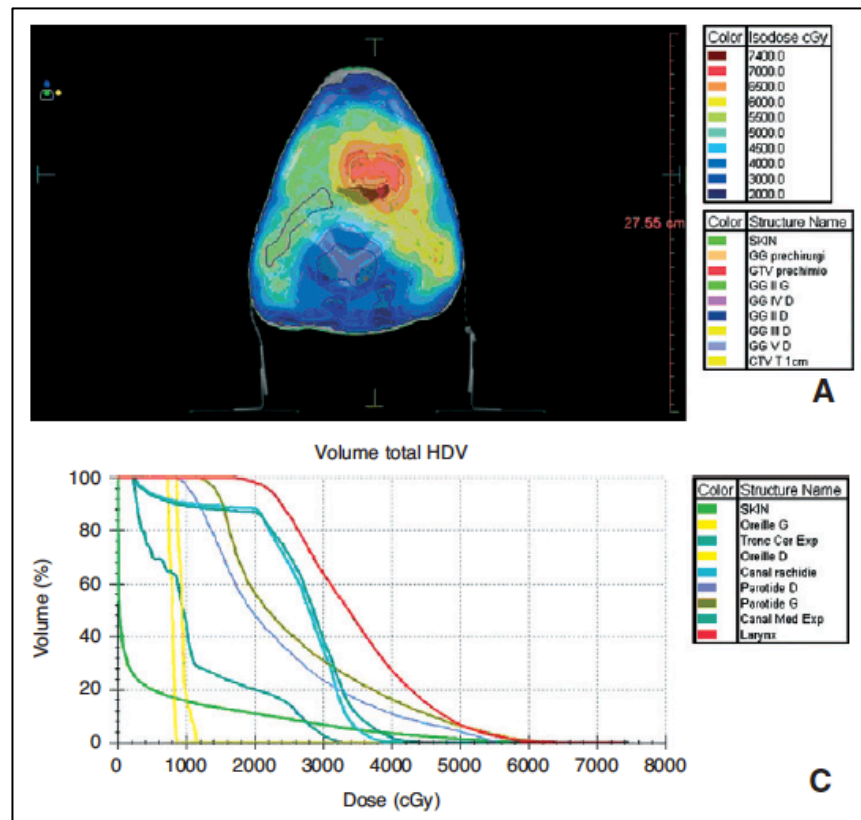


Figure 7. A. Exemple d'une dosimétrie en RCMI pour traitement postopératoire d'une tumeur oropharyngée. B. HDV : histogramme dose-volume (d'après l'EMC, Bensadoun)

1.3.2.3. RTE exclusive

Pour les stades localisés (tumeurs de stade I et II), la radiothérapie seule peut constituer une alternative à la chirurgie. Cependant, pour les cancers de la cavité buccale, les séquelles de la radiothérapie sont telles que le traitement chirurgical est privilégié. Pour l'oropharynx, la radiothérapie peut être indiquée en première intention, notamment dans les cancers limités à la loge amygdalienne.

Pour les tumeurs de stade localement évolué (stades III et IV), la radiothérapie est souvent associée à la chirurgie ou à la chimiothérapie. Pour les patients à l'état général

altéré, pour lesquels la chirurgie et la chimiothérapie ne sont pas indiquées, la radiothérapie seule peut être proposée, avec toutefois une diminution du contrôle local.

1.3.2.4. RTE adjuvante

Devant les difficultés rencontrées lors de la chirurgie en territoire irradié (21), et devant le meilleur contrôle local (22), la radiothérapie est préférée après chirurgie, qu'avant. Différentes études ont par ailleurs montré l'intérêt de la radiothérapie en post-opératoire en termes de contrôle locorégional et de survie globale (23). L'indication de cette radiothérapie adjuvante va dépendre des résultats anatomopathologique de pièces opératoires : en cas de marges positives ou incertaines (<5 mm), d'atteinte ganglionnaire avec effraction capsulaire, en cas de ganglions atteints supérieurs ou égaux à 2, en cas d'atteinte des structures de voisinage, en cas d'embolies tumorales lymphatiques ou d'envahissement périnerveux. En cas de ganglion unique envahi, la place de la radiothérapie est plus controversée.

1.3.2.5. Radiochimiothérapie concomitante exclusive

L'association d'une radiothérapie à une chimiothérapie constitue aujourd'hui la référence dans le traitement des cancers localement évolués des VADS (24). Cette association est proposée pour les tumeurs de la cavité buccale et de l'oropharynx en cas de contre-indication à la chirurgie, soit pour des critères résécabilité tumorale, soit pour des critères fonctionnels.

Pour les patients ne pouvant bénéficier d'une radio-chimiothérapie concomitante, l'association d'une thérapie ciblée par un inhibiteur des récepteurs du facteur de croissance épithélial (cétuximab) à la radiothérapie permet d'augmenter le contrôle régional et la survie globale (25).

I.3.2.6. Radiochimiothérapie postopératoire

En cas de facteurs de risque de récurrence, une chimiothérapie à base de cisplatine est associée à la radiothérapie.

I.3.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie adjuvante seule ne trouve pas d'indication dans le traitement du cancer de la cavité buccale et de l'oropharynx.

La chimiothérapie d'induction tend à s'étendre mais reste encore en évaluation dans des essais thérapeutiques (26).

Pour les patients métastatiques ou pour les patients en récurrence non opérables, une chimiothérapie palliative est proposée. L'essai EXTREME associe cisplatine, 5-fluorouracile et cétuximab (27).

I.4. Pronostic

I.4.1. Survie

Les cancers de la cavité buccale et du pharynx sont de pronostic réservé. La survie relative à 1 et 5 ans des patients diagnostiqués entre 1989 et 1997 d'un cancer de la cavité orale et du pharynx était respectivement de 71 % et 34 %. La survie était meilleure chez les femmes que chez les hommes, avec 48 % versus 32 % pour la survie relative à 5 ans. Le pronostic varie en fonction de la sous-localisation anatomique, le taux de survie à 5 ans étant de 20% pour les cancers de la base de langue (2).

I.4.2. Facteurs pronostiques

I.4.2.1. Statut HPV

De nouveaux facteurs pronostiques de type biomarqueurs sont de plus en plus souvent utilisés, face à la mauvaise corrélation entre la taille de la tumeur et son évolution à

distance. Ainsi, le statut HPV des patients atteints de cancer de l'oropharynx permet de mieux préciser le pronostic de ces cancers. En effet, il a été montré que les tumeurs liées à l'HPV possédaient un meilleur pronostic que les tumeurs non liées à l'HPV (28). Elle sont en effet plus radiosensibles et présenteraient une meilleure réponse à la chirurgie et la chimiothérapie. Le meilleur pronostic de ces formes pourrait entraîner une déflation thérapeutique dans les années à venir.

1.4.2.2. Facteurs pronostiques liés à la radiothérapie

Les protocoles de radiothérapie consistent en une irradiation fractionnée, régulière. Ce fractionnement est le fruit d'un meilleur rapport entre les effets des rayons souhaités sur la tumeur et des effets secondaires non souhaités sur les tissus sains avoisinant la tumeur. Ainsi, il a été montré que la suspension des séances de radiothérapie lors d'un schéma classique, le plus souvent en rapport avec les effets secondaires de la radiothérapie, diminuait le contrôle local d'environ 10% lors d'une pause d'une semaine ; autrement dit, le fait de rallonger la durée totale du traitement d'un jour diminuerait le contrôle local d'1,4% (29,30).

II. Effets des radiations ionisantes sur les tissus

II.1. Effets secondaires de la radiothérapie

Lors d'une irradiation thérapeutique des tumeurs de la cavité buccale et de l'oropharynx, diverses structures sont incluses dans le volume irradié : la peau, les muqueuses, l'os mandibulaire ou maxillaire, les glandes salivaires, les muscles, les structures vasculaires et nerveuses... Le traitement curateur de ces tumeurs est agressif et occasionne des effets précoces et tardifs sur les tissus sains, parfois sévères. Les effets aigus sont observés en cours de traitement ou quelques semaines après, et disparaissent habituellement sans laisser de séquelles. Les effets tardifs apparaissent quant à eux des semaines, des mois, voire des années après l'exposition aux rayons, et peuvent être transitoires ou irréversibles. Une limite arbitraire entre les effets aigus et tardifs a été fixée à 90 jours, sachant qu'il existe un continuum entre les deux (31). C'est d'ailleurs la tolérance de ces tissus aux radiations ionisantes qui va dicter la dose maximale délivrable pour un tissu donné. Peu d'études prospectives se sont attachées à déterminer la dose maximale tolérée pour un organe. En effet, de telles études sont difficiles à réaliser car la dose est surtout limitée par les effets tardifs plus que par les effets précoces (32). En conséquence, les doses acceptées comme tolérables ont été décrites de manière empirique et sont basées sur des données rétrospectives et sur la pratique, qui ont conduit à rédiger des abaques (33). Les effets toxiques de la radiothérapie commencent dès l'exposition aux rayons mais les signes cliniques et histologiques ne sont apparents qu'après un intervalle libre d'une durée variable. Les événements clinico-pathologiques après irradiation peuvent être aggravés par des agents extérieurs, comme la chirurgie ou la chimiothérapie (Figure 8) (31).

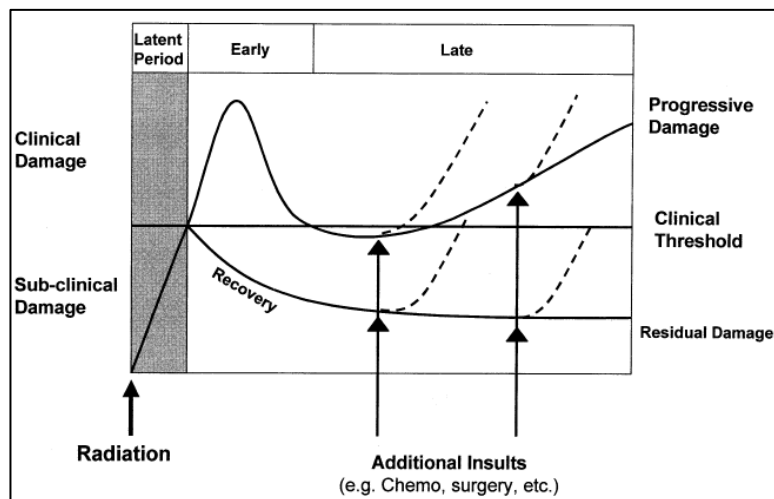


Figure 8. Effets clinico-pathologiques de l'irradiation (d'après Williams 2003)

L'émergence des schémas d'intensification thérapeutique avec utilisation de traitements combinés notamment radio-chimiothérapiques, dont les effets secondaires précoces et tardifs sont plus importants, ont favorisé le développement des soins oncologiques de support afin d'en limiter les symptômes.

II.1.1. Effets précoces

II.1.1.1. Radiomucite aiguë

La radiomucite aiguë est un effet secondaire systématique de la radiothérapie des cancers des VADS. Elle est due à l'élimination des cellules de la couche basale de l'épithélium sous l'effet des rayons, ce qui entraîne une diminution de la capacité de régénération cellulaire de la muqueuse. Une toxicité directe survient en 5 à 7 jours, la cicatrisation se faisant en 2 à 3 semaines après la fin de l'irradiation, ce qui correspond au temps de régénération de l'épithélium (34). Les sites les plus affectés sont ceux recouverts d'une muqueuse non kératinisée (lèvres, muqueuse buccale, palais mou, plancher buccal, face ventrale de la langue). Lorsque l'irradiation est délivrée à un rythme de 5 fractions de 2 Gy par semaine, l'évolution clinique se fait habituellement en

4 stades (35) :

- apparition d'une rougeur asymptomatique puis d'un érythème avec desquamation douloureuse au contact ;
- plaques pseudo-membraneuses non confluentes de taille inférieure ou égale à 1,5 cm ;
- plaques confluentes pseudo-membraneuses de taille supérieure à 1,5 cm ;
- nécrose ou ulcération profonde.

Une toxicité indirecte potentialisant les lésions directes est liée à la surinfection de ces lésions (36).

L'association concomitante d'une chimiothérapie à la radiothérapie potentialise les effets aigus sur la muqueuse, notamment lors de l'utilisation de 5-fluorouracile, ce qui rend l'association difficile à tolérer par le patient (37).

De nombreuses échelles existent pour évaluer la mucite aiguë. Deux échelles sont plus couramment employées en pratique : celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et celle du National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 3

	OMS	NCI-CTC version 3	
		Symptômes fonctionnels	Symptômes cliniques
Grade 0	Pas de mucite	Pas de mucite	Pas de mucite
Grade 1	Érythème, sensation désagréable (douleur)	Alimentation solide possible	Muqueuse érythémateuse
Grade 2	Érythème, ulcères, alimentation solide possible	Alimentation liquide nécessaire	Ulcérations irrégulières ou pseudomembranes
Grade 3	Ulcères, alimentation uniquement liquide possible	Alimentation impossible	Ulcérations confluentes ou pseudomembranes
Grade 4	Alimentation per os impossible, alimentation entérale (par sonde) ou parentérale obligatoire	Symptômes associés à un risque vital	Nécrose tissulaire

OMS : Organisation mondiale de la santé ; NCI-CTC : National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria.

Tableau 2. Classification des mucites selon l'OMS et le NCI-CTC

également validée par le Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (tableau 2).

Les modalités d'irradiation plus récentes par hyperfractionnement ou accélération permettent un meilleur contrôle local avec une toxicité à long terme identique, mais elles augmentent la sévérité des mucites aiguës radio-induites. La RCMi semble réduire le risque de mucite aiguë de grade 3 (35).

En association à la toxicité des radiations ionisantes sur la muqueuse, on note la présence d'une altération du goût en rapport avec une atteinte des papilles gustatives. Les effets de la mucite peuvent être lourds de conséquence pour le patient. Elle peut tout d'abord nécessiter une pause dans le traitement, avec un risque de diminuer le contrôle loco-régional du cancer (38). Des troubles alimentaires sont également à redouter, avec nécessité de mise en place d'une alimentation entérale (39).

II.1.1.2. Radiodermite aiguë

La radiodermite aiguë se manifeste à partir de la 3^{ème} semaine d'irradiation par la survenue d'une dépilation. Un érythème et un œdème apparaissent dès la 4^{ème} semaine puis une desquamation sèche puis exsudative à la 5^{ème} semaine. La réépithélialisation débute 7 à 10 jours après la fin de l'irradiation. Comme pour la radiomucite, des échelles sont disponibles pour grader ces lésions (échelles OMS et NCI-CTC version 3). L'association concomitante de chimiothérapie ou de thérapeutiques ciblées comme le cétuximab peut aggraver la radiodermite, et entraîner, comme pour la radiomucite, la nécessité de suspendre le traitement.

II.1.2. Effets tardifs

Les effets tardifs de la radiothérapie sont les plus limitant vis à vis de l'utilisation de la radiothérapie. Ils surviennent des mois voire des années après l'irradiation (32). Sur le plan clinique, de nombreuses classifications permettent de rapporter les effets tardifs de la radiothérapie. La classification proposée en 1984 par l'European Organization of

Research and Treatment of Cancer (EORTC) et le RTOG a été utilisée dans de nombreux essais (tableau 3). Le système Subjective Objective Management Analytic - Late Effects of Normal Tissues (SOMA-LENT) a été proposé en 1995 pour améliorer et standardiser l'enregistrement des données (40).

<i>Peau</i>	
0	Aucun
1	Atrophie légère, pigmentation, chute partielle des poils
2	Atrophie en plaques, télangiectasies modérées, chute complète des poils
3	Atrophie marquée, télangiectasies marquées
4	Ulcération
5	Décès secondaire aux effets tardifs des radiations
<i>Tissu sous-cutané</i>	
0	Aucun
1	Induration légère (fibrose) et disparition de la graisse sous-cutanée
2	Fibrose modérée et asymptomatique, légère rétraction des champs (< 10 % en longueur)
3	Fibrose sévère, rétraction franche des champs (> 10 % en longueur)
4	Nécrose
5	Décès secondaire aux effets tardifs des radiations
<i>Muqueuse</i>	
0	Aucun
1	Atrophie et sécheresse légères
2	Atrophie modérée et télangiectasies discrètes
3	Atrophie marquée avec sécheresse complète, télangiectasies sévères
4	Ulcérations
5	Décès secondaire aux effets tardifs des radiations
<i>Glandes salivaires</i>	
0	Aucun
1	Sécheresse buccale légère, bonne réponse à la stimulation
2	Sécheresse buccale modérée, mauvaise réponse à la stimulation
3	Sécheresse buccale complète, pas de réponse à la stimulation
4	Fibrose
5	Décès secondaire aux effets tardifs des radiations

Tableau 3. Classification de l'EORTC/RTOG des effets tardifs de la radiothérapie

II.1.2.1. Radiomucite chronique

Au niveau muqueux, la croissance et le renouvellement de l'épithélium sont rapides alors que ceux du tissu conjonctifs sont lents, rendant ces structures assez résistantes à l'irradiation. Les effets tardifs sont rarement rencontrés en dessous de 50 Gy, une ulcération muqueuse ne survenant que rarement avant 65 Gy. La radiomucite tardive est rare et associe une décoloration, un amincissement et une diminution de la souplesse de la muqueuse à une induration des tissus sous-muqueux. Elle peut se compliquer d'une ulcération, voire d'une nécrose. Ces effets progressifs et irréversibles peuvent s'installer

entre 6 mois et 5 ans après la fin de la radiothérapie (41).

II.1.2.2. Radiodermite chronique

La radiodermite chronique se traduit par une peau atrophique, dépigmentée, sèche, dépilée et parsemée de télangiectasies. Elle est observée pour des doses dépassant les 60 Gy. Tout traumatisme risque de provoquer une ulcération atone de cicatrisation difficile (41).

II.1.2.3. Xérostomie radio-induite

En cas d'irradiation des glandes salivaires, le flux salivaire diminue pendant la durée de la radiothérapie et peut devenir à peine détectable après 6 à 8 semaines (42). La salive change de composition et devient plus épaisse. Cette xérostomie peut perdurer plusieurs mois ou années après la fin de la radiothérapie. Elle est responsable de troubles de la déglutition, et de la phonation, et de lésions dentaires. La récupération de la fonction salivaire varie en fonction du volume glandulaire irradié, de la dose totale et des individus. Au-delà de 30 Gy, la xérostomie est le plus souvent irréversible. L'association à une chimiothérapie par cisplatine a tendance à augmenter les effets des rayons sur les glandes salivaires.

II.1.2.4. Fibrose musculaire radio-induite

Les effets secondaires tardifs de la radiothérapie peuvent également s'observer sur les muscles, à type de fibrose. L'atteinte des muscles masticateurs est responsable d'un trismus dont la sévérité est proportionnelle à la dose reçue. L'atteinte des muscles constricteurs du pharynx entraîne des troubles du temps pharyngé de la déglutition. La limitation de la dose reçue sur les structures pharyngées par la RCMi pourrait limiter le taux de dysphagie tardif (43).

II.1.2.5. Ostéoradionécrose

L'ostéoradionécrose (ORN) correspond à une nécrose osseuse radio-induite, en dehors d'un site de rechute tumorale. Elle se manifeste initialement par un érythème de la muqueuse de recouvrement, puis une ulcération par nécrose muqueuse qui met l'os nécrosé à nu. Les branches horizontales sont plus souvent atteintes que les angles, la symphyse ou les branches montantes, en raison de leur vascularisation principalement centro-médullaire. Les signes cliniques sont variables, mais une douleur est classiquement présente, habituellement modérée, et peut devenir intense en cas de fracture de l'os nécrosé. Toutefois, une ORN précoce peut être asymptomatique. Les autres symptômes rencontrés sont des dysesthésies, une halitose, une dysgueusie (44). Les cas les plus sévères peuvent se présenter avec une fistulisation muqueuse ou cutanée, une dévitalisation de l'os et une fracture pathologique. L'aspect radiologique à l'orthopantomogramme est celui d'une lyse osseuse avec épaissement périosté, et dans les formes plus évoluées, présence d'un séquestre osseux, d'une fracture ou de signes d'ostéomyélite (figure 9). Les signes radiologiques n'apparaissent qu'à partir de 30 à 50% de déminéralisation (45). L'examen radiologique est complété par un scanner cervico-facial.



Figure 9. Orthopantomogramme mettant en évidence un aspect d'ostéoradionécrose mandibulaire avec séquestre osseux (flèche).

L'évolution spontanée se fait vers la chronicité avec extension de la nécrose des tissus mous et de l'os, de manière inéluctable et non réversible. Les facteurs qui semblent influencer la survenue d'une ostéoradionécrose sont la présence de dents en mauvais état dans le champ d'irradiation et une dose totale absorbée par la mandibule supérieure à 65 Gy.

Le traitement est long et difficile. Les thérapeutiques sont variées, allant du traitement médical symptomatique au traitement chirurgical, en passant par l'oxygénothérapie hyperbare, et dépendent du stade évolutif et de l'extension de la nécrose. Le traitement médical symptomatique repose sur des soins locaux, un traitement général « désinfiltrant », l'arrêt de l'imprégnation alcoolo-tabagique, la prescription d'antalgiques et une alimentation liquide. Les soins locaux comportent des bains de bouche et d'éventuels débridements locaux itératifs. Le traitement général « désinfiltrant » associe antibiotiques et corticoïdes pour une durée variable. Un traitement médical novateur, encore en cours d'évaluation, a montré des résultats encourageants. Il s'agit d'une association médicamenteuse ayant pour but de lutter contre la résorption osseuse et la fibrose, et s'appuie sur la théorie de la fibrose radio-induite. Il consiste à associer le tocophérol (ou vitamine E) à la pentoxifylline et au biphosphonate clodronate. Ce traitement semble actif sur l'ensemble des tissus irradiés, et particulièrement sur l'ORN, mais un essai randomisé est nécessaire afin de confirmer les résultats observés (46). L'oxygénothérapie hyperbare a été utilisée dans l'ORN symptomatique résistante à un traitement médical habituel. Le nombre de séances varie de 30 à 45. La revue Cochrane de 2005 a montré une efficacité de l'oxygénothérapie hyperbare sur l'ORN, avec notamment une augmentation significative de la couverture muqueuse et du rétablissement de la continuité osseuse (47). Cependant cette méta-analyse ne repose que sur 3 études, dont une avait été arrêtée précocement pour cause

de mauvais résultats sous oxygénothérapie hyperbare dans le traitement de l'ORN (48). De plus, pour les cas avancés d'ORN présentant une fracture, une fistule, ou nécessitant une résection mandibulaire segmentaire, l'oxygénothérapie hyperbare est clairement insuffisante (44). Le traitement chirurgical est donc proposé en cas d'échec du traitement médical et/ou de l'oxygénothérapie hyperbare. Le principe chirurgical est l'ablation de l'os nécrosé, réalisant une mandibulectomie marginale au minimum, ou segmentaire au maximum. En cas de mandibulectomie segmentaire, un rétablissement de la continuité mandibulaire est préconisé, idéalement par la mise en place d'un lambeau vascularisé microanastomosé de péroné (4).

La prévention de la survenue de l'ostéoradionécrose passe par un bilan dentaire avec remise en état dentaire si nécessaire avant irradiation (extraction de dents présentant des caries importantes, des lésions péri-apicales, des parodontites avancées, de vestiges radiculaires, de dents incluses) puis par une application fluorée quotidienne à vie. Durant la radiothérapie et les 6 mois suivants, les avulsions dentaires sont vivement déconseillées (49).

II.1.2.6. Cancers radio-induits

Le risqué de second cancer après radiothérapie est connu depuis longtemps, notamment à la suite du traitement des lymphomes ou des cancers de l'enfant (50). Des cas de cancers survenant dans le champ d'irradiation ont été décrits après traitement de cancers des VADS, mais il s'agissait essentiellement de cas isolés (51).

II.2. Effets des radiations ionisantes sur les tissus sains

Le principal élément limitant la dose de rayonnements ionisants lors d'un traitement par radiothérapie est la tolérance des organes sains. L'observation clinique plaide en faveur de variations individuelles de la radiosensibilité des tumeurs et des tissus sains (52). Cependant, des travaux portant sur des fibroblastes de patients irradiés pour un

cancer des VADS n'ont pas retrouvé de prédisposition individuelle à la radiosensibilité (53). Toutefois, près de 5% des patients irradiés voient se développer des effets aigus et tardifs particulièrement importants. Il existe donc des facteurs intrinsèques de radiosensibilité individuelle responsables de ces différences (54). La réparation défectueuse de l'ADN a été incriminée dans la genèse de la radiotoxicité aiguë, chez des patients porteurs d'une mutation (syndrome d'ataxie-telangiectasie, anémie de Fanconi, syndrome de Nijmegen...) (55). Cependant, l'implication de ces mécanismes dans les processus de lésions radio-induites tardives reste à démontrer.

II.2.1. Effets tissulaires

A l'échelle tissulaire, les radiations ionisantes sont responsables d'une inflammation, d'une fibrose, d'altérations vasculaires et d'une déplétion cellulaire (31,32,52,56). L'hypoxie semble jouer un rôle clé dans la constitution des lésions radio-induites (57).

II.2.1.1. Fibrose radio-induite

Les lésions tissulaires radio-induites évoluent en plusieurs phases, débutant par une réaction inflammatoire aboutissant à une fibrose. La fibrose radio-induite a été par le passé considérée comme un processus irréversible menant à des tissus cicatriciels inertes. Elle semble cependant plutôt correspondre à « une cicatrice qui ne guérit jamais, dans laquelle les signaux d'activation sont émis de manière constante » (52). La fibrose radio-induite est aujourd'hui considérée comme un processus dynamique, comprenant à la fois des mécanismes réversibles et irréversibles (58).

II.2.1.1.1. Inflammation aspécifique

La phase initiale de la réaction tissulaire aux radiations ionisantes est caractérisée par une inflammation aspécifique où la cellule endothéliale joue un rôle majeur. La toxicité radio-induite du compartiment endothélial entraîne une modification phénotypique des

cellules endothéliales, avec apparition de molécules d'adhésion à leur surface pour les cellules circulantes, favorisant notamment la diapédèse des leucocytes vers la matrice extra-cellulaire (32). L'inflammation est caractérisée par une perméabilité vasculaire accrue qui associe extravasation de protéines sériques et de cellules inflammatoires, entraînant la formation d'un œdème.

La libération de facteur von Willebrand par les cellules endothéliales irradiées induit un recrutement plaquettaire et favorise la formation d'un thrombus plaquettaire (59). L'apoptose de cellules endothéliales et leur desquamation endoluminale est un facteur supplémentaire conduisant à la thrombose vasculaire observée en territoire irradié,

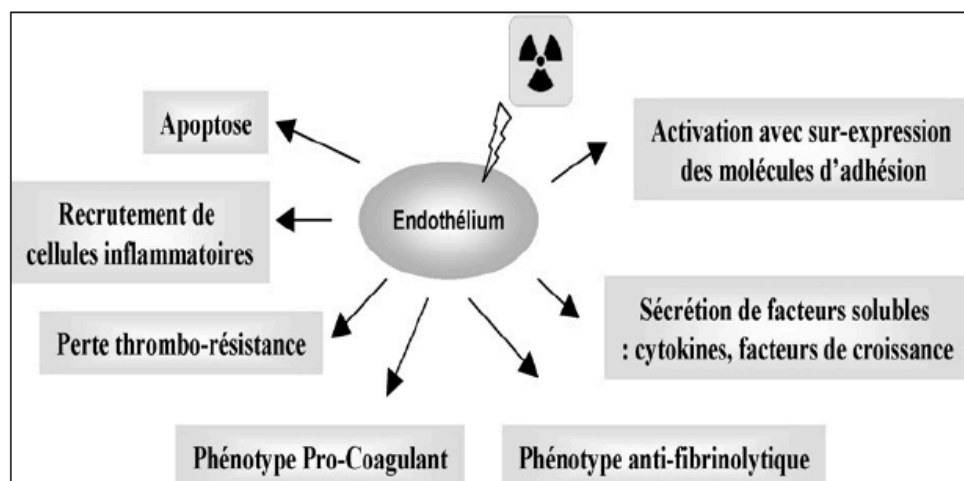


Figure 10. Effets des radiations ionisantes sur l'endothélium vasculaire (Milliat et al, 2008).

conduisant à une ischémie locale (60) (figure 10 (61)).

La perte de la barrière endothéliale a pour conséquence directe l'exposition des cellules conjonctives à des stimuli auxquelles elles ne sont habituellement pas soumises (52). Ainsi, l'extravasation de l'albumine et du fibrinogène est responsable d'un dépôt de fibrine au sein de la matrice extra-cellulaire, conduisant à la genèse de la fibrose (60). Les fragments de dégradation du collagène et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires attirent localement les cellules conjonctives, épithéliales et sanguines. La réaction inflammatoire chronique radio-induite est associée à une activation du système

immunitaire, en particulier les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Le profil CD4⁺/Th2, caractérisé par une sécrétion de différentes cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β 1) est profibrosant. Il conduit la cicatrisation, via une accumulation de collagène, vers un processus pathologique (62).

II.2.1.1.2. Fibrose constituée

La phase suivante de la réaction tissulaire voit apparaître une fibrose constituée. La fibrose se caractérise par une accumulation excessive de collagène et d'autres composants de la matrice extra-cellulaire résultant d'une dérégulation de la balance synthèse/dégradation de la matrice extra-cellulaire (63). Celle-ci est composée de protéines (collagène, élastine), de glycoprotéines et protéoglycanes (fibronectine, laminine, tenascine) et de glycoasaminoglycanes (héparine, chondroïtine sulfates). Sur le plan cellulaire, le tissu fibreux est constitué de cellules de la réaction inflammatoire et de fibroblastes. Sous l'action de cytokines pro-fibrotiques comme le TGF- β 1, mais aussi en présence de protéines de la matrice extra-cellulaire (64), les fibroblastes se différencient en myofibroblastes, prolifèrent et secrètent les différents composants de la matrice extracellulaire (collagène de type I et III, fibronectine) (65). L'activation des fibroblastes en myofibroblastes est une étape clé dans la formation et le maintien de la fibrose radio-induite, et la régulation des facteurs pro-fibrotiques médiant cette étape représente une cible thérapeutique potentiellement importante (58). Des plages de fibrose active sont alors observées, caractérisées par un feutrage interstitiel inorganisé de matrice extracellulaire, une densité élevée de myofibroblastes et de néovaisseaux, alternant avec des plages de fibrose paucicellulaire et peu vascularisée (52). La densification du tissu fibreux s'établit par remodelages successifs de la matrice extracellulaire déposée. Le renouvellement du collagène est sous la dépendance de cellules et de cytokines contrôlant la synthèse de collagénases.

Au total, le tissu fibreux constitué est peu vascularisé et pauvre en fibroblastes qui ont la particularité d'être en permanence activés. Lors d'une cicatrisation normale, les processus d'inflammation cessent dès que le comblement est assuré, avec une disparition des myofibroblastes et des cellules de l'inflammation et un retour à un état quiescent pour les fibroblastes. Dans un tissu fibreux, les lésions deviennent chroniques,

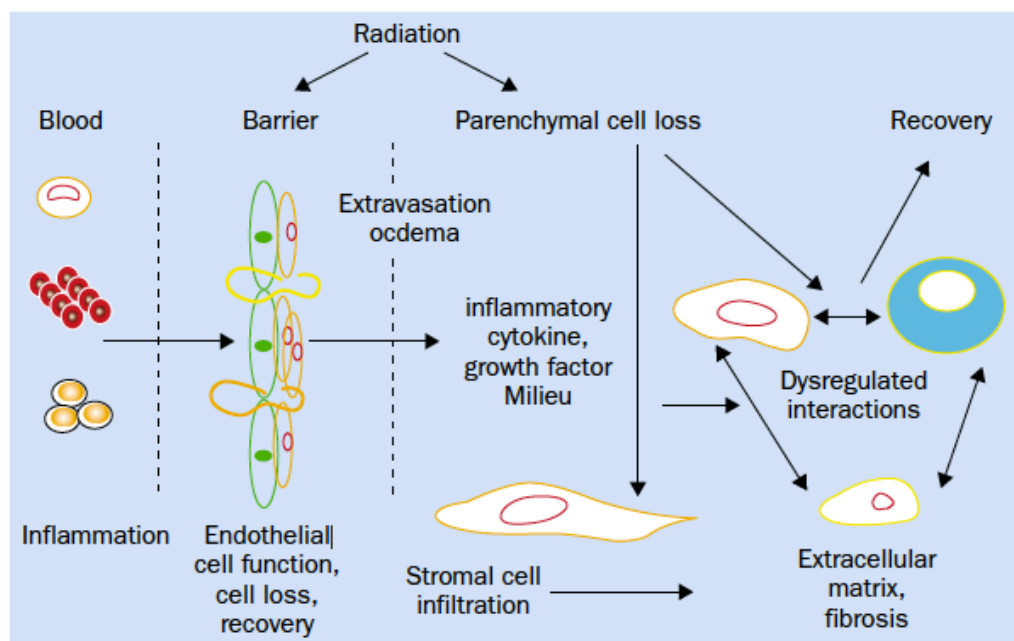


Figure 11. Effet tissulaire des radiation ionisantes et interactions cellulaires (Stone 2003)

comme si l'agresseur cellulaire restait toujours présent, ainsi que les cellules de l'inflammation et les fibroblastes en permanence activés. L'origine de ces activations chroniques reste débattue ; la production continue de radicaux libres et de $TG\beta-1$ a été incriminée (63).

II.2.1.1.3. Cascade de cytokines

Les cytokines sont un groupe de diverses protéines qui régulent les interactions entre les différents types cellulaires. L'expression et l'activité de nombreux facteurs de croissance et de cytokines, comme le $TNF-\alpha$, le PDGF, le β -FGF, le GM-CSF, les IL-1, IL-2 et IL-8 proinflammatoires, l'IL-6 profibrotique, le CTGF, et le TGF- β sont modifiées dans

les processus fibrotiques (66–68). Dans les heures qui suivent l'irradiation, l'activation d'une cascade de cytokines est considérée comme initiatrice de la réponse fibrotique.

Le TGF- β , cytokine multifonctionnelle, est le médiateur le plus largement étudié dans le cadre de la fibrose radio-induite. Il existe 3 isoformes distinctes de cette protéine, les TGF- β 1, 2 et 3. Le TGF- β 1 est le plus impliqué dans les phénomènes de cicatrisation et de développement de fibrose. Il est sécrété dans une forme latente et doit être activé pour se lier à son récepteur. Il possède trois grandes fonctions biologiques majeures. C'est un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire et il peut induire l'apoptose d'un grand nombre de types cellulaires, ce qui l'a fait classer comme anti-oncogène. Sa seconde fonction est liée à son action sur le système immunitaire et sur l'inflammation. Le TGF- β 1 est capable d'inhiber l'hématopoïèse ainsi que la prolifération des lymphocytes T et B différenciés. Son rôle sur l'inflammation est plus complexe, car il peut avoir une action pro ou anti-inflammatoire. Ainsi, dans la cicatrisation, il va initier les processus d'inflammation, en particulier le chimiotactisme, puis, dans une phase ultérieure, il exercera une action anti-inflammatoire sur les cellules activées. Sa troisième fonction est le contrôle de l'homéostasie de la matrice extracellulaire. Il joue un rôle important dans l'activation des fibroblastes, et possède une action pro-fibrotique par l'induction de collagènes et d'autres cytokines induites dans le processus fibrotique. Il diminue également la dégradation de la matrice extracellulaire (58). L'ensemble des fonctions du TGF- β 1 a permis de poser l'hypothèse de son rôle dans le développement des maladies fibro-prolifératives (66). Il a été montré que l'injection de TGF- β 1 in vivo chez l'animal produisait une fibrose localisée (69).

Dans les heures qui suivent une irradiation, une augmentation de la synthèse du TGF- β 1 par activation de la transcription du gène et l'induction de son activation dans la matrice extracellulaire par clivage de son complexe latent via les radicaux libres sont observées

(70). Le TGF- β 1 est surexprimé de façon constante dans les tissus irradiés, dès les premières heures après l'irradiation et se poursuit pendant la phase inflammatoire ainsi que dans la phase de cicatrisation et de fibrose établie. La transcription du gène est activée et la sécrétion de la protéine est augmentée dans de nombreux types cellulaires, comme les cellules inflammatoires, les myofibroblastes, les cellules endothéliales.

De nombreuses études animales se sont intéressées à bloquer le TGF- β 1 afin d'inhiber son action pro-fibrotique. Par exemple, un anticorps anti-TGF- β 1 a été utilisé de manière prophylactique juste après une irradiation pulmonaire chez le rat, et a montré une efficacité dans la fibrose radio-induite à 6 semaines et 6 mois après l'irradiation (71). On peut cependant apporter certaines limites à ces modèles animaux, notamment le fait que les schémas d'irradiation ne sont pas représentatifs de la clinique humaine, et que les réactions sont donc exagérées. De même, la prise en charge des effets secondaires de la radiothérapie chez l'homme se pose surtout à un stade de fibrose établie, alors que les traitements proposés dans ces études ont été testés de manière précoce. Aucune étude chez l'homme n'a cherché à bloquer le TGF- β 1 dans le cadre de la fibrose radio-induite. En effet, le rôle immunologique du TGF- β 1 joué dans l'apoptose des cellules tumorales risque également d'être bloqué. La première étude utilisant un anticorps dirigé contre le TGF- β 1 chez l'homme a été réalisée chez des patients souffrant de sclérodermie, avec un résultat négatif (72).

Le CTGF, à l'instar du TGF- β 1, est une des cytokines impliquées dans les processus fibrotiques qui a été les plus étudiées. Elle favorise la prolifération des fibroblastes et la production de matrice extracellulaire. C'est un médiateur d'aval du TGF- β 1 et les deux molécules agissent en co-facteurs dans la fibrogenèse (73). Il semble que le CTGF soit surtout impliqué dans le processus fibrotique chronique, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle.

II.2.1.1.4. Rôle des cellules souches

La réponse des cellules souches issues de la moelle osseuse à une irradiation localisée a été étudiée. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et hématopoïétiques semblent être impliquées dans la réparation tissulaire, particulièrement dans la réponse précoce (74). Les cellules souches issues de la moelle osseuse recrutées au sein des tissus lésés semblent agir de manière paracrine afin de stimuler les cellules souches locales (75).

Cependant, les cellules souches issues de la moelle osseuse jouent également un rôle dans le développement des fibroses radio-induites ; elles produisent après recrutement des médiateurs pro-fibrotiques, tel le TGF- β 1 (76). Une étude menée dans le poumon a montré que les précurseurs myofibroblastiques provenaient de la moelle osseuse (77). Bloquer ces CSM pourrait également être une cible du traitement de la fibrose radio-induite. Toutefois, les CSM peuvent également réduire l'inflammation et l'accumulation de collagène au sein du tissu, ce qui laisse entrevoir le fait que différentes populations de CSM co-existent et modulent la fibrogenèse, ou que les effets pro ou anti-fibrotiques de ces cellules sont probablement déterminés par leurs capacités à changer leur potentiel de différenciation ou leur phénotype (78).

II.2.1.2. Lésions vasculaires radio-induites

Les lésions vasculaires radio-induites sont présentes dans l'ensemble des tissus irradiés, mais ne sont pas spécifiques sur plan histologique (79). Elles correspondent à de l'athérosclérose et à des lésions ischémiques secondaires à l'occlusion radio-induite des vasa vasorum (60,80). Elles touchent préférentiellement les capillaires, puis les artères de petit à moyen calibre et les veines ; les artères de gros calibres semblent les moins sensibles aux radiations ionisantes. (79,81). L'irradiation des cellules musculaires lisses contenues dans les parois vasculaires entraîne une diminution des capacités contractiles

des vaisseaux, ainsi qu'un épaissement des parois vasculaires, amenant à terme à une altération de la perfusion des organes et à une hypoxie tissulaire (59,81). Une forte corrélation a été établie entre l'épaississement de la paroi vasculaire et le score d'atteinte radio-induite globale du tissu (61).

II.2.1.3. Bases du traitement de la fibrose radio-induite

Les principales études cliniques tentant de réduire la fibrose radio-induite sont basées sur le potentiel de réversibilité de ces lésions par l'action de différentes molécules. Sur l'hypothèse d'un rôle majeur joué par l'inflammation, les anti-inflammatoires stéroïdiens ou non-stéroïdiens ont été testés. Il n'existe pas d'évidence clinique de leur bénéfice sur la fibrose radio-induite (82). Cependant, le rôle de l'inflammation dans le maintien de cette fibrose reste incertain. Par ailleurs, le rôle potentiel joué par le stress oxydatif comme facteur favorisant la fibrose reste lui-aussi débattu. Un traitement antioxydant afin de capter les espèces réactives de l'oxygène et protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation de leurs lipides a été utilisé de manière empirique. Un essai de phase II a mis en évidence une diminution significative des territoires de fibrose cutanée après traitement par superoxyde dismutase Cu/Zn bovine (83). Cependant, ce traitement a été interrompu en raison du risque de transmission de maladie à prion, comme l'encéphalopathie spongiforme bovine. Différentes études cliniques ont montré une amélioration de la fibrose par un traitement antioxydant associant la pentoxyfilline et la vitamine E après radiothérapie pour cancer des VADS ou du sein (46,82,84,85). La pentoxyfilline, qui est un dérivé du méthylxanthine, est connue pour ses propriétés anticoagulantes, vasodilatatrices et anti-inflammatoires associées à une dégradation des composants de la matrice extra-cellulaire. Elle pourrait ainsi avoir un impact sur la structure vasculaire. Son action sur la fibrose radio-induite semble plus importante lorsqu'elle est associée à la vitamine E, qui est connue pour son action anti-oxydante

(84). Les bases radiobiologiques de cette association thérapeutique n'ont pas encore été élucidées. Toutefois, alors que les études montrant l'efficacité de l'association pentoxyfilline-vitamine E étaient essentiellement des études de phase II, les études randomisées en double-aveugle étaient négatives (86).

L'utilisation de l'oxygénothérapie hyperbare a été testée pour les lésions radio-induites tardives, notamment l'ORN. Son action supposée est l'augmentation de l'oxygénation tissulaire en stimulant la repousse vasculaire. La revue Cochrane publiée en 2005 dans ce domaine n'a recensée que 10 études randomisées remplissant les critères d'inclusion de la méthode Cochrane sur un total de plus de 100 études publiées (47). Elle a montré une efficacité de l'oxygénothérapie hyperbare dans le traitement de la fibrose radio-induite de l'os et des tissus mous cervico-faciaux, de la rectite radique, ainsi qu'une efficacité dans la prévention de l'ORN après extraction dentaire en territoire irradié, supportant le rôle de l'hypoxie dans ces lésions. Cependant, aucun effet de l'oxygénothérapie hyperbare n'a été montré dans les tissus nerveux.

Les mécanismes moléculaires de la fibrose radio-induite ont été étudiés et ont été la cible d'études précliniques pour permettre de réduire la fibrose radio-induite (87,88). Une étude de phase II actuellement en cours utilise la pravastatine afin de bloquer la voie du CTCG dans le traitement de la fibrose cutanée et sous-cutanée radio-induite établie, chez des patients traités pour un cancer des VADS (Bourgier C, Curative Efficacy of Pravastatine in Patients Presented Delayed Cutaneous and Subcutaneous Radio-induced Fibrosis (PRAVACUR) [clinicaltrials.gov NCT01268202](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01268202)).

Au total, les études publiées dans le traitement des fibroses radio-induites restent difficiles à interpréter, essentiellement par le petit nombre d'essais randomisés en double-aveugle. De plus, l'évaluation du bénéfice clinique des traitements reste difficilement comparable entre les études devant la difficulté de définir des critères

objectifs de mesure de la fibrose. Il apparait donc aujourd'hui qu'aucun traitement spécifique de la fibrose radio-induite ne soit particulièrement recommandé.

II.2.2. Effets moléculaires et cellulaires

L'irradiation des tissus biologiques entraîne une succession d'événements physiques puis chimiques qui se répercutent à l'échelon moléculaire puis cellulaire avant de se traduire par des modifications histologiques et des signes cliniques.

L'absorption des radiations ionisantes par les cellules entraîne d'une part une perturbation des structures atomiques, entraînant des transformations biologiques et chimiques. D'autre part, la radiolyse de l'eau génère des espèces chimiques réactives, les radicaux libres, qui vont endommager les acides nucléiques, les protéines et les lipides (89). Les liaisons moléculaires de l'ADN peuvent alors être rompues directement par le rayonnement ou indirectement par l'action des radicaux libres (Figure 12). Ainsi, les effets directs et indirects de l'irradiation initient une série d'événements biochimiques

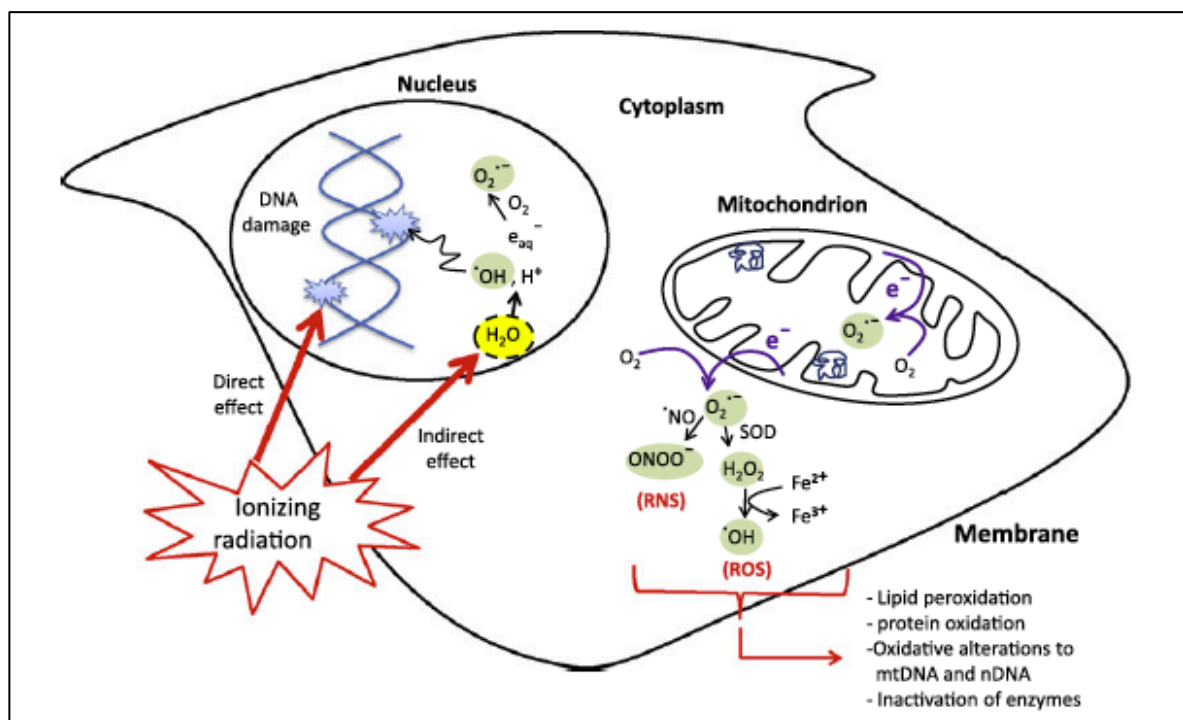


Figure 12. Effets des radiations ionisantes aux niveaux cellulaire et moléculaire (Azzam 2012)

et de signalisation moléculaire, qui vont soit réparer les dommages, soit aboutir à des changements physiologiques permanents, soit entraîner la mort cellulaire (90) (figure 13). Les changements oxydatifs continuent à se produire plusieurs jours à plusieurs mois après l'exposition probablement à cause de la production continue des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote. Il est intéressant de noter que ces processus surviennent non seulement dans les cellules irradiées, mais aussi dans leur descendance. De plus, le stress oxydatif radio-induit semble se transmettre des cellules irradiées vers les cellules avoisinantes par des mécanismes de communication intercellulaire. Les descendants de ces cellules voisines développent également des perturbations dans leur métabolisme oxydatif et présentent de nombreux dommages oxydatifs dont des mutations génétiques. La persistance de ces effets chez les descendants a des implications dans le développement des cancers radio-induits. Les dommages oxydatifs sur des gènes clés de l'ADN (gènes suppresseurs de tumeur) sont responsables de l'induction de ces tumeurs. Le rôle du stress oxydatif chronique semble également prépondérant dans la progression de maladies dégénératives et des lésions tissulaires radio-induites tardives (91).

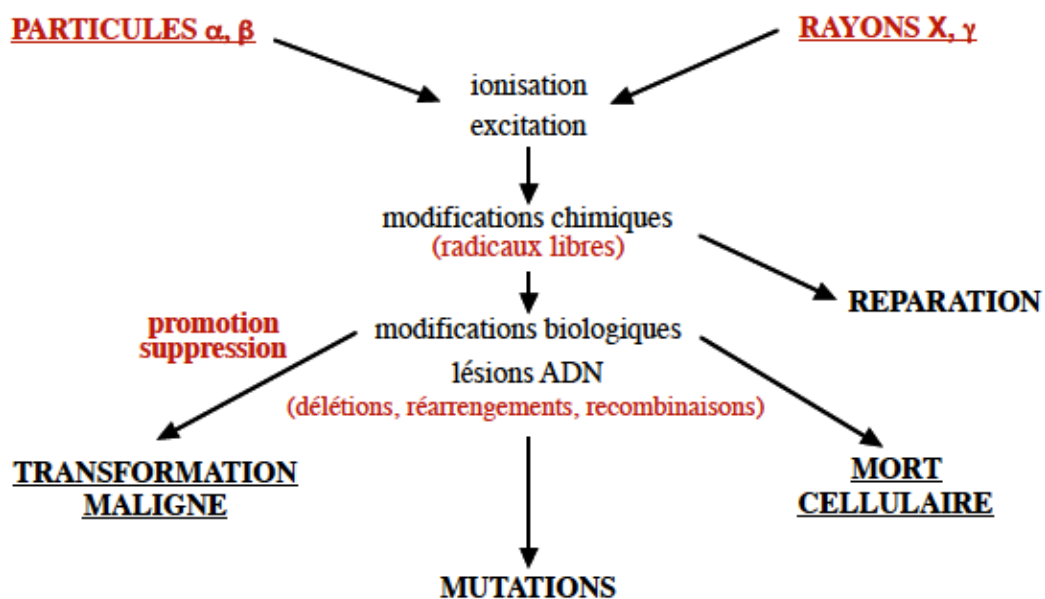


Figure 13. Physiopathologie de la cytotoxicité des radiations ionisantes (d'après Little)

II.3. Effets des radiations ionisantes sur l'os

De nombreuses études ont été menées sur les effets de la radiothérapie sur certains types de tissus sains, essentiellement le poumon, le rein ou la peau. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur le tissu osseux. Le tissu osseux étant un tissu à renouvellement peu rapide, les complications radio-induites ayant alors tendance à survenir plus tardivement. Sa densité entraîne une absorption de radiations ionisantes jusqu'à 6 fois plus importante que celle des tissus mous avoisinants (92).

II.3.1. Os normal (93,94)

II.3.1.1. Constitution de l'os

Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué d'une substance organique minéralisée qui possède plusieurs fonctions, dont les principales sont la fonction mécanique de soutien, le rôle dans l'homéostasie minérale, et le rôle hématopoïétique par la présence de la moelle osseuse.

Le tissu osseux est composé d'une trame organique sur laquelle se fixe la phase minérale. La trame organique ou protéique est composée à 90% de fibres de collagène de type I entourées d'une substance fondamentale interfibrillaire, composée de protéines non collagéniques osseuses (ostéonectine, sialoprotéines, ostéocalcine, phosphoprotéines, protéoglycanes), de protéines plasmatiques (albumine, immunoglobulines), de cytokines, et de facteurs de croissance (TGF- β , IGF). La phase minérale est composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme d'hydroxyapatite (rapport Ca/P = 1,66) qui confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique. Cette phase contient environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et 40 à 60% du sodium et du magnésium.

Sur le plan architectural, l'os mature est composé à 80% d'os compact que l'on retrouve au niveau des corticales, et à 20% d'os trabéculaire ou spongieux. L'os compact est formé d'ostéons dans lesquels les travées osseuses sont disposées de façon concentrique autour d'un canal de Havers où circulent les vaisseaux. L'os trabéculaire est constitué d'un réseau tridimensionnel de travées osseuses entre lesquelles se trouve la moelle osseuse (figure 14). L'unité de base de l'os trabéculaire est un héli-ostéon en forme de croissant de lune ouvert sur la moelle.

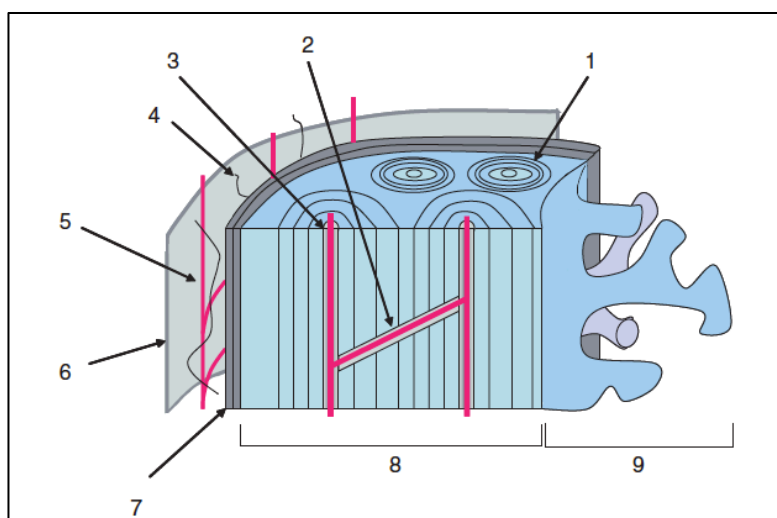


Figure 14. Structure du tissu osseux. 1. Ostéon; 2. canal de Wolkman; 3. canal de Havers; 4. innervation périostée; 5. vascularistaion périostée; 6. périoste; 7. os sous-périosté; 8. os cortical; 9. os trabéculaire (selon Thomas)

Quatre types de cellules assurent les différentes phases du remodelage osseux, issues de deux lignées : la lignée ostéoclastique et la lignée ostéoblastique. Ces deux lignées trouvent leur origine dans la moelle osseuse qui produit deux grands groupes de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques qui vont donner les cellules sanguines dont la lignée monocyte-macrophage, à l'origine des ostéoclastes, et les cellules souches mésenchymateuses à l'origine de nombreuses lignées, et notamment la lignée ostéoformatrice. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées dont le rôle principal est la résorption du tissu osseux. Les ostéoblastes sont les cellules qui sécrètent les constituants de la matrice organique. Après avoir formé de l'os, les ostéoblastes peuvent

se transformer en ostéocytes ou en cellules bordantes. Les ostéocytes sont emmurés dans le tissu osseux, ou sein d'une lacune périostéocytaire. Ils possèdent des prolongements cytoplasmiques leur permettant de communiquer avec les autres ostéocytes et les cellules bordantes. Ils interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels. Les cellules bordantes recouvrent les surfaces osseuses. Leur fonction principale serait de favoriser les échanges entre la surface de l'os, l'environnement cellulaire et les ostéocytes.

II.3.1.2. Remodelage osseux

Le tissu osseux est une structure dynamique, siège d'un remodelage permanent. Ce phénomène permet de préserver les propriétés mécaniques du tissu osseux, d'assurer l'homéostasie minérale, et de réparer les dommages osseux. La séquence du remodelage s'effectue selon une chronologie bien précise en un site donné, résultant de l'activité d'unités cellulaires, appelées BMU (*basal multicellular unit*). L'activité de remodelage débute par une phase d'activation où les cellules bordantes, en se rétractant, découvrent la matrice osseuse et attirent les pré-ostéoclastes. Lors de la phase de résorption, les pré-ostéoclastes fusionnent pour former les ostéoclastes. Une fois attaché à la matrice osseuse, l'ostéoclaste crée un microenvironnement acide permettant la dissolution de la phase minérale, précédant la dégradation de la phase organique grâce à son équipement enzymatique. La résorption osseuse conduit à la création d'une lacune de Howship. La phase d'inversion correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules macrophagiques, responsables de la préparation du comblement de la lacune. Enfin survient la phase de formation, où les ostéoblastes recrutés combleront la lacune en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui est ensuite minéralisé. Cette phase de remodelage dure en moyenne 4 à 6 mois chez l'homme adulte. Survient

ensuite une phase quiescente pendant laquelle la minéralisation est parachevée (Figure 15).

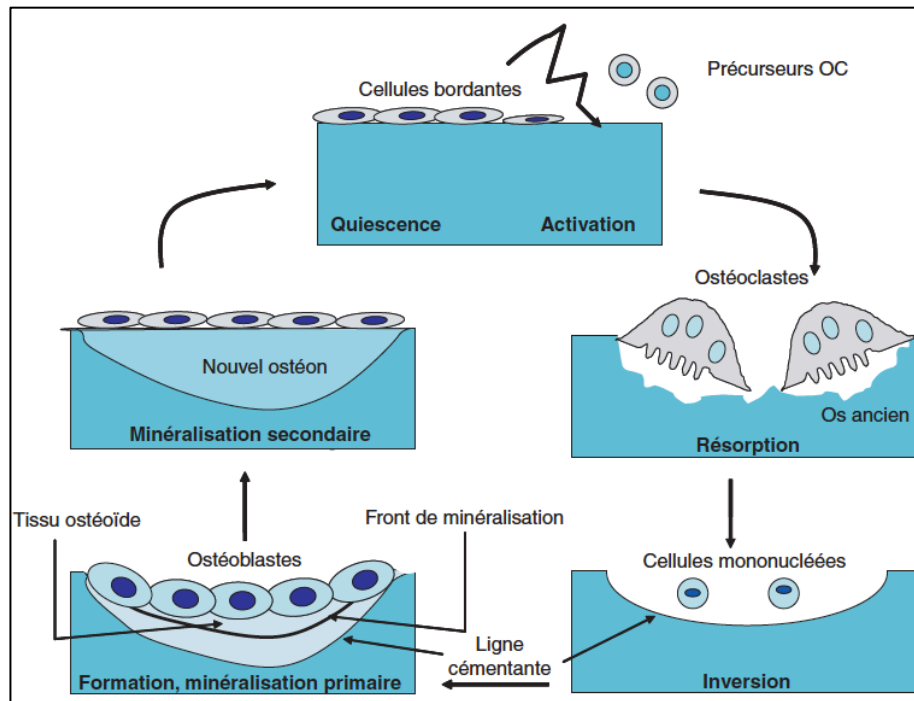


Figure 15. Différentes phases du remodelage osseux (selon Thomas)

Le contrôle du remodelage osseux se fait à différents niveaux. Il existe tout d'abord une communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes, les ostéoblastes étant nécessaires à la différenciation des pré-ostéoclastes, notamment grâce au système RANKL/OPG. De nombreux facteurs de croissance et cytokines jouent également un rôle sur le contrôle du remodelage osseux. Parmi ceux-là, les TGF- β sont un des facteurs de croissance les plus abondamment stockés dans la matrice osseuse. Le TGF- β 1 recrute différents types cellulaires, notamment les précurseurs ostéoblastiques aux sites de réparation et d'inflammation (95) et possède des effets inhibiteurs sur la résorption osseuse. Les BMP (*bone morphogenetic protein*) sont des facteurs de croissances faisant partie de la superfamille des TGF- β . Les BMP 2, 4 et 7 induisent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers les voies ostéochondrocytaires et

ostéoblastiques (96). Les rôles joués par les différents facteurs systémiques et locaux sur le remodelage osseux sont présentés dans le tableau 2 (94).

		Résorption		Formation	
		Recrute- ment des ostéoclastes	Activité cellulaire	Recrute- ment des ostéoblastes	Activité cellulaire
Hormones	Parathormone	↑	↑	↑	↓
	1,25(OH) ₂ D ₃	↑	↑	-	↓
	Calcitonine	↓	↓	-	-
	Glucocorticoïdes	-	-	↓	↓
	Hormones thyroïdiennes	↑	↑	-	-
	Insuline	-	-	↑	↑
	Hormone de croissance	-	-	↑	↑
	Œstrogènes	-	↓	↑	↑
Facteurs de croissance	EGF	↑	↑	↑	↓
	PDGF	↑	↑	↑	↓
	FGF	-	-	↑	-
	TGFβ	↓	↑	↑	↑
	IGF1	-	-	↑	↑
Cytokines	IL1	↑	↑	↑	↓
	-PGE2	-	↑↓	↑↓	↑↓
	-TNF-α	↑	↑	↑	↓
	-IFN-γ	↓	↓	↓	↓
	-IL-6	↑	-	-	-

↑ : augmente ; ↓ : diminue ; - : sans effet ; ↑↓ : effets multiples selon les doses et les systèmes de culture.

Tableau 2. Effets des différents facteurs systémiques et locaux sur le tissu osseux (selon Thomas)

II.3.1.3. Cicatrisation osseuse

La cicatrisation osseuse normale permet d'aboutir à la reconstitution complète du tissu lésé. Cette cicatrisation passe par quatre stades (figure 16). En cas de fracture osseuse, un hématome local est rapidement suivi d'une réaction inflammatoire locale. Ensuite se forme le cal mou, où le tissu qui unit les 2 fragments osseux n'est pas minéralisé. Progressivement le cal mou se minéralise, donnant naissance à de l'os immature non orienté. Le cal mou devient alors le cal dur, un pont osseux rétablissant la solidarité mécanique entre les fragments. L'os immature se transforme en quelques semaines en os dur lamellaire primaire. Lors du remodelage, le tissu osseux lamellaire primaire est remplacé par l'os lamellaire secondaire. Enfin le modelage redonne sa forme initiale à l'os.

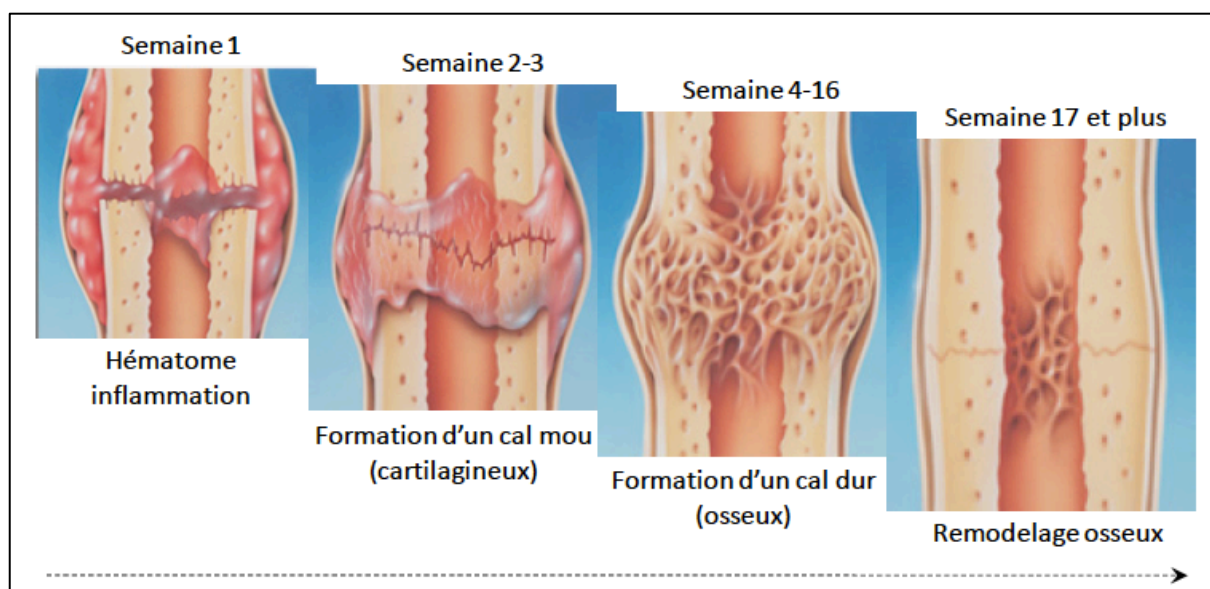


Figure 16. Réparation osseuse (d'après Calmar et al.)

L'hématome initialement formé au sein du site fracturaire possède dès le 4^{ème} jour un potentiel ostéogénique. Une étude a en effet montré que le caillot transplanté en site ectopique à J4 pouvait former de l'os (ostéoinduction), alors qu'il en était incapable à J2 (97). De plus, la présence de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), cytokine responsable de néovascularisation, a été retrouvée au sein de ce même hématome (98).

La réaction inflammatoire initiale permet le recrutement d'histiocytes et de macrophages qui vont jouer un rôle de « nettoyage » au sein du foyer de fracture. Dans les 8 premières heures suivant la fracture, les cellules souches mésenchymateuses précurseurs des ostéoblastes sont également recrutées, essentiellement dans la moelle osseuse, et migrent vers le foyer de fracture par l'intermédiaire de facteurs chimiotactiques. Elles se multiplient sous l'action de facteurs de croissance comme le PDGF, le TGF- β , le FGF et l'IGF et sont maximales à 24 heures. Les CSM se différencient ensuite en ostéoblastes, chondroblastes ou fibroblastes par l'intermédiaire de facteurs ostéo-inducteurs comme le TGF- β et les BMP. Ces différentes cellules, associées aux cellules endothéliales vont former le tissu de granulation qui va remplacer l'hématome. Le tissu de granulation, qui est fibrovasculaire et riche en collagène de type III, est formé en 2 à 3 semaines. Le cal primaire (ou cal mou) va ensuite apparaître dans le décollement du périoste. Les deux fragments fracturés sont alors unis par un manchon souple fusiforme. A proximité du site de fracture, les CSM sont différenciées en ostéoblastes qui élaborent la substance ostéoïde contenant des fibres de collagène essentiellement de type I sans arrangement spatial organisé. La minéralisation de la substance ostéoïde produit sur chaque fragment et sous le périoste un manchon d'os immature. La formation de cet os immature est limitée dans le temps ; elle cesse avant la fin de la 2^{ème} semaine chez le rat et vers la 6^{ème} semaine chez l'homme. Autour du foyer lui-même et sous l'influence de la mobilité de celui-ci, les CSM se transforment en chondroblastes et produisent une matrice cartilagineuse. Le cartilage apparaît alors en petits îlots puis en manchon qui immobilise le foyer. Le cartilage se minéralise progressivement et le cal mou devient dur, un pont osseux rétablissant la solidarité mécanique entre les fragments. Le cal dur est d'abord formé d'os immature non orienté de type trabéculaire. Son architecture a été conditionnée par la croissance des

capillaires qui précédaient les trabécules et assuraient leur nutrition. L'os immature va alors se transformer en os lamellaire primaire constitué d'ostéons orientés dans tous les plans de l'espace. A 16 semaines, l'os immature a pratiquement disparu. Le remodelage va ensuite rétablir lentement une architecture histologique normale de l'os. Le tissu osseux lamellaire primaire est remplacé par l'os lamellaire secondaire orienté longitudinalement. Ce processus nécessite 18 mois. La dernière étape, le modelage, qui concerne la forme générale de l'os, est un processus de sculpture des enveloppes osseuses qui tend à rendre à l'organe son aspect initial. Cette phase dure plusieurs années.

II.3.2. Os irradié

La pathogénie des séquelles de l'irradiation sur l'os reste mal connue, malgré les études menées dans ce domaine.

II.3.2.1. Aspects mécaniques

Les radiations ionisantes jouent un rôle dans la fragilisation de l'os. En effet, après irradiation thérapeutique, une atrophie de l'os trabéculaire potentiellement compliquée de fractures a été observée chez l'homme (99). Des études récentes réalisées sur des modèles murins ont mis en évidence une diminution de la résistance mécanique de l'os après irradiation, associée à des modifications de la masse osseuse (100,101). Ces constatations suggèrent que la phase minérale, responsable de la résistance de l'os, est dégradée par la radiothérapie. Une étude menée chez le rat a montré, 30 jours après une irradiation de 20 Gy et plus, une atrophie osseuse associée à une perte de l'os minéral (102). Une autre étude a montré une augmentation significative de la fragilité osseuse à partir de 40 Gy, sans toutefois retrouver de différence de contenu minéral de l'os cortical (103). Cependant, l'atteinte de l'hydroxyapatite biologique a été mise en évidence après irradiation, suggérant une corrélation entre les modifications de la phase minérale et

l'altération des propriétés mécaniques de l'os (104). De plus, une étude récente a montré que la gamma-radiation utilisée pour stériliser les allogreffes osseuses était responsable, à forte dose, d'une fragilisation de l'os cortical en rapport avec une altération du collagène (105).

L'aspect de l'os cortical irradié a été étudié par Sugimoto et al. sur des radiographies. Ils ont montré, après une irradiation monodose de 50 Gy, l'apparition d'une résorption au contact de l'endoste à 12 semaines, progressant ensuite au sein de la corticale. 52 semaines après la fin de l'irradiation, la face interne de la corticale était remaniée (106). Dans l'os long de lapin, une phase d'hyperhémie initiale, puis une augmentation du remodelage osseux ont été observées dans une période de trois mois après l'irradiation, suivis d'une phase de réduction du remodelage osseux à 12 mois (107).

Sur le plan histologique, une première phase se caractérise par des signes d'atrophie osseuse ostéoporotique. L'os « radique », dans une seconde phase, présente un aspect pagétoïde associant une ostéolyse par augmentation de la résorption ostéoclastique, et une ostéogénèse ostéoblastique défectueuse (108).

II.3.2.2. Aspects cellulaires

Les effets des rayonnements ionisants sur l'os peuvent être observés sur les cellules de la moelle osseuse, comme sur les cellules osseuses.

La moelle osseuse est très radiosensible. Elle est toutefois composée de cellules de radiosensibilité variable, le contingent cellulaire hématopoïétique étant le plus radiosensible (109). Alors que les effets d'une irradiation corporelle totale sur la moelle ont été largement étudiés, les données concernant les effets d'une irradiation partielle sont relativement faibles. Les travaux publiés montrent que les effets sur la moelle induits par les irradiations locales présentent des similitudes avec celles observées lors des irradiations corporelles totales, avec une réduction du nombre de cellules de la

lignée hématopoïétique. Cependant, la cinétique est différente car les doses délivrées en irradiation locale sont plus élevées. Il est rapporté qu'après une irradiation à une dose fractionnée inférieure ou égale à 30 Gy (ou 20 Gy en dose unique), une régénération médullaire est habituelle. Au-delà de cette dose, la récupération de l'hématopoïèse locale est très inconstante, voire nulle (110).

Des travaux chez le rat ont montré une régénération médullaire présente 7 et 14 jours après une irradiation sur des champs limités (fémur et tibia), d'une intensité variable en fonction de la dose délivrée (de 20 à 100 Gy). Au cours des 2^{ème} et 3^{ème} mois, les auteurs notaient une disparition progressive des capillaires sinusoides, associée à une diminution du nombre de cellules myéloïdes. Après 6 mois, une réapparition des sinusoides et des cellules myéloïdes n'était observée que chez les animaux ayant reçu 20 Gy. Il semble donc que les capacités de régénération médullaire après irradiation soient dépendantes de la microcirculation locale (111). Parallèlement, une étude expérimentale chez le lapin a montré une décroissance rapide de la pression partielle en oxygène (pO_2) au niveau la moelle osseuse d'un os long irradié, décroissance dose-dépendante et d'aggravation régulière au cours du temps en phase chronique radio-induite (112).

Les CSM semblent moins sensibles à l'irradiation que la lignée hématopoïétique. En effet, un des traitements établis de la leucémie est l'irradiation corporelle totale, suivie d'une transplantation de moelle osseuse, afin de repeupler la moelle osseuse en cellules souches hématopoïétiques. Il a été observé longtemps après la transplantation que les CSM demeuraient celles de l'hôte, alors que les CSH étaient celles du donneur. Cette observation suggère donc que les CSM survivent à l'irradiation, quand les CSH sont détruites (113). Toutefois, une diminution de la quantité de CSM a été montrée après irradiation (114,115). De plus, à distance de la radiothérapie, l'apparition d'une

ostéopénie et d'une ostéoporose chez des patients ayant subi cette irradiation corporelle totale laisse suggérer que l'irradiation affecte qualitativement les CSM de la moelle, en tendant à bloquer leur différenciation et à induire une sénescence prématurée (116). La toxicité radio-induite sur les CSM apparaît à faibles doses, ce qui contribue très probablement à l'atteinte du catabolisme osseux à long terme (113).

Les cellules osseuses proprement dites (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes), bien qu'elles soient enchâssées dans l'os minéralisé, sont également radiosensibles. Les ostéoblastes apparaissent comme les plus radiosensibles, viennent ensuite les ostéocytes puis les ostéoclastes (7). Les dommages radio-induits sur les ostéoblastes et les ostéocytes sont considérés comme un des facteurs principaux de la diminution de la densité de l'os minéral (117). Après irradiation, une diminution de la quantité d'ostéoblastes a été mise en évidence (115,118). Les études menées *in vitro* sur des ostéoblastes après irradiation ont montré une diminution de la prolifération, de la différenciation cellulaire, de la production de collagène ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire (119–122). Paradoxalement, les irradiations à doses inférieures ou égales à 2 Gy avaient plutôt tendance à stimuler la différenciation ostéoblastique et à augmenter la minéralisation (123). Par ailleurs, le taux de TGF- β 1, considéré comme l'une des cytokines majeures de la constitution des lésions de fibrose radio-induite (124), était stable ou augmenté après irradiation d'ostéoblastes *in vitro* (119,123).

L'action des rayons sur les ostéocytes est plus débattue. Chez le rat, après une irradiation de 35 Gy, Maeda et al. ont décrit des ostéoplastes vides (118), ainsi que Fenner et al. après une irradiation mandibulaire de 60 Gy (125). Pour Rohrer et al., les ostéocytes au sein de l'os cortical étaient morts après l'irradiation de mandibules de singe à 45 Gy, alors qu'ils ne semblaient pas affectés dans l'os trabéculaire (126). Par ailleurs, différentes études ont montré une relative radiorésistance des ostéocytes

(127). Par exemple, Sugimoto et al., après une irradiation de 50 Gy chez le lapin, ont retrouvé des ostéocytes intacts. Ils concluaient que les ostéocytes en tant que cellules hautement différenciées, sont a priori moins sensibles aux radiations ionisantes (106). Après une irradiation corporelle totale chez la souris, la réponse précoce des ostéoclastes a consisté en une augmentation de leur quantité et de leur activité, contribuant ainsi à une ostéoporose radio-induite dès la fin de la première semaine post-irradiation (128,129). Une diminution de l'activité des ostéoclastes a ensuite été mise en évidence au-delà de la première semaine (130). Toutefois, en cas d'irradiation ciblée sur le fémur chez le rat, une diminution du taux d'ostéoclastes a été observé dès la première semaine (115). Cette diminution de l'activité des ostéoclastes, associée à la diminution de celle des ostéoblastes, entraîne une diminution du remodelage osseux et donc une diminution des propriétés mécaniques de l'os (100). Ainsi, la combinaison de la perte osseuse précoce par augmentation de l'activité ostéoclastique et la réduction de la formation osseuse dans un deuxième temps semblent contribuer à l'ostéopénie post-radique.

II.3.2.3. Effets vasculaires

L'irradiation est responsable d'une diminution du nombre de vaisseaux au sein de l'os irradié, aussi bien dans la moelle osseuse que dans les canaux de Havers (115,126). La première description de perte vasculaire après irradiation est attribuée à Ewing, comme résultant d'une péri et endartérite oblitérante avec un gonflement et une vacuolisation du cytoplasme des cellules endothéliales au sein des ostéons. Le remplacement des cellules musculaires lisses de l'intima des vaisseaux entraîne une fibrose vasculaire et une diminution de la lumière vasculaire (126,131). La mandibule semble particulièrement à risque de lésion vasculaire radio-induite, en raison de sa

vascularisation essentiellement centro-médullaire au niveau des branches horizontales et des angles par l'artère alvéolaire inférieure, branche de l'artère maxillaire (figure 17).

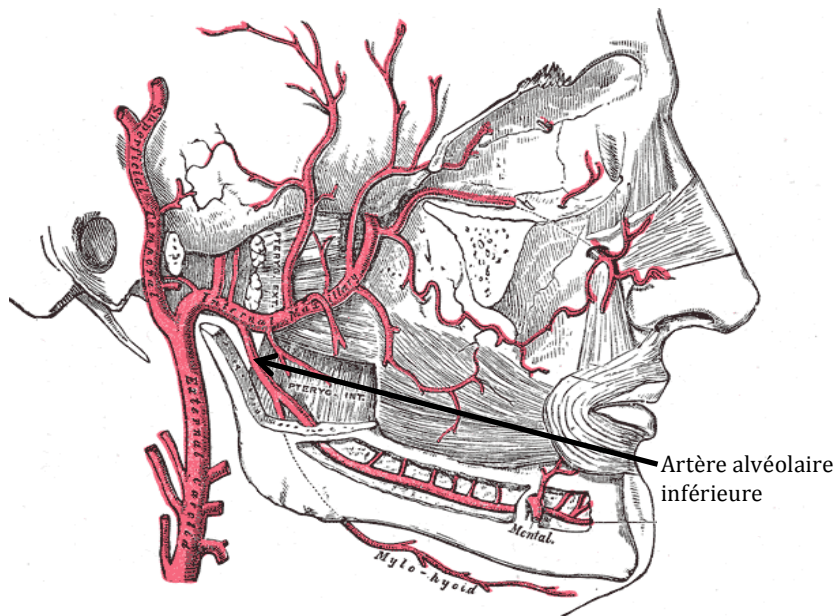


Figure 17. Branches de l'artère maxillaire et vascularisation de la mandibule par l'artère alvéolaire inférieure (d'après Gray's Anatomy)

La diminution du flux sanguin au sein de l'os irradié a été mise en évidence dans différentes études (115,131,132). Dans un modèle de fémurs de rats irradiés, Hopewell montrait une relation dose-effet. La diminution du flux sanguin était maximale à 3 mois. Elle était transitoire pour des doses inférieures ou égales à 20 Gy, mais persistantes au-delà de 25 Gy (131). Il persiste une incertitude sur l'enchaînement des phénomènes biologiques au sein de l'os irradié. Pour certains, il semble que le principal facteur responsable des changements physiologiques de l'os irradié soit l'atteinte de la vascularisation. Elle serait la cause de la perte des cellules osseuses et médullaires. Toutefois, pour d'autres, les effets directs des rayons sur les cellules sont primordiaux dans la pathogénie de l'os irradié (34,107). Il semble donc que les 2 effets soient

associés, à savoir une atteinte cellulaire directe par les radiations ionisantes et une diminution du flux sanguin par atteinte vasculaire, expliquant la réponse complexe du tissu osseux à l'irradiation.

L'augmentation du remodelage osseux observée juste après l'irradiation malgré la diminution du flux sanguin est soutenue par l'augmentation précoce de l'activité enzymatique (133).

II.3.2.4. Ostéoradionécrose

Les effets des rayons sur le tissu osseux semblent réversibles, jusqu'à un certain point, dépendant du type d'irradiation, de la dose, mais aussi du terrain et du type d'os irradié. L'ORN constitue une nécrose de l'os après irradiation, phénomène non réversible rarement observé. Il existe deux types d'ostéoradionécroses rencontrées chez l'homme : l'ORN dite « aseptique » au niveau de la tête fémorale, et l'ORN « septique » des maxillaires. Le premier rapport d'ORN de la mandibule dans la littérature médicale est attribué à Regaud en 1922 (134). Il n'existe actuellement pas de définition universelle de l'ostéoradionécrose. La définition proposée par Marx en 1983 était « une surface osseuses exposée de plus d'un centimètre dans un champ d'irradiation, qui ne cicatrise pas après 6 mois d'évolution » (135). D'autres définitions, cliniques, radiologiques ou anatomopathologiques, ont été proposées (44). La majorité des auteurs semblent toutefois d'accord sur les points suivants (136) :

- Le site atteint a été préalablement irradié ;
- Aucune récurrence tumorale ne doit être présente ;
- Une exposition osseuse est présente à travers une ouverture muqueuse ;
- L'os exposé doit être « mort » ;
- Une cellulite, une fistulisation ou une fracture pathologique ne sont pas indispensables pour définir une ostéoradionécrose.

La durée de l'exposition osseuse et la notion d'os « mort » doivent être cependant précisées. En fonction des auteurs, la durée d'exposition peut être absente, ou varier de 2 mois à 6 mois. On sait qu'une extraction dentaire peut nécessiter plus d'un mois pour cicatriser en terrain irradié ; toutefois, un délai de 6 mois n'est souvent pas attendu pour entreprendre le traitement d'une telle exposition ; c'est pourquoi une période d'au moins 3 mois a pu être retenue (136). L'ostéoradionécrose se développe entre les 6 et 12 mois après la fin de l'irradiation, mais le risque persiste toute la vie. Toutefois, elle peut survenir plus précocement en cas de traumatisme local (44). La notion d'os « mort » ou nécrotique est plus difficile à préciser. En cas de geste chirurgical sur cet os, l'absence de saignement renseigne sur le volume d'os nécrotique ; toutefois, cet acte invasif ne peut pas être utilisé pour définir ce qu'est l'ostéoradionécrose. L'incidence de l'ostéoradionécrose de la mandibule est difficile à appréhender car elle varie dans le temps. Elle décroît depuis la fin des années 60, avec l'avènement de la radiothérapie à haute énergie. Ainsi, le taux d'ORN a pu évoluer de 30% à moins de 5% aujourd'hui (137). L'ORN touche 20 à 30 fois plus souvent la mandibule que le maxillaire, probablement en raison de sa vascularisation centro-médullaire (49,138). Après oblitération de l'artère alvéolaire inférieure et de ses branches (cf chapitre 2.3.2.3), la revascularisation par l'artère faciale serait rendue défectueuse par la fibrose vasculaire associée (139). L'ORN est trois fois plus fréquente chez les patients dentés (140). La localisation de la tumeur initiale à la cavité buccale semble corrélée à l'apparition d'une ORN pour Curi et Dib (49). Le taux survenue d'une ORN est plus élevé si la dose totale de la radiothérapie est élevée (supérieure à 60 Gy), la dose par fraction supérieure à 2 Gy, le volume irradié est important, qu'il existe une chimiothérapie concomitante, qu'il existe des dents en mauvais état, et qu'un traumatisme chirurgical ou dentaire soit associé. Le risque lié aux extractions dentaires est toutefois minimisé si elles sont

réalisées au minimum 21 jours avant la radiothérapie (92). L'utilisation de la RCMI semble réduire l'incidence de l'ORN (141).

Différentes théories ont été proposées pour tenter d'expliquer la physiopathologie de l'ORN (135,142,143). La théorie défendue par Meyer dans les années 70 proposait cette succession d'événements : irradiation, traumatisme et infection. Il suggérait que le traumatisme permettait l'invasion par la flore microbiologique orale de l'os irradié (142). Les observations histologiques précisaient alors la présence de bactéries au sein de l'os nécrosé, ainsi que l'épaississement des parois artérielles, la diminution du nombre d'ostéocytes et d'ostéoblastes, et le comblement des cavités osseuses par des cellules inflammatoires. Cette théorie était à la base du traitement de l'ORN par antibiotiques en association à la chirurgie. En 1983, Marx proposa une nouvelle théorie après avoir démontré que les microorganismes, comme le traumatisme, ne jouaient pas un rôle majeur dans la physiopathologie de l'ORN. En effet, il ne retrouvait pas d'infection des zones profondes non exposées des foyers d'ORN, mais une surinfection du foyer restait possible, notamment à actinomyces (144). De même, la survenue spontanée d'ORN (35 à 39% des ORN selon Marx) rendait le traumatisme non indispensable au développement de l'ORN. Sur le plan histologique, Marx a montré la présence de thromboses vasculaires, de cellules endothéliales mortes, d'une diminution des ostéoblastes et ostéocytes, avec une fibrose de la moelle osseuse. Cette théorie, appelée théorie des 3 H (hypoxie, hypocellularité, hypovascularité) (135), mettait en avant l'hypoxie qui semblait responsable de l'ensemble des lésions observées (figure 18). Cette théorie a été à l'origine du traitement de l'ORN par oxygénothérapie hyperbare.

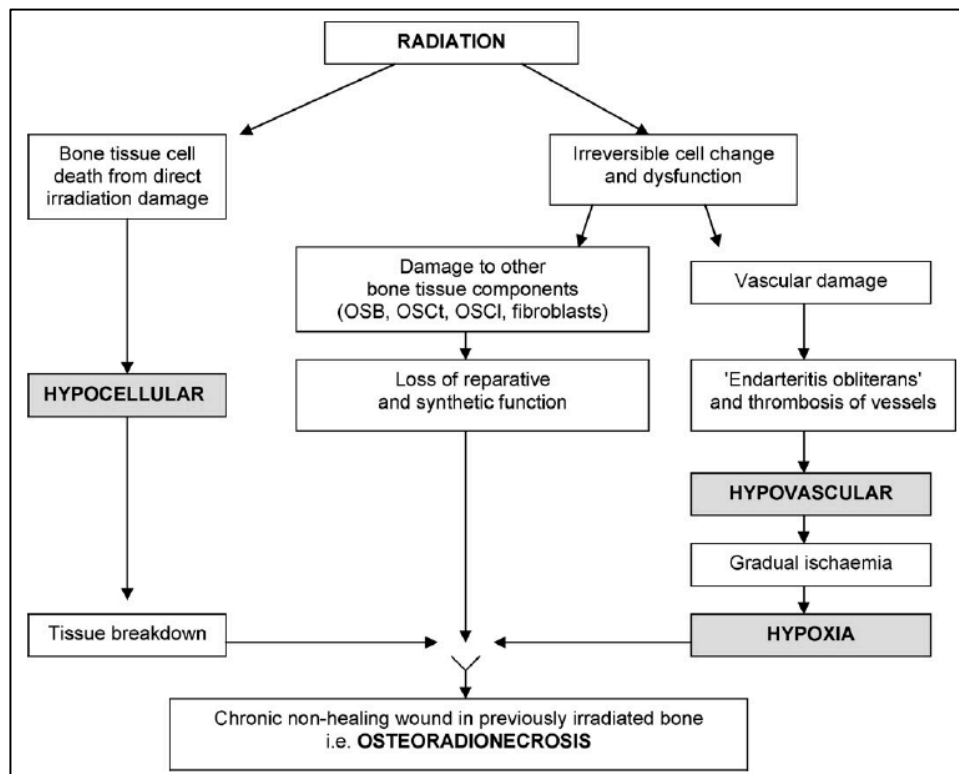


Figure 18. Physiopathologie de l'ORN selon Marx (d'après Lyons 2008)

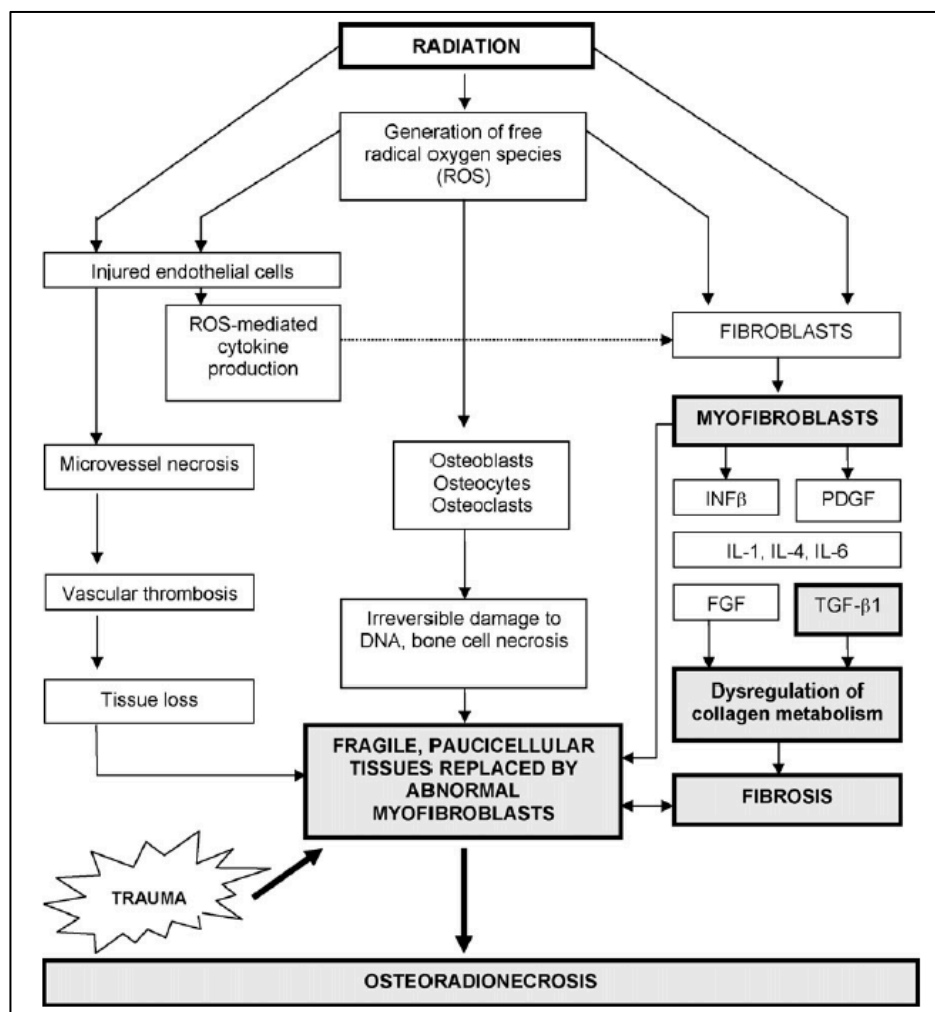


Figure 19. Physiopathologie de l'ORN selon Dambrain (Lyons 2008)

Une théorie plus récente propose que l'ORN survienne selon un mécanisme fibro-atrophique radio-induit (92,143). La physiopathologie inclurait la formation de radicaux libres, une dysfonction endothéliale, une inflammation, des thromboses microvasculaires, de la fibrose et finalement une nécrose (figure 19). Le développement de la fibrose en plusieurs étapes est identique à celle décrite dans les autres tissus normaux irradiés. Les conclusions apportées par Marx dans sa théorie des 3 H étaient proches de celles de la théorie fibro-atrophique, mais l'hypoxie était mise au premier plan (44).

Contrairement à celle de Marx, la théorie fibro-atrophique suggère que l'événement clé est l'activation et la dérégulation de l'activité des fibroblastes. Après radiothérapie, les cellules endothéliales sont altérées, directement par l'irradiation et indirectement par la production de radicaux libres. Les cellules endothéliales endommagées produisent des cytokines qui recrutent des cellules inflammatoires et entraînent la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. Les myofibroblastes restent activés en produisant de la matrice extracellulaire et en diminuant leur capacité à la dégrader. Les cellules endothéliales endommagées sont détruites, ce qui entraîne une thrombose vasculaire, puis une ischémie locale (143). La destruction des ostéoblastes après irradiation, leur incapacité à se régénérer, et l'excessive prolifération des myofibroblastes entraînent une diminution de la matrice osseuse et son remplacement par du tissu fibreux. Au final, les myofibroblastes entrent en apoptose et l'os devient paucicellulaire, faiblement vascularisé et fibrosé. Sur le plan radiologique, une lyse osseuse périostéocytaire a été mise en évidence par Dambrain au sein de fragments osseux provenant de patients atteints d'ORN. La coalescence d'ostéoplastes forme des cavités polycycliques, qui semblent, pour l'auteur, pathognomoniques de l'ORN (143).

II.3.2.5. Effets sur la cicatrisation osseuse

Différentes études se sont intéressées aux effets de l'irradiation sur les capacités de l'os à se réparer. Pelker et Friedlaender ont montré qu'un foyer de fracture exposé à 11 Gy trois jours après sa survenue restait à un niveau de réparation osseuse plus immature, et que la résistance de l'os était amoindrie (145). L'étude d'Arnold et al. (146) a observé la cicatrisation de l'os chez des fémurs de irradiés, avant ou après création chirurgicale d'un défaut osseux, et comparé à des rats non irradiés. Pour les rats non irradiés, la cicatrisation osseuse était complète à 6 semaines. Une irradiation préopératoire unidose de 22 Gy entraînait une baisse de la néoformation osseuse et laissait 95% de la lésion non fermée, avec un tissu hypocellulaire, que l'irradiation ait été réalisée entre 1 jour et 6 mois avant la chirurgie. Concernant l'irradiation postopératoire, les effets dans les 3 premiers jours étaient comparables à ceux observés lors des irradiations préopératoires. Par contre, à partir du 4^{ème} jour, les effets s'estompaient et aux délais 7 et 14 jours, la cicatrisation osseuse n'était plus affectée. Les auteurs mettaient en avant le rôle des rayons sur les ostéoblastes et les CSM, les résultats observés en cas d'irradiation préopératoire étant stable quel que soit le délai entre l'irradiation et la chirurgie. Les lésions vasculaires engendrées par l'irradiation ne semblaient pas jouer un rôle primordial sur la cicatrisation osseuse, une latence de quelques semaines après l'irradiation étant nécessaire pour les voir apparaître (147). Dans le cas de l'irradiation postopératoire, le caillot sanguin au sein du défaut osseux étant colonisé par les ostéoblastes et possédant alors un caractère ostéoinducteur dès J4 (97), est moins affecté par l'irradiation.

Les insuffisances ou retards de cicatrisation osseuse en territoire irradié ont été mis en évidence par différentes études (148–152). Après irradiation, le processus de cicatrisation osseuse pathologique était caractérisé par la présence d'œdème, de fibrose

et de nécrose (151). Au niveau cellulaire et des messages intercellulaires, Schultze-Mosgau et al. ont montré une diminution des BMP 2 et 4, de l'ostéocalcine et une augmentation du collagène I et du TGF- β 1 (149).

III. SUBSTITUTION OSSEUSE

La réparation osseuse physiologique aboutit à la formation d'un nouvel os de constitution normale. En cas de situations de cicatrisation osseuse défavorables ou de pertes de substance osseuse de taille critique (c'est à dire ne cicatrisant pas spontanément), la réparation osseuse peut être incomplète, insuffisante ou de mauvaise qualité. Pour suppléer cette cicatrisation, les autogreffes osseuses sont la technique de référence permettant la réparation osseuse dans ces conditions difficiles.

III.1. Biomatériaux pour la reconstruction osseuse en ORL

Le recours aux biomatériaux fait partie des alternatives à l'utilisation des greffes osseuses, les sites donneurs étant limités, et le prélèvement osseux étant source de morbidité. Différents biomatériaux sont utilisés en pratique courante. Les biomatériaux de type céramiques phosphocalciques favorisent l'adhérence, la prolifération et la différenciation oséoblastique des CSM, ainsi que la production de la matrice collagénique. Le biomatériau doit aussi permettre la néovascularisation à partir des tissus avoisinants. Dans le cas des pathologies ORL et maxillo-faciales, les divers substituts osseux disponibles ont fait l'objet d'une revue de la littérature.



CONTENTS

History of bone substitution

Properties of biomaterials
& bone substitutesBone substitution in ear,
nose & throat, face &
neck surgery today

Indications

Expert commentary

Five-year view

Conclusion

Financial disclosure

Key issues

References

Affiliations

Author for correspondence
Department of ENT and Face &
Neck Surgery, Nantes University
Hospital - 1, place A. Ricordeau,
44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 083 475
Fax: +33 240 083 477
omalard@chu-nantes.fr

KEYWORDS:
biomaterial, bone substitute,
maxillo-facial implant, prosthesis,
tissue engineering

Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck

Olivier Malard[†], Florent Espitalier, Philippe Bordure, Guy Daculsi, Pierre Weiss and Pierre Corre

The role of biomaterials has become more important in the last 30 years in otorhinolaryngology. Legal directives for their use and, more importantly, indications have been specified. Biomaterials are medical devices, designed for tissue substitution or reconstruction. Approval labeling is issued in the form of European Community certification and postmarketing medical device safety in Europe – completely independent from the US FDA's certification. The indications for biomaterials are generally similar to those of autografts. Their main advantage is that they limit the morbidity caused by autograft harvesting. The benefits are aesthetic, functional or both. The main indications are in otology, sinus surgery, cranio-maxillo-facial traumatology, osteosynthesis and orthognathic surgery, skeletal augmentation and anti-aging surgery, facial prosthetic rehabilitation and laryngology. The research fields are extremely varied (e.g., increased therapeutic properties, drug-delivery systems or tissue engineering). Increasingly, biomaterials are implanted and the surgical success of their use is dependent upon strict legal labeling and well-defined indications.

Expert Rev. Med. Devices 4(5), 729–739 (2007)

In otolaryngology and maxillofacial surgery, autografts or biomaterial implants are indicated for esthetic, functional or matching needs. Synthetic-material implants have increased for two main reasons: first, they have made it possible to reduce morbidity induced by autograft harvesting; and second, thanks to progress in their biocompatibility.

From the certification point of view, biomaterials are not considered to be 'medicine' but rather 'medical devices'. The safety of medical devices is overseen in Europe by European Community certification (CE approval) and in the USA by the US FDA. Both official approval systems require strict clinical trials before industrial promotion. Physicians are obliged to perform rigorous follow-up on efficacy of use of materials *in situ* (their mechanical properties, limitations of tissue implantation, degradation capacities, patient disease and history) and to precisely consider the applications for the device.

In the case of bone substitutes (i.e., calcium phosphate ceramics), the certification level is higher (in Europe and the USA), as the tissue–host interface is active (the material is replaced by newly formed bone according to a well-defined timescale).

In the last 10 years, research on biomaterials in general, and bone substitutes in otolaryngology and maxillofacial surgery in particular, has focused on developing increased therapeutic properties for medically implanted devices: drug-delivery systems, composite materials combining scaffolds with marrow or mesenchymatous stem cells.

History of bone substitution

Bone grafts

The first bone graft experiments were probably performed during the 5th Century on recently deceased humans [1]. The first published medical observations come from the middle of the

19th Century, with Louis Leopold Ollier describing the use of homoplastic and alloplastic grafts for large bone defect repairs [2]. Until the second part of the 20th Century, bone grafts were the only effective surgical procedure for bone substitution [3]. Barely credible observations of autologous graft have been described in otolaryngology, for instance using the second left hand finger to rebuild a complete nose. In total, three categories of bone grafts have been performed in the last 120 years:

- Xenografts, of animal origin, which are associated with a double risk: infectious (nonconventional agents) and immunological. The use of xenografts has been completely abandoned in head and neck surgery;
- Allografts are associated with the same risks, so their use is limited to certain orthopedic circumstances, but have also been abandoned in head and neck surgery [4];
- Autografts are the only bone grafts still used in head and neck surgery. Their use is always balanced against the material benefits.

History of bone substitutes

Anecdotal use of various materials (i.e., wood or ivory) is described in historical observations. The first real surgical procedure for material implantation was described at the end of the 19th Century using common plaster (calcium sulfate). The hemihydrate calcium sulfate ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$), better known as plaster of Paris, produced interesting results regarding biocompatibility. Nevertheless, the mechanical strength was insufficient for orthopedic requirements. Progressively, the use of calcium phosphate increased, replacing calcium sulfate.

Properties of biomaterials & bone substitutes

A biocompatible material (sometimes shortened to biomaterial) is a synthetic or natural material, used to replace part of a living system, or to function in intimate contact with living tissue. A material is considered to be biocompatible if it is not toxic locally or generally for the host, and if it does not prevent normal tissue differentiation [5]. In addition to mutagenicity and carcinogenesis studies, the interface with biological systems is very carefully taken into consideration, particularly regarding the inflammatory response between the tissue and material. Standardized criteria must be evaluated to characterize the behavior of the cell lines in contact with the material. This biological cell evaluation must be undertaken before any functional tests are conducted with the material.

For implanted bone materials for bone substitution, the criteria are even stricter. Different levels of biocompatibility have been proposed to define the properties of medical devices, depending on tissue interaction:

- Biotolerated materials: these materials are tolerated by bone and never rejected. Fibrous encapsulation is provoked upon contact with them, separating the material from the bone (e.g., polyacrylics);

- Bioinert materials: the contact between the bone and the material is virtual under microscopic examination; there is no fibrous encapsulation. No tissue interposition can be observed between the material and bone, and no biological interactions are described (e.g., alumina or titanium);
- Bioactive materials: exchanges and interactions occur between the bone and material, making new bone ingrowths easier. Progressively, the material is substituted by newly formed bone, and the interfaces can no longer be identified. The bioactive properties of bone substitution materials are also called osteocoalescence (e.g., calcium carbonate, calcium phosphate or bioglass);
- Bioinductive materials: these materials are able to induce newly formed bone outside bone areas (ectopic bone formation). Bone marrow cells or osteoinductive proteins associated with the calcium phosphate scaffold are osseointegrative materials.

In the first two levels (biotolerated and bioinert materials), the materials are bone biocompatible. They are designed for bone implantation (e.g., osteosynthesis or bone anchoring) but will never be substituted by newly formed bone. At the next two levels (bioactive, bioinductive), the materials are considered to be bone substitutes.

Bone substitution in ear, nose & throat, face & neck surgery today

Generally speaking, three kinds of bone substitute are used today: autologous bone grafts, animal ceramized porous bone and synthetic bone substitutes.

Bone grafts

In ear, nose and throat (ENT), face and neck surgery, only autologous bone grafts can be considered (allografts and animal bone have been abandoned). Nonautologous grafts are associated with the risk of infection and poor immunological tolerance, resulting in an increased inflammatory response and material resorption [4].

Allografts are harvested from the patient (e.g., costal, iliac or calvaria). The limitations come from volume restrictions, with the harvest site possibly insufficient in cases with extensive defects [6,7]. The main disadvantage is related to the morbidity induced by bone graft harvesting (pain, risk of hematoma in the iliac crest and extradural hemorrhage for calvaria harvesting to name a few). In some specific cases, autografts remain the best indication, as they provide better results than synthetic biomaterials (e.g., rhinoplasty).

Animal ceramized porous bone

These materials are the intermediary between grafts and synthetic materials. They respect the natural scaffold of bone. Two categories are used:

- Ceramized coral (CaCO_3), available as aragonite. Commercialized materials have undergone specific procedures (e.g., hydro-thermic action treatment and replacing the carbonate with

phosphate) to make them safer. Such biomaterials have bone-bonding properties and retain interconnected porosity that encourages new bone formation [8,9]. Coral is for the most part used for maxillary and orbital bone surgery [10].

- Bovine ceramized bone is manufactured from the transformation of the femur and humerus: industrial ceramization of bone is obtained by high-temperature heating (up to 1000°C). Ceramization makes it possible to completely eliminate bone proteins, thus removing both the infectious and immune properties of the materials, while retaining the advantages of bone scaffolds [11,12].

Synthetic substitutes

Synthetic materials are implantable medical devices. Some have bioactive properties, such that they can slowly be resorbed with respect to variable timescales. Progressively, newly formed bone replaces the substitute in the implanted area. Of the bone substitutes available, calcium phosphate ceramics are the most commonly implanted [13].

Indications

Otology

Ossiculoplasty

Ossicle (malleus, incus and stapes) connection is necessary for correct transmission of acoustic pressure waves from the external ear to internal ear (cochlea). Ossicles can be discontinued after infection or traumatism. Ossicular chain synthetic implants have been developed since the 1960s. Autografts (cartilage, remaining ossicle fragments) are still considered for ossicular replacement, but are not always available in previously operated patients. Very different synthetic materials are available [14] (e.g., plastic or ceramic), with good functional results: auditory threshold improvements are considered equivalent to those obtained with autologous grafts (e.g., incus, external ear cartilage and mastoid cortical bone) [15,16]. When faced with different anatomical features encountered during middle ear surgery (unpredictable ossicle malfunction), many synthetic ossicle prostheses are commercially available, such as incus prosthesis, stapes prosthesis, partial ossicular replacement prosthesis and total ossicular replacement prosthesis. The most commonly used materials are titanium and dense hydroxyapatite (HA). The advantage of these materials is excellent biocompatibility, without the risk of resorption (FIGURE 1). Certain plastic materials, associated with good functional results, have been discarded owing to a high risk of transtympanic membrane rejection.

Canal wall reconstruction & mastoid filling

The advantages of external auditory canal reconstruction and mastoid filling are a much-debated subject. A radical nonconservative mastoidectomy (canal-down mastoidectomy associated with ossicular removal) may be mandatory to treat destructive or threatening

cholesteatoma or chronic otitis. After radical mastoidectomy performed, many ENT surgeons suggest completely filling the removed mastoid cavities (FIGURE 2). The cavities can be filled either during the removal surgery or at a later stage. The benefits are a decrease in ear discharge events following radical mastoidectomy, improved swimming and auditory aids for prosthetic possibilities [17]. The possible risk of concealing a relapse of cholesteatoma has not been demonstrated. The recurrence of cholesteatoma would, nevertheless, be reduced after mastoid obliteration [18]. The preferred biomaterials are granules of calcium phosphate ceramics, mainly biphasic calcium phosphate. Certain authors mix bone substitutes with biological glue in order to improve the molding properties of the substitute and make it easier to fill posterior mastoid cavities [19]. The mechanical properties are not of primary importance in this kind of use.

Bone-anchored hearing aids

The bone-anchored hearing aid (BAHA) is a new implantable system proposed for the treatment of hearing loss. It works through direct bone conduction. It was first used in 1977, and was cleared by the FDA in 1996 as a treatment for conductive and mixed hearing losses in the USA. BAHAs are used to improve the hearing of people with chronic ear disease, congenital external auditory canal atresia and single-sided deafness that cannot benefit from a conventional hearing aid. The system is surgically implanted (titanium mastoid implant) and allows sound to be conducted through the bone rather than via the middle ear – a process known as direct bone conduction [20].

Facial prosthetic rehabilitation & epithesis

Malignant tumors or traumatic defects involving facial structures can necessitate prosthetic rehabilitation, as surgical reconstruction may be impossible. Complex surgery (free flaps multi-tissue harvesting and microsurgery) for organ removal or amputation is inadequate in the case of the elderly or poor performance status. Prosthetic rehabilitation is a reliable reconstruction method, particularly when the patient cannot support

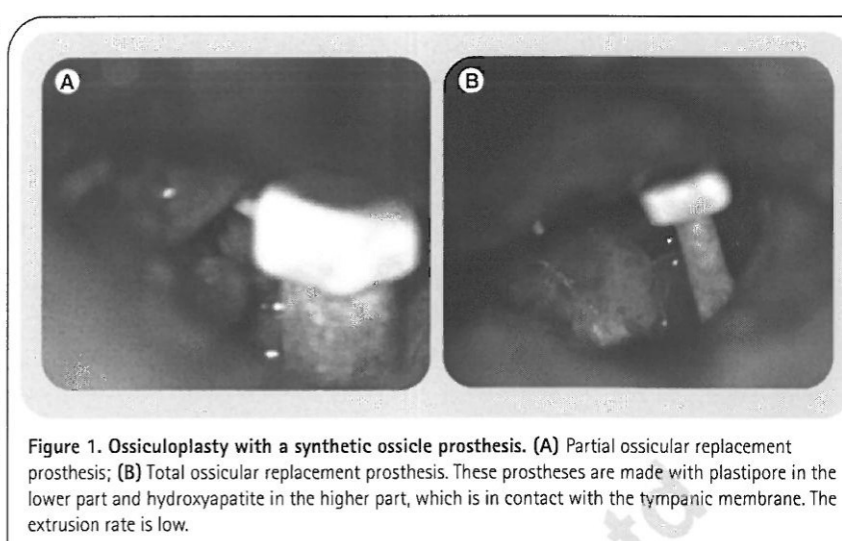


Figure 1. Ossiculoplasty with a synthetic ossicle prosthesis. (A) Partial ossicular replacement prosthesis; (B) Total ossicular replacement prosthesis. These prostheses are made with plastipore in the lower part and hydroxyapatite in the higher part, which is in contact with the tympanic membrane. The extrusion rate is low.

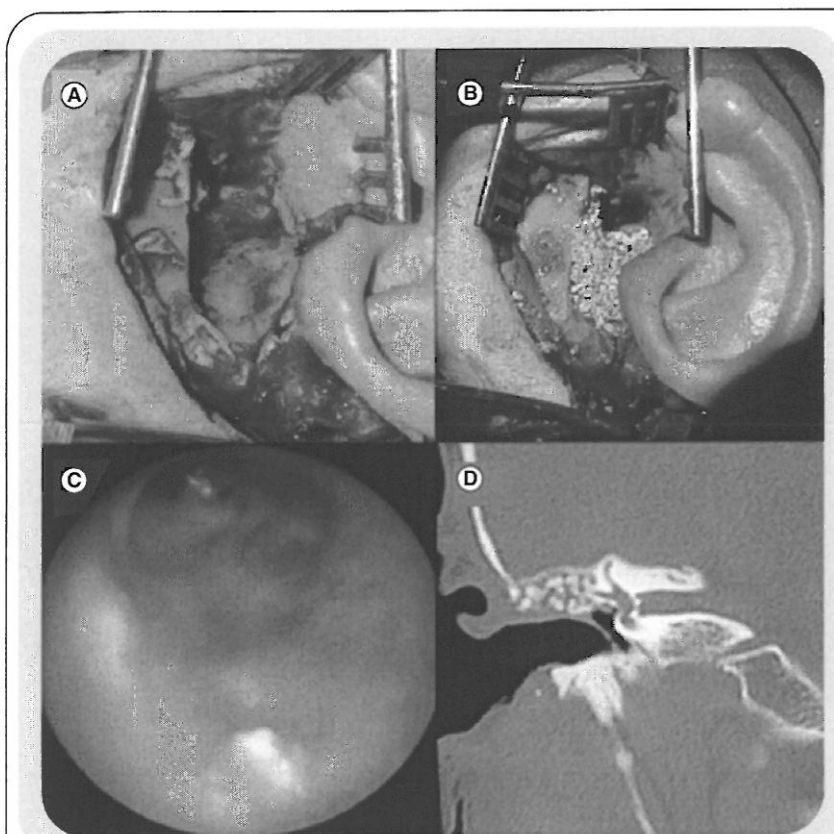


Figure 2. Mastoid filling with calcium phosphate bone substitute. (A) Radical mastoidectomy for recurrent cholesteatoma; (B) Mastoid cavity filled with Macroporous Biphasic Calcium Phosphate (MBCP™); (C) Otoscopic aspect 2 years following surgery showing the rebuilt external ear canal; (D) CT-scan aspect 2 years following surgery. The mastoid cavity is filled with Mbiphasic calcium phosphate™ in contact with newly formed bone.

heavy complex surgery. Prostheses can be made from a variety of materials, such as polymethyl methacrylate or urethane-backed, medical-grade silicone. The materials are stained to fit the cosmetic requirements of the patients. Epitheses are designed to match the bone and soft tissues of the face (FIGURE 3), and are held in place with adhesives, tissue undercuts or extraoral osseointegrated bone-anchored implants (two, three or four osseointegrated titanium screws) [21]. They can be associated with dental implantation if necessary. Suitable recipient sites for midface implants are the zygomatic buttress, supraorbital rim, horizontal part of the hard palate and the vomer bone. The prosthesis is constructed so that it can be easily removed by the patient, allowing proper maintenance and hygiene [22].

Sinus surgery

Increasing the maxillary sinus floor

The need for an increased sinus floor is recent in surgical terms [23]. Its generalization has occurred as a direct consequence

of the success of dental implants. The common limitations of dental implant surgery are linked to the height of the remaining alveolar bone. In the sinus dental area, certain patients with old dental removal are likely to lack sufficient quantities of alveolar bone owing to the resorption of the bone close to the bottom of the sinus cavity. Insufficient remaining bone does not make the dental implantation technique possible into host bone. In such cases, a new surgical process has been proposed to increase bone height before performing the dental implantation. Bone elevations were first performed with autologous bone (e.g., the iliac crest). To reduce the consequences of autologous bone harvesting, bone substitutes (porous HA or biphasic calcium phosphate) were proposed. Bone substitutes make large implantation volumes possible, with results equivalent to those of bone grafts (FIGURE 4) [24].

Sinus cavity filling & exclusion

Sinus exclusion is not a common surgical procedure. It is mainly required for frontal sinus chronic inflammatory or post-traumatic diseases. In certain recurrent failures in treating frontal sinusitis, particularly if the nasofrontal duct is not permeable, infection can be severe or even life threatening. Abdominal fat grafts have been proposed with good results, and biomaterials (biotolerated bone materials or bone substitutes) have demonstrated equivalent results. Different materials are available for performing sinus exclusion, including silicate-based alloplasts, granules and

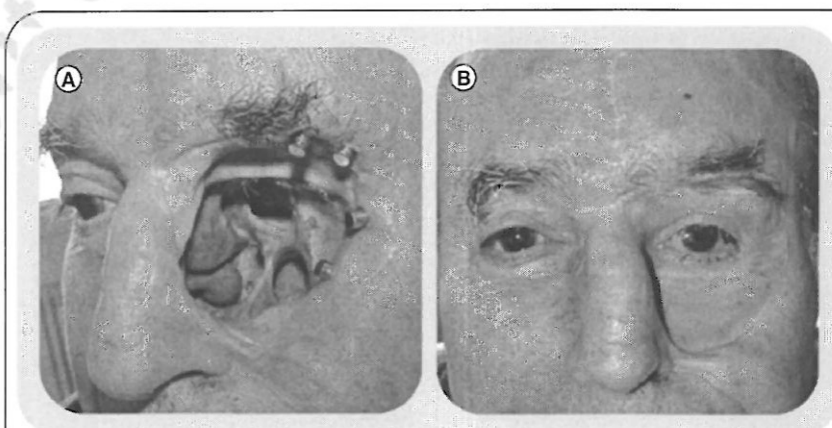


Figure 3. Facial bone-anchored prosthesis. (A) Patient treated with radical ethmoid removal extended to the skull base and orbital removal for extensive malignant tumor. Four titanium bone anchored screws have been implanted for prosthetic attachment; (B) Attached facial prosthesis.

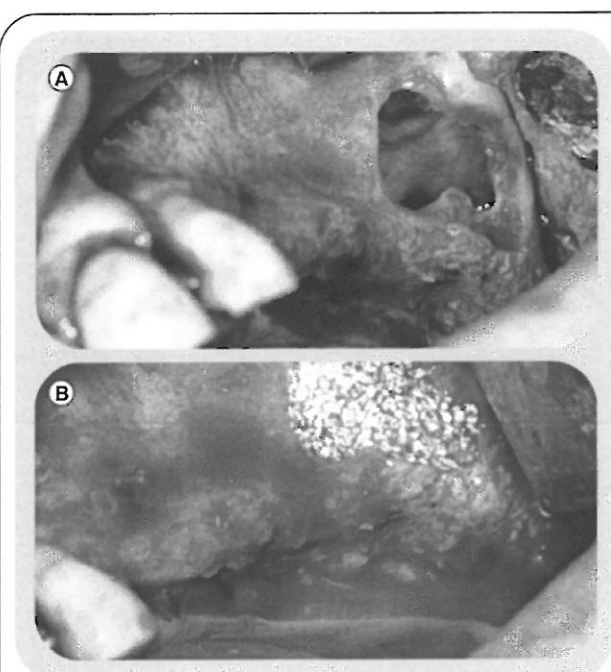


Figure 4. Maxillary sinus floor augmentation procedure before dental implantation. (A) Operative aspect before bone substitute implantation (Macroporous Biphasic Calcium Phosphate [MBCP™]); (B) Maxillary sinus after floor filling with Mbiphasic calcium phosphate™ and biological glue. Reprinted with the permission of the dental implantation unit, Nantes University Hospital, France.

cements (e.g., bioglass, β -tricalcium phosphate and bicalcium phosphate). Osseointegration of bone materials in sinus cavities has been clearly demonstrated. Complications are reduced by abandoning fat graft harvesting [25,26]. The most complicated challenge in sinus obliteration surgery is to attain complete removal of the mucosa and complete closure of the nasofrontal duct [27]. HA cement ratios have been proposed with excellent results in obliterating the frontal sinus and nasofrontal duct [28,29].

Cranio-maxillo-facial traumatology

Orbital fracture

In case of orbital fracture, the trauma shock can be responsible for prolapse of the orbital content into the paranasal sinuses: the injury of the inferior rectus muscle in the shock can produce ophthalmic palsy. Calcium carbonate-based implants have been used successfully in orbital floor reconstruction when the bone defect is large (FIGURES 5 & 6) [30]. A porous form of polyethylene, such as Medpor® (Porex Surgical Inc.), is also used in wide fractures more than 1 cm in diameter [31]. Medpor is said to induce a lower complication rate in the remaining enophthalmia than porous HA [32]. Small fractures of less than 1 cm in diameter are successfully treated with a polydioxane cup [33] where the weight of the ocular globe can be supported by the remaining orbital floor around the fracture. Such materials are designed to prevent endo-orbital soft tissue being displaced into the maxillary sinus.

In the case of craniofacial defects, several biomaterials are currently proposed for implantation. Polymethylmethacrylate and HA cement [34] have been used after cranioplasties, frontal-bone reconstruction and forehead augmentation [35].

Alveolar cleft osteoplasty

The reconstruction of alveolar cleft defects is well established. The most widely accepted approach is the secondary alveolar cleft osteoplasty in the mixed dentition phase with autologous bone grafting [36]. Donor site morbidity is important for deciding whether to harvest cancellous bone. In the maxillo-facial region, osteoconductive agents can be associated with autologous-harvested bone to rebuild defects and to avoid the need for repeat surgery. Horch *et al.* have promoted a mixture of β -tricalcium phosphate granules and autogenous bone for filling congenital alveolar clefts in children [36]. They demonstrated no complications in orthodontic tooth movement and eruption of the canines. HA granules combined with platelet rich plasma and autogenous bone have also been used successfully (FIGURE 7). The use of tissue-engineered osteogenic material combining platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells (expanded and induced to osteogenic potential in bone augmentation procedures) has been proposed for replacing autologous bone grafts. Hibi *et al.* first applied this material for an alveolar cleft osteoplasty in a 9-year-old patient [37]. Osteoinductive agents, such as recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP)-2, can also offer new possibilities for cleft reconstruction with an appropriate carrier. Different clinical teams have successfully applied rhBMP-2 in human distraction and severe cleft treatment cases [38].



Figure 5. Postoperative x-ray after orbital floor reconstruction with coralline implant (thickness 1 mm) in a wide defect.

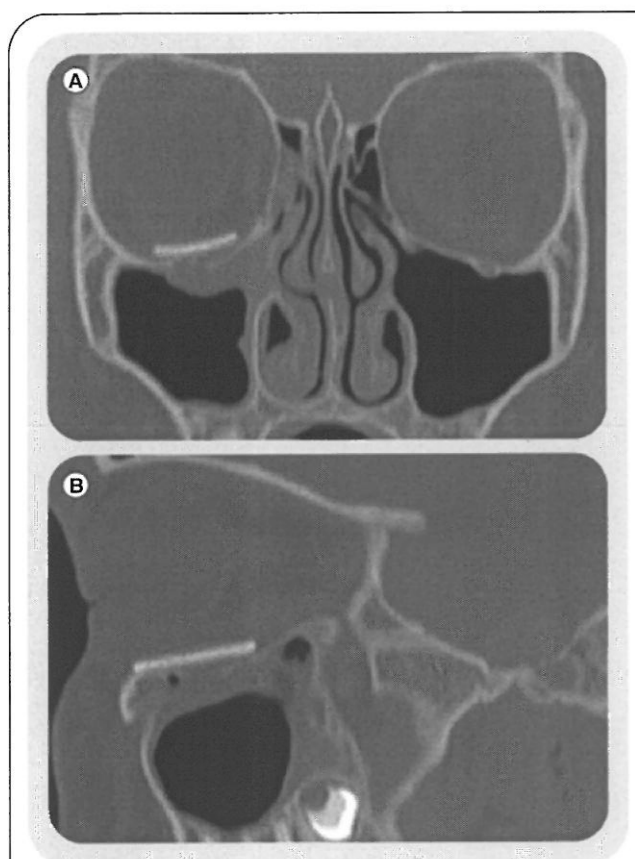


Figure 6. Postoperative CT scan after orbital floor reconstruction with coralline implant in a wide defect. (A) Coronal section; (B) Sagittal section.

Osteosynthesis, orthognathic surgery & skeletal augmentation

Osteosynthesis with nonresorbable devices

Osteosynthesis is very often required in head and neck surgery, either in the case of traumatic bone injuries that have to be fixed or to repair osteotomies that are necessitated for surgical approaches and methods. The three main types of material currently used for osteosynthesis devices are stainless steel, cobalt-chromium alloy (Vitallium®) and titanium. Titanium has become a popular metal for craniofacial use because of its high strength and reduced artifact on both CT scans and MRI studies [39].

Osteosynthesis with resorbable devices

Polyglycolic acid, polylactic acid and their copolymers have been used clinically in the form of sutures for the past 30 years, and as internal fixation devices (i.e., screws or plates) for the last 15 years. These plates, currently used in orthognathic surgery, first degrade by hydrolysis, and are then metabolically converted into water and carbon dioxide. Chronic inflammation with sterile abscesses has been reported by elsewhere [40].

Anti-aging, face & neck aesthetic surgery

Skeletal augmentation

Deficient bones in the face can occur as a result of congenital deficiency, facial trauma but also bone resorption due to the aging process, giving the face a gaunt appearance. The use of biomaterials for skeletal augmentation can be particularly interesting, since autogenous bone can undergo unpredictable resorption, particularly in the reconstruction of the malar eminence and for augmentation of the chin [41]. Small biomaterials can be implanted over the natural bone defects and enhance facial contours. The chin, cheek and jaw are the most frequently implanted areas. These procedures can be performed in conjunction with another cosmetic procedure, such as a facelift. Calcium phosphate bone substitutes can be placed in small periosteum pockets, using the transconjunctival approach for the cheek [42] or along the lower lip for the chin; the materials selected depend on the preferences of the surgeons [43,44]. Some of the preferred materials for facial bone augmentation are polyethylene (i.e., Medpor), polytetrafluoroethylene (Gore-tex™) or composite materials combining polytetrafluoroethylene and aluminum oxide (Proplast™). Manson *et al.* consider methyl methacrylate to be the most suitable material for cranioplasty [45]. HA has been used extensively in craniofacial augmentation in adults as either a cement paste or granules combined with a resorbable carrier (such as fibrin glue to prevent implant migration [43,46]). Porous HA has been used as an onlay graft on spacer materials following facial osteotomies [47]. Biocoral has also been used successfully for cranio-maxillo-facial defect reconstruction in humans, mainly for facial contour augmentation [48]. Silicone implants are used for ear and orbital reconstruction, and nose, zygomatic and chin augmentation. Complications (infection and extrusion) are rare, but can occur after a long postoperative delay (3–47 years after insertion [49]).

Certain biomaterials (e.g., polyethylene, polymethylmethacrylate or silicate-based alloplasts) can be premanufactured from a 3D CT scan by stereolithographic reconstruction. This technique has been used for customized reconstruction of cranial defects in patients when no further skull growth is anticipated [41].



Figure 7. Osteoplasty of an alveolar cleft with hydroxyapatite porous ceramics mixed with platelet-rich plasma and autogenous bone. (A) Preoperative occlusal x-ray; (B) Immediate postoperative view x-ray; (C) X-ray 3 years after surgery. Note the resorption of the hydroxyapatite and tooth eruption beyond the newly formed bone.

Reprinted with the permission of JM Mercier (Nantes University Hospital, France).

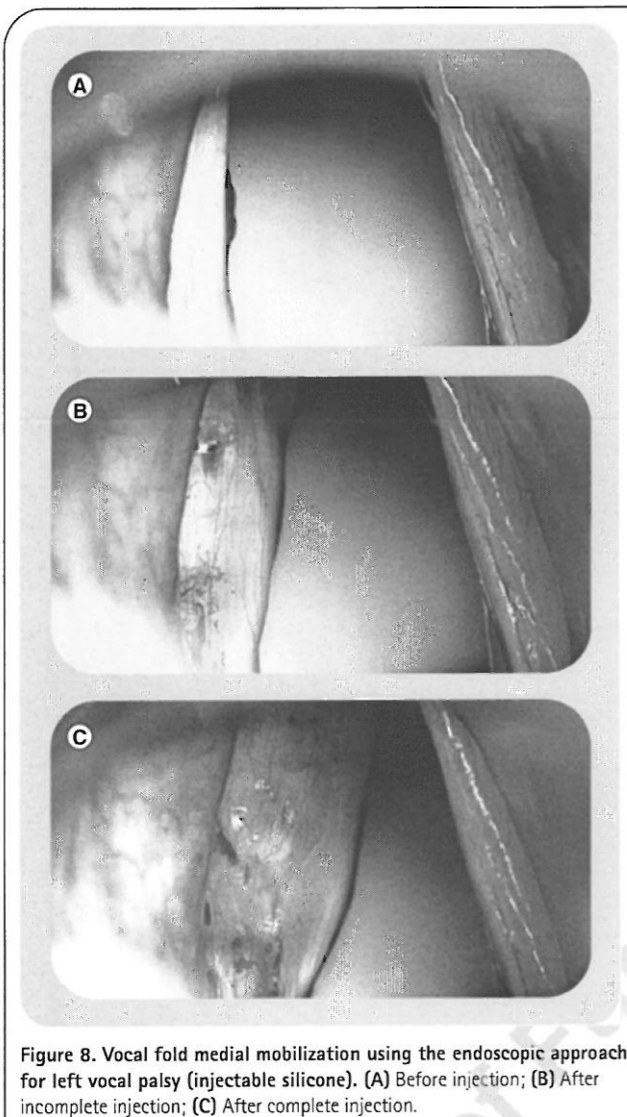


Figure 8. Vocal fold medial mobilization using the endoscopic approach for left vocal palsy (injectable silicone). (A) Before injection; (B) After incomplete injection; (C) After complete injection.

Rhinoplasty

For augmentation rhinoplasty (saddle-nose corrections), different biomaterials have been proposed. Owing to the subcutaneous location of the biomaterials, as well as the risk of insufficient stability, transcutaneous extrusion is higher than with autologous grafts. Thus, until now, autologous materials remained the recommended implants. Costal cartilage, iliac crest or calvaria parietal bone are the most common harvest sites.

Laryngology

Vocal fold adduction

In the case of unilateral inferior laryngeal nerve palsy (as a complication of chest, heart or thyroid surgery), the voice can be compromised, as one of the vocal folds is no longer moving. The voice can be improved if the paralyzed vocal fold can be mobilized in direction of the remaining functional vocal fold. Thus, in laryngology, implanted medical devices are used for interposition between the thyroid cartilage and the

vocal folds. In cases of long-standing recurrent laryngeal nerve palsy, the voice malfunction can be improved by performing a medial mobilization of the paralyzed vocal fold. To reduce air leaks and increase voice intensity, two surgical procedures can be chosen:

- External implantation, where a biomaterial is implanted between the internal lamina of the thyroid cartilage and the thyroarythenoid muscle (e.g., Gore-tex, collagen or teflon fluorocarbon polymer);
- Direct vocal fold implantation by endoscopic injection, making possible real-time visual control of the vocal fold adduction. Injectable silicone implants are safe, and do not have the drawbacks of autologous fat grafts, which are frequently resorbed (FIGURE 8).

Voice prosthesis

Classical voice is compromised after nonconservative laryngectomy, and oesophagus voice re-education can be proposed after procedures where the larynx cannot be conserved for life-threatening tumors. Oesophagus voice generally produces a poor quality of voice, and some patients never acquire it even after long-standing re-education. Voice prosthesis implantation is suitable for those laryngectomized patients. During the oncological surgical treatment of laryngeal cancer, radical laryngectomy can be mandatory. For such patients, speech function after laryngectomy can be restored by creating a tracheoesophageal fistula, followed by implantation of a voice prosthesis (different commercialized speech implants are available, they can be implanted either during the removal of the larynx or at a later stage). Voice prostheses are made of medical-grade silicone (FIGURE 9).

Biomaterials in laryngology are generally not designed for reconstruction of the laryngo-tracheal skeleton. Until now, no study has evaluated the possibilities of laryngeal reconstruction with biomaterials.

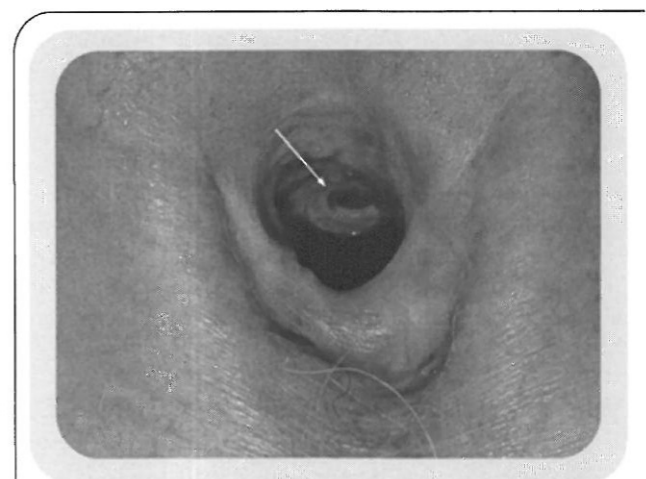


Figure 9. Silicone voice prosthesis (arrow) implanted through a tracheo-oesophageal fistula for speech and voice restoration after laryngectomy for cancer.

Expert commentary

The range of biomaterials used in ENT, face and neck surgery is extensive. The benefits have been demonstrated for each evaluated therapeutic indication and have to be known from surgeons before they can consider a material implantation. The expected life improvement for the patient can be esthetic, functional or critical. In consequence, surgeons have to clearly estimate the risk/benefit ratio related to the indication and the context of treatment they have in mind for the patient. In case of undoubtedly established advantage of tissue or organ replacement, biomaterials have increasingly become the material of choice for substitution: they are safe, have biocompatibility and functional properties and are associated with reduced risks and drawbacks of autologous tissue harvesting. Nevertheless, in some well-known cases, autografts (e.g., bone, cartilage or muscle) must be preferred owing to their greater expected issues. Thus, surgeons have to defer to the conventional and published data of the greatest indications of material implantation or tissue replacement, as he would do with therapeutic drugs. Furthermore, the approval certification (i.e., European CE or FDA) check of the biomaterial before implantation is an absolute requisite before use, and is clearly the job and responsibility of the surgeon.

Five-year view

The considerable experience gained in the field of biomaterials is based on more than 30 years of practice. The treatment possibilities of implanted devices have increased. Research and clinical trials are currently trying to respond to an increasing need for more complex tissue repair. The different courses of research action that we can look forward to include:

- Increasing therapeutic properties of materials (development of drug-delivery systems for bone implantation/substitution);
- Increasing biofunctionality (i.e., materials associated with autologous grafted cells to facilitate tissue differentiation in implanted areas);

- Increasing simplicity of use (e.g., injectable forms of bone substitutes);
- Improving capacities of resorption, in order to reduce the need of repeat surgery and material removal.

Drug-delivery systems

Several studies and animal trials have been conducted to evaluate the possibilities of drug delivery with biomaterials [50,51]. The benefits are mainly expected for bone defect implantations. The first part of the research was to obtain drug adsorption at the surface of the device. The molecules adsorbed on the device must be released after implantation, according to well-defined kinetics. Such drug-delivery systems have been established with calcium phosphate materials for drug liberation in bone. Several different kinds of drugs have been evaluated:

- Antibiotics (aminoside, quinolones and vancomycin) for the treatment of bone infections [50,51];
- Growth factors (e.g., VEGF) for bone defect repair, in particular in the mandible area [52,53].

Cell-material associations & tissue engineering

Hybrid materials (materials associated with cells) are clearly one of the most important research pathways. For years, surgeons in the operating theater have been associating cells, extemporaneously, with materials, such as:

- Total blood cells can be associated with implanted bone devices to provide biological glue effects;
- Bone marrow can be associated with biphasic calcium phosphate in order to increase the osteogenic properties of hypotrophic bone, particularly after radiotherapy (FIGURE 10) [54].

The association of cells with materials can be achieved in a highly sophisticated manner. *Ex vivo* cell cultures can be undertaken before being associated with the material to increase both

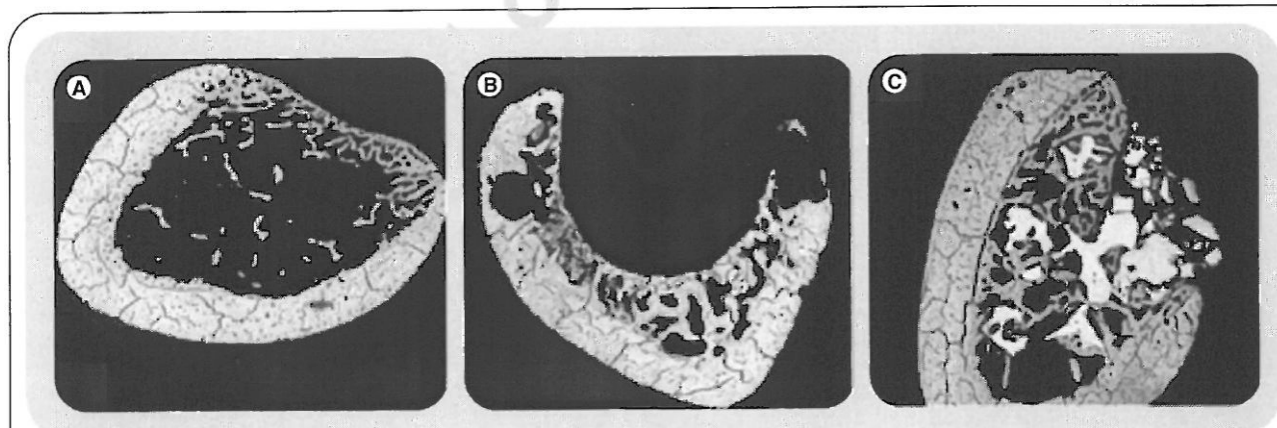


Figure 10. Scanning electron backscattered microscopy of bone experimental defects in rats. (A) Nonimplanted bone defect in normal bone. New-bone formations exist but are limited; (B) Nonimplanted bone defect in previously irradiated bone up to the equivalent of 60 Gy, no newly formed bone can be observed; (C) Bone defect repaired with a bone substitute associating biphasic calcium phosphate granules and bone marrow in previously irradiated bone. After a total of 6 weeks following implantation, the amount of new-bone ingrowth has increased greatly.

cell numbers and differentiation. Thus, premanufactured tissues can be obtained before *in vivo* implantation by means of tissue engineering [55]. The first human trials of mandible reconstruction were published using a porous ceramic model associated with marrow cells [56]. In the future, this kind of tissue engineering could make it possible to replace mandible reconstruction treatments after radiotherapy, which currently require complicated free fibula harvesting.

Minimally invasive surgery for material implantations

One of the greatest advantages of biomaterials is to reduce the morbidity of graft or tissue harvesting. The next stage is to develop materials with varying strength and mechanical properties that will make them moldable and injectable before they can get their definitive form or strength. Thus, one aim of the next few years work will be to reduce the surgical procedure, and allow lower incisions and endoscopic approach for material implantation.

Increase of resorption properties

One of the great expectations of the next few years of industrial development is the supply increase of biomaterials with resorption properties. Primarily for osteosynthesis indications (traumatic or oncologic surgery), the use of resorbable biomaterials is expected. Conversely, resorbable material use for osteosynthesis will allow a diminution of surgical second look and material removal (required for patients who experience a poor tolerance of materials). On the other hand, resorbable materials can reduce long-term side-effects of implanted biomaterials (mainly long-term infections and displacement).

Conclusion

Implanted devices and bone substitutes are used increasingly often in ENT, face and neck surgery. They have the great advantage of reducing the morbidity of autologous harvesting.

The safety of medical devices is overseen by CE approval and the FDA. Both official approvals require strict trials before industrial promotion.

The expected benefits are functional and esthetic in otology, rhinology, face and neck reconstruction. Innovative research has been designed to specify the role of new generations of biomaterials in order to ensure they are safer, less invasive, easier to handle and with increased therapeutic capacities, especially in the field of increased tissue engineering.

Financial disclosure

The authors have no relevant financial interests related to this manuscript, including employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Key issues

- Biomaterial and bone substitute applications have become more important in head and neck surgery in the last 30 years.
- Only biomaterials and autologous bone grafts can be considered today for head and neck implantation. Allografts and xenografts are associated with a double risk: infectious (nonconventional agents) and immunological.
- The indications for biomaterials are generally similar to those of autografts.
- Synthetic material implants have increased because they have made it possible to lower the morbidity induced by autograft harvesting, and secondly thanks to progress in their biocompatibility.
- The expected benefits of biomaterial implantation are esthetic, functional or both.
- Physicians should precisely consider the applications of medical devices and respect the indications. The main indications are in otology, sinus augmentation surgery, cranio-maxillo-facial traumatology, osteosynthesis and orthognathic surgery, skeletal augmentation and anti-aging surgery, facial prosthetic rehabilitation and laryngology.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Pasquier G, Hardouin I, Fontaine C, Migaud H, Duquenois A. Different methods of bone filling in orthopedic surgery. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* 59(12), 821–828 (1992).
- 2 Ollier LL. Des moyens chirurgicaux de favoriser la reproduction des os après les résections. *Gazette hebdomadaire de médecine et de chirurgie* 5, 899–905 (1858).
- 3 Glicenstein J. History of bone reconstruction. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 45(3), 171–174 (2000).
- 4 Meylan P, Duscher A, Mudry A, Monnier P. Risk of human immunodeficiency virus infection during tympano-ossicular homograft: an experimental study. *Laryngoscope* 106, 334–337 (1996).
- 5 Coelho MJ, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials* 21(11), 1087–1094 (2000).
- Comprehensive study of osteoblastic differentiation of cultured human bone cells.
- 6 De Groot K. Bioceramics of calcium phosphates preparations and properties. In: *Bioceramics of Calcium Phosphates*. De Groot K (Ed.). CRC Press, FL, USA 99–114 (1983).
- 7 Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 23(8), 883–894 (1989).
- 8 Demers C, Hamdy CR, Corsi K *et al.* Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed. Mater. Eng.* 12(1), 15–35 (2002).
- 9 Blumberg S. Is coral calcium a safe and effective supplement? *J. Am. Diet. Assoc.* 104(9), 1335–1336 (2004).
- 10 Marchac D, Sandor G. Use of coral granules in the craniofacial skeleton. *J. Craniofac. Surg.* 5(4), 213–217 (1994).

- 11 Sartori S, Silvestri M, Forni F *et al*. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin. Oral Implants Res.* 14(3), 369–372 (2003).
- 12 Orsini G, Traini T, Scarano A *et al*. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 74(1), 448–457 (2005).
- 13 Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14, 195–200 (2003).
- Place of biphasic calcium phosphate in bone substitution.
- 14 Treace HT. Biomaterials in ossiculoplasty and history of development of prostheses for ossiculoplasty. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 27(4), 655–662 (1994).
- Key paper of biomaterials development for ossicle replacement.
- 15 Rondini-Gilli E, Grayeli AB, Borges Crosara PF *et al*. Ossiculoplasty with total hydroxylapatite prostheses anatomical and functional outcomes. *Otol. Neurotol.* 24(4), 543–547 (2003).
- 16 Malard O, Daculsi G, Toquet J *et al*. Autografts versus biomaterials for ossiculoplasty with normal stapes; a comparative analysis of functional outcome in 100 cases. *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* 118(4), 225–231 (2001).
- 17 Yung MW. The use of hydroxyapatite granules in mastoid obliteration. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 21(6), 480–484 (1996).
- 18 Bagot D'Arc M, Daculsi G. Micro macroporous biphasic ceramics and fibrin sealant as a moldable material for bone reconstruction in chronic otitis media surgery. A 15 years experience. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14(3), 229–233 (2003).
- 19 Estrem SA, Highfill G. Hydroxyapatite canal wall reconstruction/mastoid obliteration. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120(3), 345–349 (1999).
- Reflects on ear bone canal reconstruction.
- 20 Stenfelt S. Bilateral fitting of BAHAs and BAHAs fitted in unilateral deaf persons: acoustical aspects. *Int. J. Audiol.* 44(3), 178–189 (2005).
- 21 Wolfaardt J, Gehl G, Farmand M, Wilkes G. Indications and methods of care for aspects of extraoral osseointegration. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 32(2), 124–131 (2003).
- Medical features regarding bone-anchored implants for prosthetic reconstruction.
- 22 Lemon JC, Kiat-amnuay S, Gittleman L, Martin JW, Chambers MS. Facial prosthetic rehabilitation: preprosthetic surgical techniques and biomaterials. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 13(4), 255–262 (2005).
- 23 Horch HH, Sader R, Pautke C *et al*. Synthetic, pure-phase β -tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35(8), 708–713 (2006).
- 24 Scarano A, Degidi M, Iezzi G *et al*. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant. Dent.* 15(2), 197–207 (2006).
- 25 Snyderman CH, Scioscia K, Carrau RL, Weissman JL. Hydroxyapatite: an alternative method of frontal sinus obliteration. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 34(1), 179–191 (2001).
- 26 Petruzzelli GJ, Stankiewicz JA. Frontal sinus obliteration with hydroxyapatite cement. *Laryngoscope* 112(1), 32–36 (2002).
- 27 Murphy J, Jones NS. Frontal sinus obliteration. *J. Laryngol. Otol.* 118(8), 637–639 (2004).
- 28 Ross DA, Marentette LJ, Thompson BG, Haller JS. Use of hydroxyapatite bone cement to prevent cerebrospinal fluid leakage through the frontal sinus: technical report. *Neurosurgery* 45(2), 401–403 (1999).
- 29 Peltola M, Aitasalo K, Suonpaa J, Varpula M, Yli-Urpo A. Bioactive glass S53P4 in frontal sinus obliteration: a long-term clinical experience. *Head Neck* 28(9), 834–841 (2006).
- 30 Mercier J, Piot B, Gueguen P *et al*. The coral orbital floor. Its value in traumatology. The results of a multicenter study of 83 cases. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* 97(6), 324–331 (1996).
- 31 Rinna C, Ungari C, Saltarel A, Cassoni A, Reale G. Orbital floor restoration. *J. Craniofac. Surg.* 16(6), 968–972 (2005).
- Material need for orbital floor reconstruction.
- 32 Nam SB, Bae YC, Moon JS, Kang YS. Analysis of the postoperative outcome in 405 cases of orbital fracture using 2 synthetic orbital implants. *Ann. Plast. Surg.* 56(3), 263–267 (2006).
- 33 Paoli JR, Dodart L, Boutault F, Lauwers F, Fabie M. Reconstruction of the orbit floor using a resorbable polydioxanone (PDS degree) cup. Analysis of a series of 71 cases. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* 96(2), 113–116 (1995).
- 34 Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res.* 43(4), 428–432 (1998).
- 35 Costantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S, Moche J. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast. Surg.* 18(1), 13–26 (2002).
- 36 Horswell BB, Henderson JM. Secondary osteoplasty of the alveolar cleft defect. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 61(9), 1082–1090 (2003).
- 37 Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35(6), 551–555 (2006).
- 38 Carstens MH, Chin M, Ng T, Tom WK. Reconstruction of 7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. *J. Craniofac. Surg.* 16(6), 1023–1032 (2005).
- 39 Rubin JP, Yaremchuk MJ. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plast. Reconstr. Surg.* 100(5), 1336–1353 (1997).
- Synthesis of the complication outcomes regarding the use of biomaterials in aesthetic surgery.
- 40 Norholt SE, Pedersen TK, Jensen J, Le Fort I. miniplate osteosynthesis: a randomized, prospective study comparing resorbable PLLA/PGA with titanium. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33(3), 245–252 (2004).
- 41 Gosain AK. Biomaterials for reconstruction of the cranial vault. *Plast. Reconstr. Surg.* 116(2), 663–666 (2005).
- 42 O'Hara KL, Urrego AF, Garri JI *et al*. Improved malar projection with transconjunctival hydroxyapatite granules. *Plast. Reconstr. Surg.* 117(6), 1956–1963 (2006).
- 43 Gosain AK, Persing JA. Biomaterials in the face: benefits and risks. *J. Craniofac. Surg.* 10(5), 404–414 (1999).
- 44 Carboni A, Gasparini G, Perugini M *et al*. Evaluation of homologous bone graft versus biomaterials in the aesthetic restoration of the middle third of the face. *Minerva Chir.* 57(3), 283–287 (2002).
- 45 Manson PN, Crawley WA, Hoopes JE. Frontal cranioplasty: risk factors and choice of cranial vault reconstructive material. *Plast. Reconstr. Surg.* 77(6), 888–904 (1986).
- 46 Fortunato G, Marini E, Valdinucci F, Bonucci E. Long-term results of hydroxyapatite-fibrin glue implantation in plastic and reconstructive craniofacial surgery. *J. Craniofac. Surg.* 25(3), 124–135 (1997).

- 47 Salyer KE: *Orthomorph Surgery: Aesthetic Craniofacial Surgery*. JB Lippincott, PA, USA (1990).
 - 48 Roux FX, Brasnu D, Loty B, George B, Guillemin G. Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery. *J. Neurosurg.* 69(4), 510–513 (1988).
 - 49 Hoffman S. Loss of a silastic chin implant following a dental infection. *Ann. Plast. Surg.* 7(6), 484–486 (1981).
 - 50 Koort JK, Suokas E, Veiranto M *et al.* *In vitro* and *in vivo* testing of bioabsorbable antibiotic containing bone filler for osteomyelitis treatment. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 78(3), 532–540 (2006).
 - 51 Joosten U, Joist A, Gosheger G *et al.* Effectiveness of hydroxyapatite–vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 26(25), 5251–5258 (2005).
 - 52 Paul W, Sharma CP. Ceramic drug delivery: a perspective. *J. Biomater. Appl.* 17(4), 253–264 (2003).
 - Comprehensive review of perspectives in drug delivery.
 - 53 Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann HP. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 63(9), 1310–1316 (2005).
 - 54 Malard O, Guicheux J, Boulter JM *et al.* Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 36(2), 323–330 (2005).
 - Demonstrates the osteoinductive properties of biphasic calcium phosphate and bone marrow association in irradiated bone.
 - 55 Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J *et al.* Osteogenic potential *in vitro* of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.* 44(1), 98–108 (1999).
 - Assessment of positive association of calcium phosphate ceramic and bone marrow cells.
 - 56 Gronthos S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet.* 364(9436), 735–736 (2004).
 - First human study of mandible reconstruction by complete tissue engineering.
- Affiliations**
- Olivier Malard, MD, PhD
Professor of Otorhinolaryngology, Department of ENT and Face & Neck Surgery, and INSERM, U 791, LIOAD, Laboratory for Osteo-articular and Dental Tissue Engineering, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 083 475
Fax: +33 240 083 477
omalard@chu-nantes.fr
 - Florent Espitalier
PhD student, Department of ENT and Face & Neck Surgery, and INSERM, U 791, LIOAD, Laboratory for Osteo-articular and Dental Tissue Engineering, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 083 475
Fax: +33 240 083 477
florent.espitalier@wanadoo.fr
 - Philippe Bordure, MD
Professor of Otorhinolaryngology, Department of ENT and Face & Neck Surgery, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 083 475
Fax: +33 240 083 477
pbordure@chu-nantes.fr
 - Guy Daculsi, PhD
Director of research, INSERM, U 791, LIOAD, Laboratory for Osteo-articular and Dental Tissue Engineering, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 412 916
Fax: +33 240 083 712
guy.daculsi@univ-nantes.fr
 - Pierre Weiss, Odontologist Dr. MD, PhD
Director, INSERM, U 791, LIOAD, Laboratory for Osteo-articular and Dental Tissue Engineering, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 412 916
Fax: +33 240 083 712
pweiss@sante.univ-nantes.fr
 - Pierre Corre, MD
Fellowship and PhD student, Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, INSERM, U 791, LIOAD, Laboratory for Osteo-articular and Dental Tissue Engineering, Nantes University Hospital - 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France
Tel.: +33 240 083 679
Fax: +33 240 083 331
pierrecorre@hotmail.com

III.2. Phosphate de calcium biphasé (BCP)

Dans les différentes études précliniques réalisées chez le rat présentées dans ce travail, le même type de biomatériau a été utilisé. Il s'agissait d'un phosphate de calcium biphasé macroporeux commercialisé (MBCP™) sous forme de granules par la société Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France).

Des blocs de céramiques composés d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate tricalcique β (β -TCP) ont été obtenus par compaction/frittage d'une apatite déficiente en calcium mélangée à un composé porogène (billes de naphthalène). Le broyage de ces blocs a permis d'obtenir des granules qui ont été tamisés mécaniquement pendant 10 minutes pour extraire leur fraction de 0,5-1 mm. Les granulations fines inférieures à 20 μm n'ont pas été retenues, compte tenu du faible rendement du tamisage.

L'analyse par diffraction des rayons X a montré un rapport HA/ β -TCP de 60/40, correspondant à un rapport Ca/P de 1,60. Une analyse complémentaire par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier confirmait l'aspect biphasique du phosphate de calcium et l'absence d'autre carbonate détectable.

La microscopie à balayage couplée à l'analyse d'image semi-automatisée a permis de mesurer une macroporosité moyenne de $40 \pm 10,3\%$ et un diamètre équivalent moyen des granules de $781 \pm 146,8 \mu\text{m}$.

Le choix de conserver le même type de biomatériau dans les différentes études était volontaire afin de permettre une meilleure interprétabilité des résultats entre les différentes études.

III.3. Ingénierie tissulaire osseuse

L'ingénierie tissulaire osseuse est définie par l'ajout de cellules ostéoprogénitrices et/ou de facteurs de croissance osseuse à un biomatériau. Le but de l'ingénierie tissulaire osseuse est de fournir des solutions pour les retards de cicatrisation de fractures et la régénération osseuse (153).

III.3.1. Les cellules souches

Les cellules souches ont des capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation multiple. On en rencontre à différents stades de développement du corps humain. Les cellules souches embryonnaires, dérivées du blastocyste, sont pluripotentes et présentent aujourd'hui le potentiel de différenciation le plus vaste (154). Leur utilisation thérapeutique est cependant freinée par des questions éthiques mais aussi par le problème d'immunocompétence entre donneur et receveur, ainsi que par le mauvais contrôle de leur différenciation et leur potentiel tumorigène (154). A un stade de développement plus tardif, les cellules souches postnatales sont multipotentes et présentes dans différents tissus (moelle osseuse, tissu nerveux, peau, muscle, œil, intestin, foie, tissu adipeux). Parmi les cellules souches postnatales, les cellules souches mésenchymateuses ont la capacité de se différencier en cellules mésodermiques : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et myocytes (figure 20). Outre leur potentiel de différenciation, les CSM possèdent d'autres propriétés. Elles ont la capacité de sécréter des macromolécules, ce qui leur confère une activité trophique par effet paracrine (155). Leur sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, VEGF, G-CSF...) leur confèrent un rôle dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (156). Il a par ailleurs été montré que les CSM possédaient la capacité de se différencier en cellules endothéliales notamment en présence VEGF (157,158). Les CSM possèdent également des effets immunomodulateurs par inhibition de la

reconnaissance des lymphocytes T, inhibition de la production de $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{INF-}\gamma$ et augmentation de la production d'IL-10 (155). Cette immunomodulation a permis d'avancer le fait que les CSM n'étaient pas immunogènes (159,160) et qu'elles pouvaient être utilisées comme agents thérapeutiques en allogreffe. Toutefois, des rejets de greffes de CSM allogéniques ont été décrits (156). Enfin, les CSM jouent un rôle anti-apoptotique également lié à leur activité paracrine. Il a été montré que la production de VEGF par les CSM en territoire ischémié permettait d'inverser le processus apoptotique des cellules endothéliales (161).

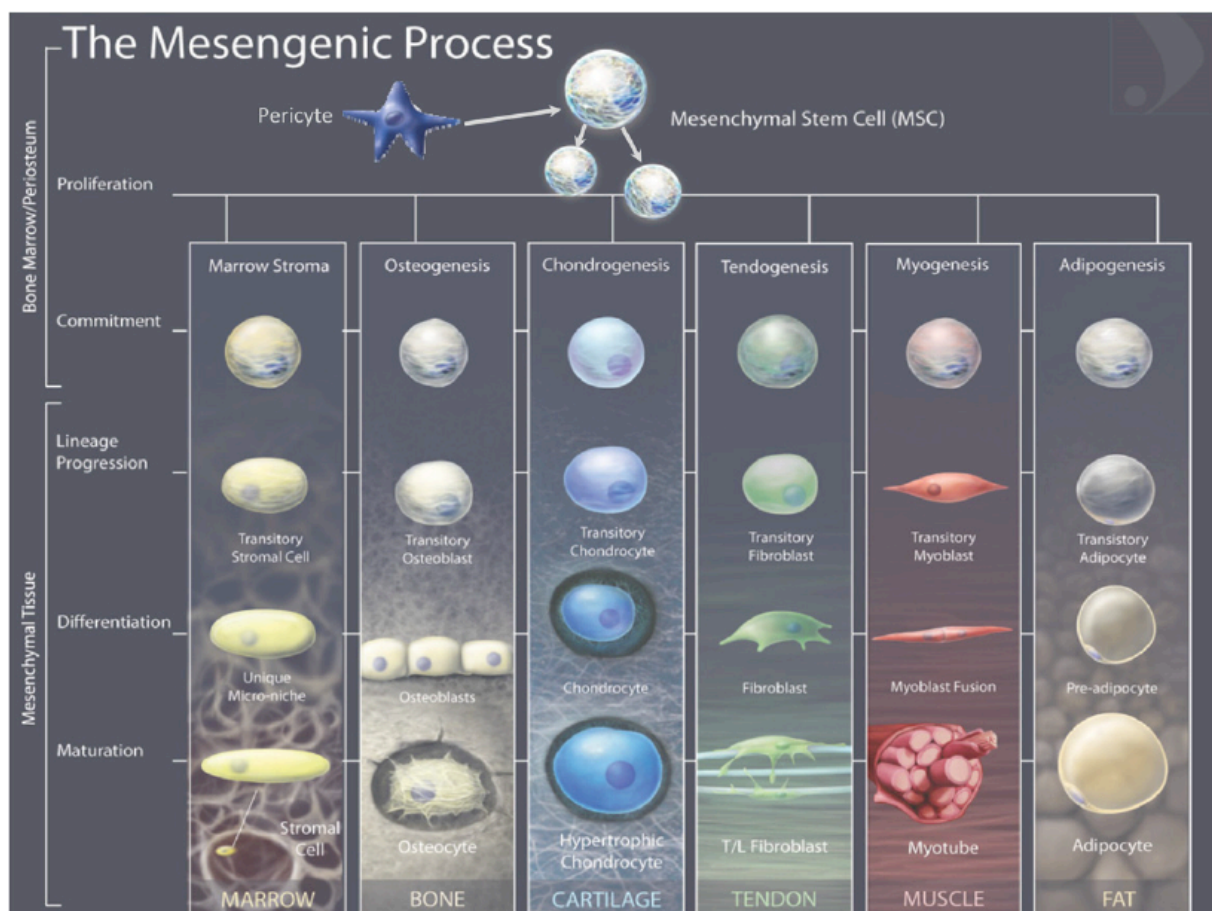


Figure 20. Capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Caplan 2011)

Les CSM sont présentes au sein de différents organes, dénommés niches. La moelle osseuse a été le premier site d'identification de CSM chez l'homme (162). D'autres organes, comme le tissu adipeux, ont été plus récemment investis comme source

potentielle de CSM. Il semble que la plupart des CSM aient une origine périvasculaire (156), avec notamment une relation linéaire entre la quantité de CSM et de vaisseaux sanguins au sein du tissu adipeux (163). Ces cellules souches périvasculaires, appelées péricytes, semblent être la source de la plupart des CSM (156).

La moelle osseuse contient trois types de cellules souches en très faible quantité. D'une part les cellules souches hématopoïétiques desquelles dérivent l'ensemble des cellules sanguines et les ostéoclastes, et d'autre part les cellules souches mésenchymateuses desquelles dérivent les ostéoblastes et chondroblastes, les adipocytes et les cellules stromales médullaires qui assurent le soutien de l'hématopoïèse (162). Une dernière type cellulaire plus rare, les Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs), précéderait les CSM et les cellules souches hématopoïétiques, et serait pluripotent (164).

Le potentiel de différenciation ostéogénique des CSM *in vitro* est connu depuis plus de 20 ans (165). Les CSM ont été facilement isolées de la moelle osseuse grâce à leur capacité d'adhérence au plastique de la boîte de culture. De plus, grâce à leur capacité d'expansion *in vitro*, elle représentent une source de cellules mésenchymateuses multipotentes pour l'ingénierie tissulaire. Sur un plan phénotypique, les CSM expriment différents marqueurs antigéniques de surface, sans spécificité (166). Il est admis que les CSM n'expriment ni les antigènes CD34 et CD45 (spécifiques des cellules d'origine hématopoïétique), ni les glycophorines (spécifiques des hématies), ni les antigènes de différenciation des différentes populations leucocytaires (CD14, CD33, CD3, CD19). En revanche, elles portent à leur surface les antigènes Stro-1, CD146, CD44, CD73, CD105 et CD90 (156,167,168). En 2006, l'*International Society for Cellular Therapy* a établi un minimum de critères pour définir les CSM : adhérence au plastique, différenciation dans 3 lignées (os, cartilage, tissu adipeux), phénotype positif pour CD105, CD73, CD90, et négatif pour CD45, CD34, CD11b, CD14, CD79a et HLA-DR (169). Cependant ces critères

sont basés sur la caractérisation *in vitro* des cellules, et ne s'applique pas complètement à leur phénotype natif *in vivo* (156). De plus, outre l'absence d'un marqueur spécifique des CSM, d'autres cellules ont une capacité d'adhérence au plastique (progéniteurs de cellules B, précurseurs granulocytaires et monocytaires) (170).

Plus récemment, le tissu adipeux a été envisagé comme nouvelle source de CSM, devant la quantité plus importante de tissu disponible, mais également par la relative facilité de son prélèvement, ne nécessitant qu'une anesthésie locale là où le prélèvement de la moelle osseuse nécessite une anesthésie générale ou rachidienne, avec une morbidité associée non négligeable au site de prélèvement. De plus, les CSM sont 500 fois plus nombreuses au sein du tissu adipeux (171), ne représentant qu'une cellule nucléée sur 100 000 dans la moelle osseuse (167). Les CSM issues du tissu adipeux (CSMTA) ont des potentialités au moins équivalentes aux CSM issues de la moelle osseuse (CSMMO) aussi bien sur le plan de la multipotentialité que sur le plan du pouvoir immunomodulateur (172,173). De plus, leur potentiel de différenciation ostéogénique est proche de celui des CSMMO (174). Avec l'âge, le nombre de CSMMO diminue, mais leur potentiel ostéogénique reste stable, comme celui des CSMTA (175,176) (figure 21). Le phénotype des CSMTA est en partie différent de celui des CSMMO puisque 60% des CSM issues d'une lipoaspiration expriment l'antigène CD34 (177). Toutefois, après chaque passage *in vitro*, l'expression du CD34 diminue.

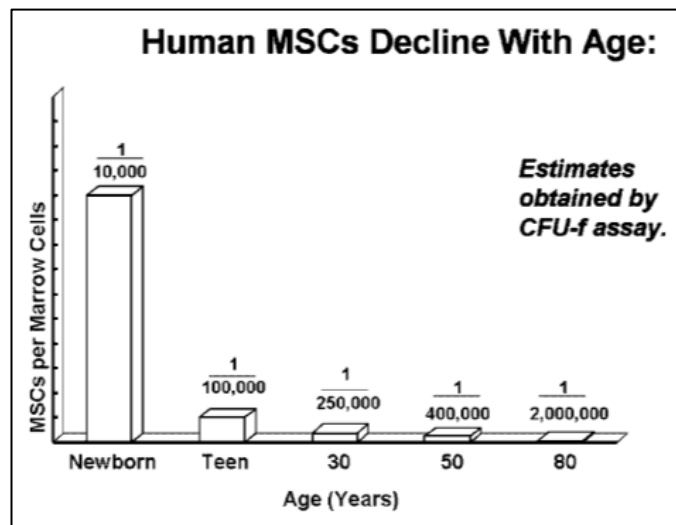


Figure 71. Diminution du nombre de cellules mésenchymateuses dans la moelle osseuse avec l'âge (Caplan 2007)

Au total, les CSM ont des capacités de différenciation multiples, et possèdent également une activité trophique qui leur permet de sécréter des facteurs bioactifs qui peuvent inhiber l'apoptose et la réponse immunitaire, et stimuler l'angiogenèse et la mitose des cellules progénitrices de l'organe à réparer (155,178) (figure 22).

L'utilisation des cellules souches lors d'une réparation osseuse est proposée depuis plusieurs années dans le cadre d'études précliniques, mais aussi chez l'homme de manière expérimentale. Toutefois, en raison de la difficulté de culture de ces cellules en dehors du bloc opératoire, du coût engendré et du manque de données sur les quantités nécessaires de cellules à implanter, aucune application clinique en pratique courante n'a vu le jour.

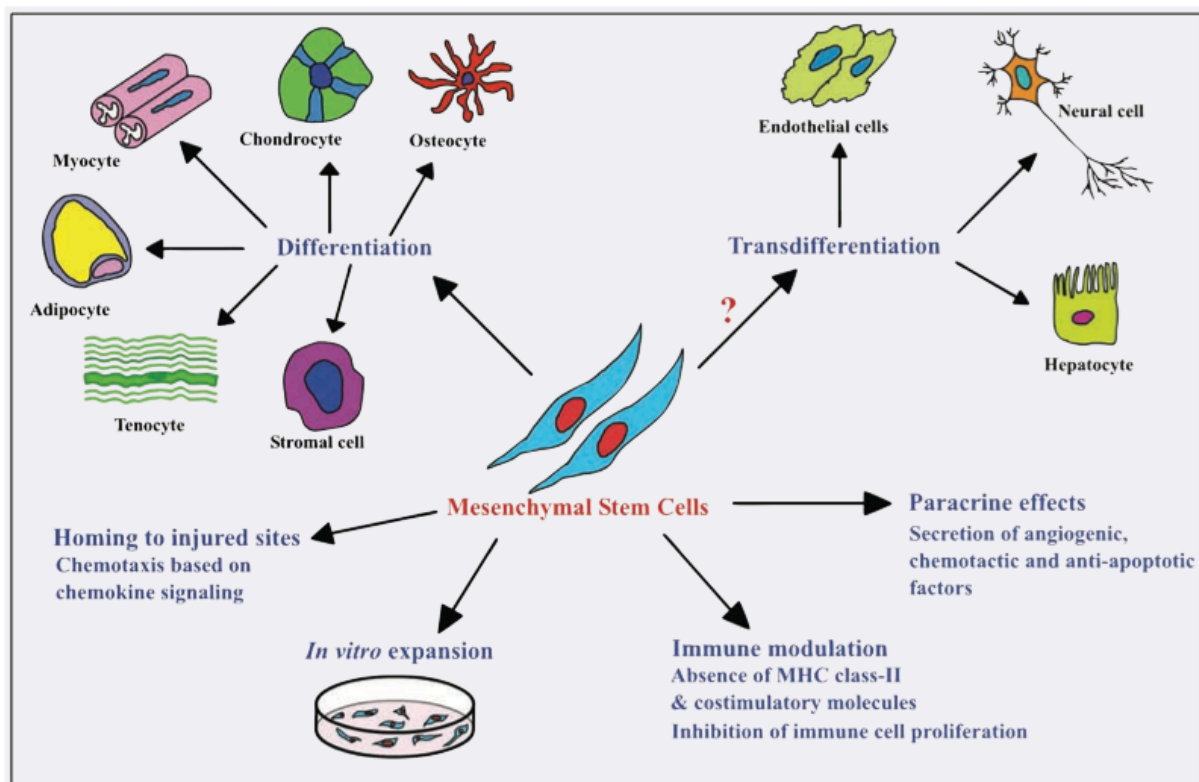


Figure 82. Propriétés des cellules souches mésenchymateuses

Les premières études précliniques qui ont implantées des CSM associées à des biomatériaux ont été publiées à partir de la fin des années 1980. Elles montraient le plus souvent une formation osseuse supérieure au biomatériau seul (179,180), ou à l'association biomatériau-moelle osseuse (181-184).

Le premier rapport de l'utilisation de CSM associées à un bloc d'hydroxyapatite au sein de pertes de substance osseuses segmentaires en clinique date de 2001 (185). Les 3 patients opérés présentaient des défauts cicatrisés après 6 à 7 ans (186), avec persistance du biomatériau non résorbé.

L'étape suivante a consisté à cultiver les CSM directement sur le biomatériau au sein d'un bioréacteur, avant de l'implanter au sein de la perte osseuse. Les résultats obtenus en clinique étaient contrastés (187,188). Les bioréacteurs *in vitro* ne permettant que la croissance de petites pièces de tissu, la vascularisation demeurait une des principales limites. D'autre part, sur le plan pratique, la nécessité de plusieurs temps opératoires

n'est pas un argument en faveur de cette technique. Il faut tout d'abord prélever les CSM, les sortir du bloc opératoire afin de les cultiver *in vitro*, puis les réintroduire après multiplication et éventuelle culture sur le biomatériau. Afin d'enlever cette étape de multiplication cellulaire en dehors du bloc opératoire, l'utilisation du patient comme son propre bioréacteur a été proposée.

Après plusieurs études chez le cochon nain (189,190), une reconstruction d'un défaut mandibulaire de 7 cm a été réalisée chez l'homme, 8 ans après le traitement d'un cancer du plancher buccal traité par chirurgie et radiothérapie. Un grillage de titane rempli de blocs de bioOss (os spongieux d'origine porcine stérilisé aux rayons γ), associé à de la moelle osseuse et de la BMP-7 recombinante humaine a été implanté au sein du muscle grand dorsal pour permettre une vascularisation à partir des vaisseaux musculaires. Quatre semaines plus tard, une scintigraphie au technetium-99m et un scanner thoracique révélaient la présence d'une ostéoinduction au sein du biomatériau. Après 7 semaines, l'assemblage a été transféré au niveau de la perte osseuse mandibulaire, avec une anastomose des vaisseaux thoraco-dorsaux sur les vaisseaux cervicaux. Le résultat a montré une augmentation de la densité osseuse, avec une néoformation osseuse au sein du biomatériau, permettant au patient de recouvrer une mastication efficace. Cependant, une fracture et une infection se sont développées, avec défaut de recouvrement muqueux et nécessité de reprises chirurgicales. Le patient est décédé 15 mois après l'implantation d'une crise cardiaque (191,192).

Outre la nécessité de plusieurs temps opératoires, l'utilisation directe des CSM se heurte à un autre problème : leurs effets immunomodulateurs et leur capacité à maintenir la survie et la croissances des cellules stromales nécessite de la prudence dans leur utilisation chez des patients traités pour des tumeurs cancéreuses (193).

III.3.2. La moelle osseuse

La moelle osseuse contient de nombreuses cellules, dont les cellules circulantes, et trois types de cellules souches, dont les CSM et les cellules souches hématopoïétiques. Cette moelle peut être associée directement à des biomatériaux afin de réparer une perte de substance osseuse.

L'utilisation de la moelle osseuse en association à un biomatériau pour la reconstruction osseuse est « l'ancêtre » de l'ingénierie tissulaire osseuse. Après son utilisation chez l'animal (194), différentes études cliniques chez l'homme ont montré des résultats comparables entre l'association de moelle osseuse à une matrice osseuse et une autogreffe osseuse, technique de référence pour la réparation de pertes importantes de substance osseuse (195).

La faible quantité de cellules ostéoprogénitrices (1/100 000 cellules nucléées) au sein de la moelle osseuse a rendu son utilisation plus critique. Afin d'augmenter le nombre de CSM implantées, certains auteurs ont proposé un système de concentration de moelle par centrifugation. Cette centrifugation permet d'obtenir 3 à 6 fois plus de CSM (196) et ainsi d'augmenter la quantité de CSM implantées dans un même volume. Ce concentré de moelle osseuse a surtout été utilisé lors d'études cliniques en injection pour traiter les retard de cicatrisation de fracture ou lors de la réalisation d'arthrodèses rachidiennes (197,198). Une étude a associé ce concentré de moelle à une matrice collagénique dans différents types de pertes de substance osseuse, montrant une cicatrisation osseuse dans 7 cas sur 10 (199). Cependant, malgré des résultats précurseurs cliniques favorables, des études plus approfondies sont nécessaires afin d'étendre cette technique en pratique courante. Toutefois, un des intérêts de cette technique réside dans la possibilité de réaliser l'ensemble de la manipulation dans le bloc opératoire pendant l'intervention, comme dans le cas de l'utilisation de la moelle

osseuse. Pour le moment, l'ANSM ne permet pas l'utilisation de la moelle osseuse concentrée, en rapport avec le risque infectieux potentiel lié aux manipulations.

III.3.3. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance osseuse de type BMP ont été associées aux biomatériaux et aux cellules souches afin d'augmenter la formation osseuse. Les BMP ont été isolés par Urist en 1965, lorsqu'il a montré que des extraits de matrice extracellulaire osseuse soluble pouvaient stimuler la formation osseuse après injection chez des rongeurs (200). Parmi les BMP, Les BMP-2 et BMP-4 sont de puissants inducteurs de la différenciation ostéoblastique (201). Des modèles précliniques ont montré la capacité des BMP à stimuler la formation osseuse et l'angiogenèse (202,203). L'utilisation de la BMP-2 et de la BMP-7 recombinantes humaines sont maintenant validés en pratique clinique comme traitement adjuvant des retards de consolidation de fractures et de l'arthrodèse rachidienne lombaire (204). Une nouvelle approche consistant à utiliser des CSM associées à des BMP est en cours d'exploration dans la prévention des retard de consolidation de fracture (205). Toutefois, une revue Cochrane de 2010 mettait en avant le manque de données cliniques solides pour l'utilisation des BMP dans la consolidation des fractures (206). De plus, l'augmentation supposée d'effets secondaires et de complications et le coût économique de ces facteurs humains recombinants en font limiter l'utilisation (207). Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire d'obtenir plus de données d'études menées en double-aveugle contre placebo avant d'utiliser à grande échelle les BMP dans la réparation osseuse (208).

IV. RECONSTRUCTION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE

Comme nous l'avons vu dans une première partie, l'os irradié, par ses modifications cellulaires et vasculaires, est un tissu dont la cicatrisation est particulièrement altérée. La création d'une perte de substance osseuse en territoire irradié pour observer et favoriser la repousse osseuse n'a été réalisée que par peu d'équipes ; cette thématique originale est développée au LIOAD depuis plus de 10 ans. Les premiers travaux ont montré la nécessité d'associer une greffe de moelle osseuse au BCP pour favoriser cette repousse (8,9). Le BCP seul n'était pas ostéoinducteur, à l'inverse de ce qui est observé en territoire non irradié.

Les études cliniques portant sur la reconstruction de mandibule après traitement de cancer des VADS par chirurgie et radiothérapie concernent essentiellement l'autogreffe de péroné microanastomosé. Quelques rares cas ont été rapportés utilisant des biomatériaux, des cellules souches ou des facteurs de croissance. L'étude de Sweeny et al. en 2012 a associé du BMP-2 à 8 lambeaux libres pour la reconstruction mandibulaire après ostéoradionécrose. Cette étude ne montrait pas de différence significative en termes de complications et de résultats fonctionnels entre le groupe ayant reçu la BMP et celui ne l'ayant pas reçu (209). Warnke et al. en 2004 ont reconstruit un défaut segmentaire mandibulaire en territoire irradié, en associant une grille de titane remplie de blocs de bioOss associés à de la BMP-7, implantée en nourrice dans le muscle grand dorsal droit, transférée en site osseux 7 semaines plus tard avec microanastomose vasculaire, créant ainsi un lambeau composite vascularisé. Le résultat a montré une augmentation de la densité osseuse, avec une néoformation osseuse au sein du biomatériau, avec un recul de 15 mois. Une fracture entre l'os et le biomatériau a toutefois été observée dans les suites opératoires (192). Un cas unique a été rapporté en 2010 par Mendonça et Juiz-Lopez d'utilisation d'un biomatériau phosphocalcique associé à des cellules souches issues de la moelle osseuse pour la réparation d'une

fracture mandibulaire survenue en territoire irradié (cancer de l'amygdale). Après 20 mois de recul, la consolidation semblait acquise, avec réalisation d'un implant dentaire au sein de la zone réparée (210). Ces cas rapportés sont des cas isolés et ne permettent pas de tirer de conclusion sur l'utilisation de l'ingénierie tissulaire osseuse en territoire irradié chez l'homme.

Les études chez l'animal sont plus nombreuses pour la reconstruction osseuse en territoire irradié, mais elles souffrent d'une comparabilité difficile devant la multiplication des modèles animaux et les différents types d'irradiations proposés, tant en qualité qu'en quantité.

Les travaux utilisant les BMP pour la réparation osseuse en territoire irradié ont montré des résultats variables. La diminution de la réponse des CSM irradiées à la BMP-2 a été montrée *in vivo* (211). Toutefois, les travaux précliniques de Howard et al. en 1998 montraient des résultats encourageants. Sur des museaux de lapins irradiés ou non à 20 Gy, des défauts osseux de 5 mm de diamètre étaient comblés par des disques d'hydroxyapatite, associés ou non à de la BMP-2. Les résultats étaient en faveur d'une augmentation de la néoformation osseuse en présence de BMP-2 à 20 semaines, comparable avec ou sans irradiation (212).

Par ailleurs, les travaux de Würzler et al. en 1998 montraient une augmentation significative de la néoformation osseuse au sein de défauts de 3 mm de calottes crâniennes de rats irradiées à 12 Gy, reconstruites par du collagène de type I associé à de la BMP-2, mais la cicatrisation était incomplète (213). Khouri et al. ont montré que des défauts de rat de 7 mm ne pouvaient être qu'incomplètement cicatrisés par l'apport de BMP-3 après une irradiation de 15 Gy (214).

L'utilisation du VEGF en association à un polymère (PLGA) a permis une augmentation significative du nombre de vaisseaux sanguins et de la repousse osseuse au sein de

défauts de calvaria irradiée de 3,5 mm chez le rat. Le VEGF joue un rôle dans la néovascularisation mais aussi directement sur les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoclastes.

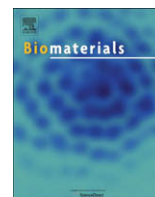
L'utilisation de la thérapie génique a permis de transférer le gène de la BMP-7 à des fibroblastes dermiques. Ces fibroblastes associés à une éponge de silicone (Gelfoam) ont été utilisés pour favoriser la cicatrisation de défauts de taille critique de la calvaria chez le rat. Les résultats montraient la présence d'une néoformation osseuse, mais sous forme d'îlots en territoire irradié, alors que l'os était confluent en l'absence d'irradiation (215).

Malgré les résultats observés avec les BMP en territoire irradié, l'utilisation des BMP comme du VEGF dans les suites d'un traitement de cancer des VADS reste controversée, certaines études ayant montré un rôle de la BMP-2 sur la croissance et l'agressivité tumorale (216,217). Une étude récente a montré que les tumeurs exprimant la BMP-2 à un haut niveau avaient un taux de récurrence locale plus important (218). La société Medtronic qui commercialise la BMP-2 (INFUSE Bone graft) contre-indique son utilisation chez tout patient présentant une tumeur maligne active ou des antécédents de tumeur maligne à la proximité de la chirurgie (219).

Xu et al. ont montré la possibilité de création d'un modèle d'ostéoradionécrose chez le gros animal, le cochon nain. Deux mois après l'irradiation, une extraction dentaire en zone irradiée permettait la survenue d'une ORN à 6 mois. Le comblement de la perte osseuse par une association d'un biomatériau composé d'HA-TCP et de cellules souches issues de la moelle osseuse a permis une régénération osseuse, de la peau et des tissus mous. Toutefois, aucune notion de significativité statistique n'était rapportée pour les résultats présentés (220).

IV.1. Evaluation de la néoformation osseuse en territoire irradié après implantation de CSM associées au BCP

Dans ce contexte, une première étude a observé les effets de l'association de CSM issues de la moelle (CSMMO) ou du tissu adipeux (CSMTA) à des granules de BCP sur la reconstruction osseuse en territoire irradié chez le rat, et les a comparé à ceux obtenus par le comblement de référence, l'association BCP-moelle osseuse totale (BCP-MOT). Les animaux utilisés étaient des rats consanguins autorisant des allogreffes interindividuelles sans risque de rejet. Trois semaines après une irradiation monodose de 20 Gy (équivalente à dose fractionnée de 60 Gy) sur les membres postérieurs, quatre pertes de substance osseuse ont été créées par animal et comblées soit avec une association BCP-MOT, BCP-CSMMO, ou BCP-CSMTA, soit avec du BCP seul. Trois semaines après les implantations osseuses, la repousse osseuse a été évaluée de manière qualitative et quantitative. Les observations histologiques ont permis de confirmer l'ostéointégration et l'ostéoconduction du biomatériau utilisé. L'apport de MOT au BCP a permis d'améliorer significativement la repousse osseuse ($p < 0,05$), alors que l'association de BCP-CSM ne formait pas plus d'os que le BCP seul. Ces résultats étaient probablement dus à la pauvreté cellulaire et à l'insuffisance de vascularisation du tissu osseux irradié, partiellement compensées par l'apport de l'ensemble des éléments contenus dans la MOT. L'association BCP-MOT restait le modèle le plus efficace pour la obtenir une néoformation osseuse en territoire irradié.



A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone

Florent Espitalier^{a,b,*}, Claire Vinatier^a, Emmanuelle Lerouxel^{a,c}, Jérôme Guicheux^a, Paul Pilet^a, Françoise Moreau^a, Guy Daculsi^a, Pierre Weiss^a, Olivier Malard^{a,b}

^aINSERM, UMRS 791, laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, 1 Place Alexis Ricordeau, F44042 Nantes Cedex, France

^bService d'ORL et de chirurgie cervico-faciale, 1 Place Alexis Ricordeau, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, 44042 Nantes Cedex 1, France

^cFaculté de chirurgie dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, F44042 Nantes Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2008

Accepted 16 October 2008

Available online 25 November 2008

Keywords:

Bone reconstruction

Irradiated bone

Mesenchymal stem cell

Bone marrow graft

Calcium phosphate scaffold

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare bone reconstruction using either mesenchymal stem cells (MSCs) or total bone marrow (TBM) in association with biphasic calcium phosphate (BCP) granules after irradiation in a rat model. Three weeks after an external irradiation of the hind limbs of rats, four bone defects were created per animal. The defects were filled with either BCP alone, or with a mixture of BCP and TBM, or with a mixture of BCP and MSCs (adipose-derived or bone marrow-derived MSCs). Three weeks after implantations, new-bone formation was assessed. Histological examination showed osteoconductive and osteointegrative properties of BCP in irradiated tissue. The BCP-TBM mixture significantly improved bone ingrowth ($p < 0.05$). The BCP-MSCs mixtures did not provide new-bone formation over and above that induced by BCP alone. This gives grounds for suspecting that there is a link between this result and the cellular and vascular weakness observed in irradiated bone. The BCP-TBM mixture may have induced an increased vascularization of irradiated bone. This could be due to the presence of all components in TBM that were lacking in the BCP-MSCs mixtures. BCP associated with TBM appears to be the most efficient material for bone substitution in irradiated areas.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Treatment of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract often requires large therapeutic surgical bone removal in association with external radiation therapy. The surgery can be performed either before a complementary radiation therapy, or after radiation therapy, as in the case of tumor recurrence. The side-effects of treatments are major aesthetic and functional disorders. The standard surgical technique of reconstruction is the use of micro-anastomosed free-flaps [1]. However, this procedure requires prolonged general anesthesia and increases the risks of complications. Furthermore, irradiation produces irreversible side-effects on tissues and increases the risk of vascularized flap failure [2]. The side-effects of radiation on bone are characterized by reduced healing capacities because of the decreased amount of cells and vessels [3].

Given these risks of failure and complications, the use of calcium phosphate biomaterials has been considered as an alternative to autogenous bone grafts. However, unlike non-irradiated bone, in which calcium phosphate appears to be clinically relevant to autogenous bone grafting [4], calcium phosphate alone is not sufficient to reconstruct bone in irradiated areas. Previous studies have shown that biphasic calcium phosphate (BCP) associated with total bone marrow (TBM) provides better bone reconstruction than TBM or BCP alone in irradiated bone [5,6].

In addition, several authors have reported that the association of mesenchymal stem cells (MSCs) with calcium phosphate (or coral [7]) leads to a better bone reconstruction in non-irradiated areas than the biomaterial alone [8,9] or combined with TBM [7,10]. Thus, the objective of this study was to adapt this principle to irradiated tissues. For this purpose, the bone reconstruction capacity of BCP associated with MSCs was evaluated in an animal model of irradiated sequels, and compared to BCP associated with TBM.

Two types of MSC were considered in this study. The first was bone marrow-derived MSCs (BMMSCs) known for many years for their osteogenic [11] and *in vivo* bone repair properties. The second was adipose-derived MSCs (AMSCs), whose osteogenic [12] and *in vivo* [13] bone repair properties have been described more recently.

* Corresponding author. INSERM, UMRS 791, laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, 1 Place Alexis Ricordeau, F44042 Nantes Cedex, France. Fax: +33 2 40 08 37 12.

E-mail address: florent.espitalier@orange.fr (F. Espitalier).

In this study we used a rat model of irradiated bone defects to compare the bone reconstruction capacity of BCP scaffolds used either in association with MSCs (BMMSCs or AMSCs), with TBM, or on their own.

2. Materials and methods

2.1. Biphasic calcium phosphate (BCP)

The biomaterial used for this study was granules of a macroporous biphasic calcium phosphate (MBCP™, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). The granules were $781 \pm 148.6 \mu\text{m}$ in diameter and were composed of hydroxyapatite and β tricalcium phosphate in a 60/40 ratio corresponding to a 1:60 ratio of Ca:P. The measured mean porosity was $40 \pm 10\%$. Eppendorf tubes (Corning, New York, USA), each containing 0.015 g of granules, were steam-sterilized at 121°C for 20 min before implantation.

2.2. Animals

The study was performed on eight-week old inbred Lewis 1A-haploype RT1^a rats ($n = 23$), provided by a certified breeding centre (R. Janvier, Le Genest St. Isle, France), weighing ≥ 225 g. Animal care was provided by the Department of Experimental Therapeutic Unit (University Hospital of Nantes, France), in accordance with the European directive number 86/609/CEE for conducting animal experiments. The Ethics Committee of the Nantes University Hospital reviewed and approved the study design. The outline of the whole protocol is presented in Fig. 1. Three rats were specially designated as cell graft donors: two MSCs donors, and one total bone marrow donor. Twenty rats underwent external irradiation. Bone defects and implantations were performed three weeks after irradiation. Three weeks after implantations, implanted bone defects were removed just after euthanasia.

2.3. Radiation delivery procedure

Twenty rats were irradiated. The external fractionated radiation delivery was initiated and performed at the INSERM 895 Unit (University Hospital of Nantes, France). Radiations were delivered under general anesthesia induced by an isoflurane inhalation (Forene®, Abbott, Rungis, France) and preserved by an intramuscular injection (0.1 ml per 100 g of body weight) of Ketamine (Imalgene® 500, Merial, Lyon, France) and Xylazine (Rompun® 2%, Bayer Pharma, Puteaux, France) (4/5; v/v). The irradiation fields were localized on the hind limbs (including tibias and femurs) and the rest of the body was protected by a lead bridge. External irradiation was delivered by X-rays at 160 kV and an intensity of 6.3 mA, from a Faxitron-XRay (Faxitron-XRay Corporation, Wheeling, USA). 31.25 min were needed to obtain the required dose. X-rays were delivered by a single dose of 20 Gy, which was equivalent to a dose of 60 Gy by multi-fractionated delivery. Eight rats died further to irradiation.

2.4. Surgical procedure

Three weeks after the external irradiation, twelve rats received implants.

2.4.1. Anesthetic and euthanasia protocol

All the surgical procedures were performed under general anesthesia using 4% isoflurane inhalation for induction and 2% for preservation.

After harvesting the cell grafts from the three donors and after explantations, the rats were sacrificed by an overdose of sodium thiopental (Nesdonal®, Rhône-Merieux, Lyon, France).

2.4.2. Isolation and culture of BMMSCs and AMSCs

The MSCs were harvested from two non-irradiated donors and expanded *in vitro* for two weeks prior to implantation.

Rat bone marrow was isolated from two femurs. Both ends of each femur were cut and 1 ml of saline serum was infused through the medullary cavity. The bone marrow was collected and centrifuged (8 min, 353 g). Cells were then quantified after staining with trypan blue. The suspended bone marrow cells were seeded at 8000 cells/cm² in DMEM medium (Invitrogen corporation, Paisley, UK) containing 10% fetal bovine serum, 1% L-Glutamine (Invitrogen corporation), 1% 10^4 IU/ml penicillin and 10^4 µg/ml streptomycin (Invitrogen corporation) (proliferation medium) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The proliferation medium was renewed every 2–3 days. Non-adherent cells were removed from the culture and the adherent cells constitute the bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSCs) fraction. BMMSCs were expanded in culture for 2 weeks prior to implantation.

Rat adipose-derived MSCs were isolated from the peri-epididymal adipose tissue by enzymatic digestion as described previously [12]. Adipose tissue was rinsed three times in Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS, Invitrogen corporation) and digested by type IA collagenase solution (0.025%) (Sigma, Saint Quentin, France) in HBSS for 1 h at 37°C under constant stirring. Digestion products were centrifuged (5 min, 353 g) and the upper fraction (adipocyte fraction) was removed. The resting stromal fraction was filtered through a $70 \mu\text{m}$ nylon mesh and the cell suspension was centrifuged (5 min, 353 g). Cells were resuspended in proliferation medium and quantified as described above. Cells were finally seeded at 5000 cells/cm² in proliferation medium and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The proliferation medium was renewed every 2–3 days. AMSCs were expanded in culture during the two weeks prior to implantation.

At the time of implantation, BMMSCs and AMSCs were detached by adding trypsin/EDTA for 2 min and the suspended cells were washed and counted by Trypan blue staining. 1/40 of the total harvested BMMSCs and AMSCs was used for each implant.

2.4.3. Isolation of total bone marrow

The TBM was collected the day of the implantations from the femurs of the third non-irradiated donor and prepared for an extemporaneous graft. The collection technique was the same as described in the previous paragraph (Section 2.4.2). The TBM was immediately placed into tubes containing heparin anticoagulant (Venoject II, Terumo Europe, Louvain, Belgique). A cytological myelographic analysis was performed to check the TBM composition. The nucleated cells in the TBM were quantified by Trypan blue exclusion. The total number of nucleated cells in the TBM was 111×10^6 cells and 1/40 of the total number of cells (2.77×10^6) was used for each implant.

2.4.4. Preparation of the implants and defect filling

The granule samples for implantation (0.015 g, $n = 48$) were prepared at the same time as the surgical creation of the bone defects. Four kinds of implants were prepared:

- granules only, mixed with 20 µl of saline serum,
- a mixture of BCP and 2.77×10^6 TBM cells (1/40 of total harvested bone marrow cells) in 20 µl of saline serum,
- a mixture of BCP and 0.15×10^6 BMMSCs (1/40 of total harvested BMMSCs) in 20 µl of saline serum,

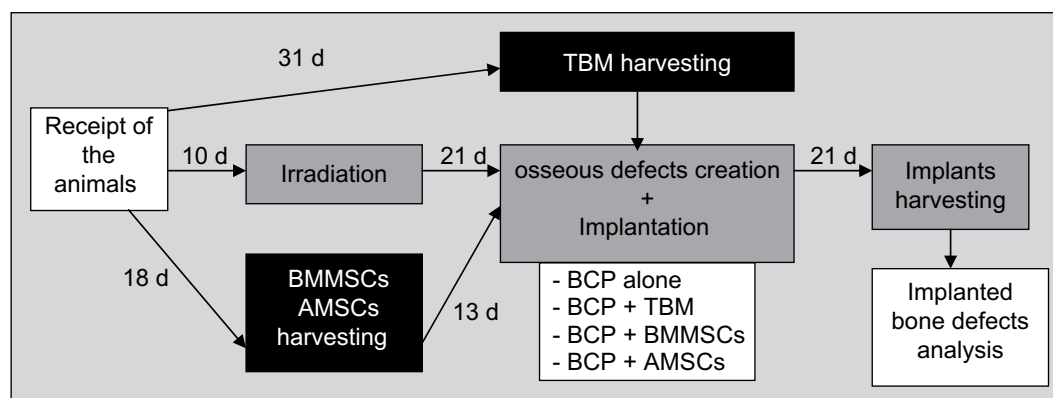


Fig. 1. Outline of the protocol presenting the different events and deadlines between them.

- a mixture of BCP and 0.5×10^6 AMSCs (1/40 of total harvested AMSCs) in 20 μ l of saline serum.

The contact time between BCP and cells before implantation was under 5 min.

Three millimetre-diameter osseous defects were surgically created in bilateral tibial and femoral metaphyses, using a round burr cooled by saline serum: four defects were created per animal. The defects were then totally filled with either BCP only, a mixture of BCP and TBM, a mixture of BCP and BMSCs, or a mixture of BCP and AMSCs. The muscles surrounding the bone defects were replaced and sewed up in order to maintain the implants on site. Subcutaneous tissue and skin were sutured in different layers. Thus, 48 defects were created and filled with regard to different conditions ($n = 12$ per condition). One rat died two days after implantation as the consequence of the general anesthesia. Three weeks after the surgical procedure, all the animals were sacrificed. Femurs and tibiae were then dissected and removed for analysis. 44 implants were finally harvested and analyzed ($n = 11$ per condition).

2.5. Histological examinations

The 44 explanted bone specimens were fixed for 72 h in a 4% paraformaldehyde phosphate-buffered saline (PBS, Seroderm, Berlin, Germany), then dehydrated through a graded series of ethanol and acetone. Non-decalcified bone specimens were infiltrated and embedded in a glycol-methacrylate resin (GMA) obtained by mixing methyl-methacrylate (Prolabo, Paris, France), polyethylene-glycol 400 (Prolabo) and benzoyl peroxide (Merk, Darmstadt, Germany) at -20°C for 7 days. Polymerization of the GMA was started with *N*-*N*-dimethyl-alanine (Sigma) in propanol-2 (Prolabo) at 4°C for 72 h. Serial 7- μ m sections were cut perpendicular to the osseous defects and surrounding bone using a diamond saw purpose - made for non-decalcified tissues (Reichert-Jung 2050, Nussloch, Germany). The bone sections were stained with Goldner trichrome and Movat pentachrome. New-bone formation, connections between BCP and neighboring tissues, and blood vessel formation in osseous defects were observed under a light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.6. Scanning electron microscopy (SEM) and quantitative image analysis

After histological sections, GMA-embedded bone specimens were sanded on a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) then gold-palladium-coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA). SEM studies of implanted defects were performed with backscattered electrons (Leo 1450 VP, Zeiss, Oberkochen, Germany) in conjunction with image analysis. The defect boundaries were determined and the bone and ceramic areas then identified by software according to a gray-scale threshold determination. The quantity of newly formed bone and ceramic degradation was determined using a semi-automatic image analyzer procedure from SEM observations (Leica microsystem imaging solution, Cambridge, UK) as previously described [14]. The quantity of newly formed bone, soft tissue and remaining BCP was automatically calculated within the total area. Their respective surfaces were expressed in mm^2 and as the relative percentage $\pm$ standard deviation for each component.

2.7. Statistical analysis

Bone ingrowth and BCP degradation/resorption were compared using an analysis of variance statistical test (ANOVA) with statistical significance set at 5% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Radiation delivery and surgical procedures

Despite lead protection, eight rats died of dehydration after irradiation due to a gastrointestinal tract injury, a typical complication following radiation [15]. The usual external radiation-related side effect (reversible, grade 1 dermatitis) was also observed. The surgical procedure itself was well tolerated in that only 1 rat died two days after implantation due to the anesthesia. There was neither osseous infection nor osseous exteriorization and no graft versus host disease was observed. Eleven rats were sacrificed three

weeks after implantation and their grafts explanted: 44 samples were analyzed (11 for each condition).

3.2. Bone marrow myelographic analysis

A cytological myelographic analysis was performed to assess the quality of BM grafts. This included an assessment of, the marrow cell lines (i.e., myeloblastic, myelocytic, erythroblastic, megakaryocytic lineages, lymphocytes, plasmocytes and monocytes). The results (presented in Table 1) indicated that the harvested bone marrow included physiological lineage cells.

3.3. Histological examination

The aspect of new-bone formation, the connection between BCP and surrounding tissues, and the formation of blood vessels in the osseous defects were evaluated. New-bone formation was greater after BCP-TBM mixture implantation than with the other filling materials. Newly formed bone was observed at the periphery of most of the osseous defects. Following BCP-TBM mixture implantation, new-bone formation was also observed towards the centre of the defect. The close contact between newly formed bone and BCP granules occurred without fibrous interposition, showing the remaining capacities of osteoconduction of the post-irradiation BCP. New-bone formation in the macropores of the granules was exclusively observed after implantation of the BCP-TBM mixture. When new-bone formation was large, despite irradiation, the bone marrow that was in contact with BCP granules was rich in numerous cells and blood vessels. Many newly formed blood vessels were observed in the defects filled with the BCP-TBM mixture: the bone marrow resembled non-irradiated bone marrow (data not shown). When BCP granules were implanted on their own or associated with BMSCs or AMSCs, a fibrous tissue was observed surrounding the BCP granules (Fig. 2).

3.4. SEM and image analysis

SEM analysis allowed not only a qualitative but also a quantitative evaluation of new-bone formation and ceramic degradation.

3.4.1. Qualitative SEM study

The qualitative SEM study was correlated to the histological examination. New-bone formation was densest after BCP-TBM mixture implantation, at the periphery and towards the centre of the osseous defects. After implantation of BCP-MSCs mixtures or BCP alone, only rare bone formations were observed at the periphery of the osseous defects (Fig. 3).

3.4.2. Quantitative SEM study

3.4.2.1. Bone ingrowth. The rate of bone ingrowth was significantly higher after implantation of the BCP-TBM mixture than after BCP alone, the BCP-BMSCs mixture or the BCP-AMSCs mixture, (respective increases of 1.8-fold, 2.6-fold and 2.1-fold; Fig. 4). There was no significant difference in bone ingrowth between defects filled with either BCP alone, the BCP-BMSCs mixture, or the BCP-AMSCs mixture.

Table 1

Cytological analysis of the bone marrow. Results are expressed as a percentage of cells per lineage.

Granulocytic lineages		Erythroblastic lineages	Megakaryocytic lineage	Lymphocyte	Plasmocyte	Monocyte
Myeloblastic	Myelocytic					
6.5	49	2.5	+	29	0	13

3.4.2.2. Ceramic degradation. The amount of BCP remaining three weeks after implantation was not significantly different between the various conditions (Fig. 5).

4. Discussion

The animal model has already been used in previous studies [5] and has been developed to mimic the side-effects of irradiation on bone. Lewis 1A-haplotype RT1^a inbred rats were selected because they develop tolerance to bone marrow allografts. No immunosuppressive treatment is required because graft rejection and graft versus host disease do not occur following bone marrow transplantation in this model [16]. However, an increased quantity of included animals in this study has been needed because of the fragility of this kind of rat.

The bone marrow myelographic analysis was in agreement with previously published data in rats [5] showing that the bone marrows used for transplantation were normal.

External radiation was delivered by a single fraction of 20 Gy. This dose is equivalent to 60 Gy by multi-fractionated delivery (60 Gy is a routine dose used for the treatment of squamous cell carcinomas of the upper-digestive tract in humans). As the animals could not survive a 40 Gy irradiation in the brain area (which would have been included in the field of mandibular irradiation), the decision was made to irradiate the hind limbs of the animals instead of the mandible [17].

Previous studies on irradiated bone have shown an impairment of vascular tissues [3] with a decrease in production of vascular growth factors. Radiation in bone tissue causes a decrease in

proliferation of bone-forming cells, leading to their accelerated differentiation [18]. These irradiation-related side-effects on bone could partially explain the delay in fracture union [19] and the osteoradionecrosis [20] sometimes observed in previously irradiated bone.

Among the various calcium phosphate biomaterials used in orthopedic surgery, BCP was chosen because of its biocompatibility, biodegradability and osteoconductivity properties. This calcium phosphate biomaterial is commonly used for bone substitution without any previous irradiation and is commercially available in different forms (granules and blocks) [4]. Furthermore, a synergistic effect of BCP and TBM has been previously demonstrated in bone repair after irradiation in rats [6].

Mesenchymal stem cells are well-known to exhibit proliferation, self-renewal and multipotent differentiation capacities [21]. MSCs are able to differentiate into cell types of mesodermal origin, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and muscle cells [22]. MSCs can be collected from many organs, like bone marrow [23] or adipose tissue [24]. The osteogenic differentiation potential of the bone marrow-derived MSCs was described many years ago [11]. However, MSCs are rare in bone marrow (one cell for 100 000 nucleated cells [22,25]) and their quantity decreases with age [26]. More recently, the osteogenic differentiation potential of adipose-derived MSCs has been demonstrated [12]. Their osteogenic differentiation potential is similar to that of BMMSCs [27] and like BMMSCs, seems to be maintained with ageing [28]. In addition, the availability of adipose tissue is greater, its collection is easier and it can be obtained under local anesthesia with reduced morbidity.

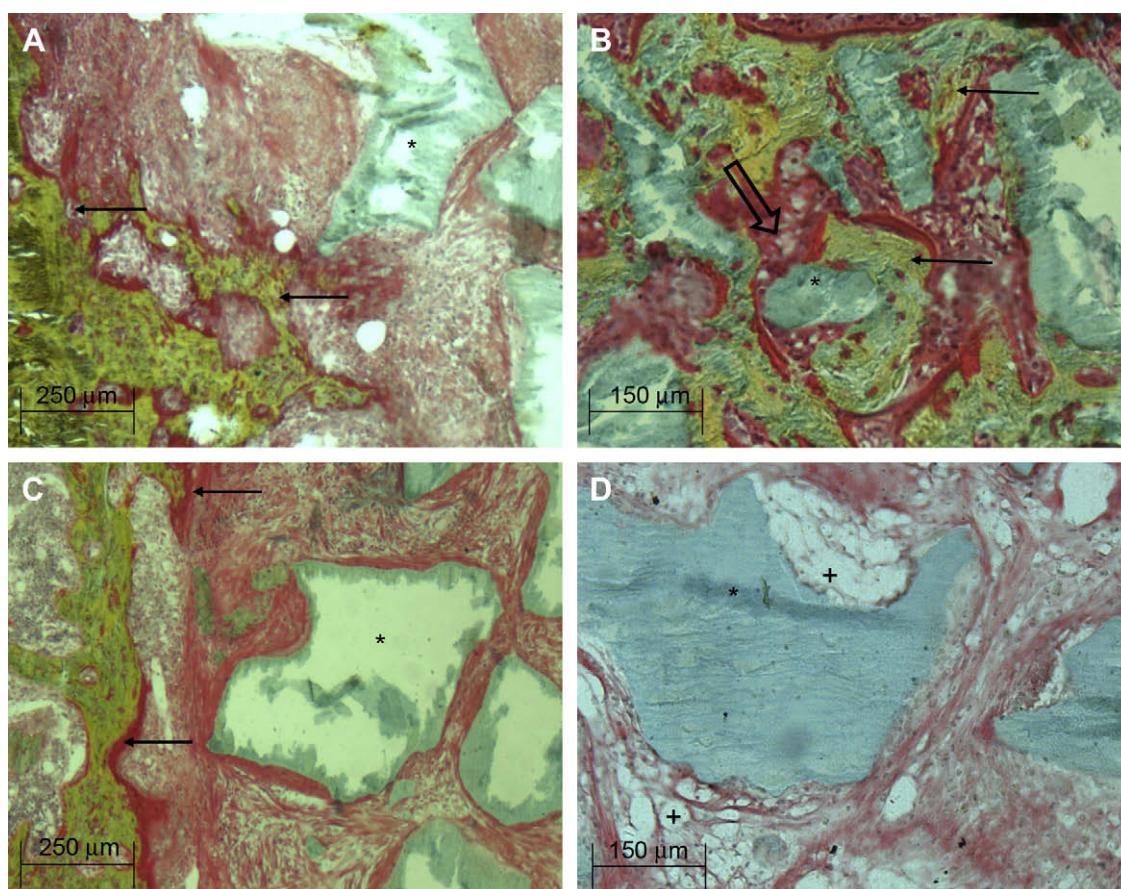


Fig. 2. Images of histological sections of samples explanted 3 weeks after implantation (Movat pentachrome staining). A. Defect filled with BCP alone: fibroblasts in contact with BCP (*). Bone repair in the periphery of the defect (←). B. Defect filled with BCP-TBM mixture: new-bone formation (←) in contact with BCP (*). Rich bone marrow in contact (Σ). C. Defect filled with BCP-BMMSCs mixture: fibroblasts in contact with BCP (*). Bone repair in the periphery of the defect (←). D. Defect filled with BCP-AMSCs mixture: fibroblasts and adipocytes (+) in contact with BCP (*).

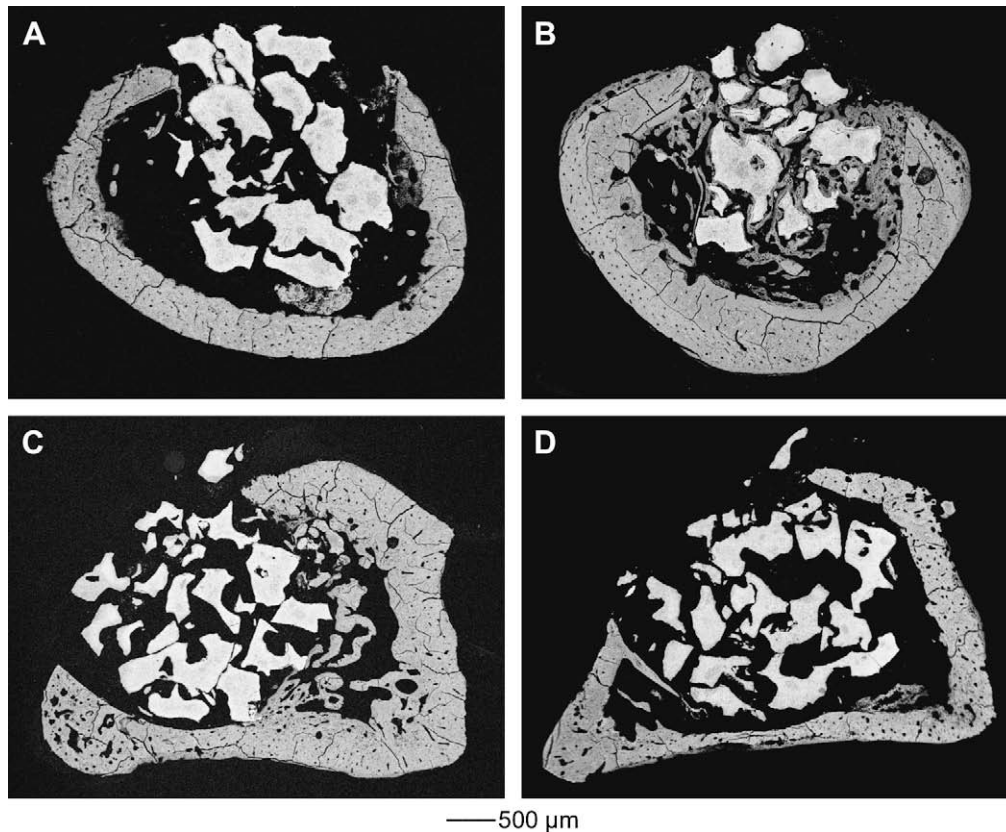


Fig. 3. SEM backscattered electron images of samples explanted 3 weeks after implantation. A. Defect filled with BCP alone: bone repair in periphery of the defect. B. Defect filled with BCP-TBM mixture: bone repair in contact with BCP. C. Defect filled with BCP-BMMSCs mixture: bone repair in periphery of the defect. D. Defect filled with BCP-AMSCs mixture: bone repair in periphery of the defect.

Histological examinations showed that bone reconstruction was in contact with BCP mostly after BCP-TBM mixture implantation. This observation confirmed that BCP maintains its properties of biocompatibility and osteoconductivity even after irradiation of the recipient site [6]. Histological and quantitative analyses of new-bone formation showed a significant increase in bone repair with the BCP-TBM mixture. The MSCs–calcium phosphate association did not result in an increase in new-bone formation in irradiated tissues. On the contrary, Kadiyala et al. [10] and Petite et al. [7]

demonstrated that MSCs associated with calcium phosphate or coral caused an increased formation of new-bone when implanted in non-irradiated bone. This discrepancy can be explained by the fact that the implanted MSCs were not previously differentiated in our study. Two studies performed in non-irradiated areas [7,10] demonstrated a higher degree of bone repair when using previously differentiated MSCs associated with a biomaterial compared to TBM associated with a biomaterial. The fact that implanted MSCs were not differentiated in our study could explain the lack of bone formation. However, Ohgushi and Caplan [25] demonstrated that

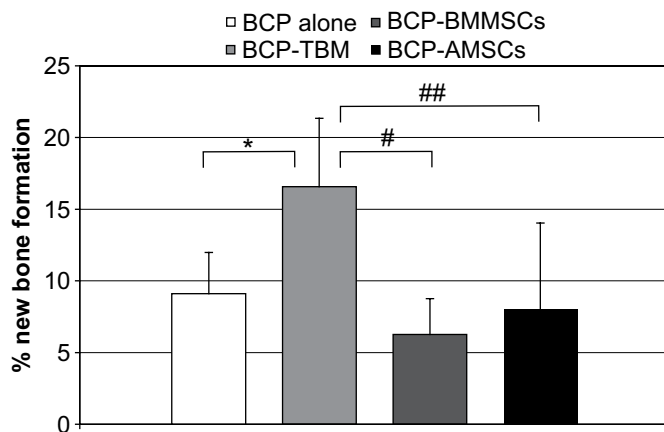


Fig. 4. Bone ingrowth in osseous defects (# $p = 0.0025$ compared with BCP-BMMSCs, * $p = 0.0264$ compared with BCP alone, ## $p = 0.0111$ compared with BCP-AMSCs).

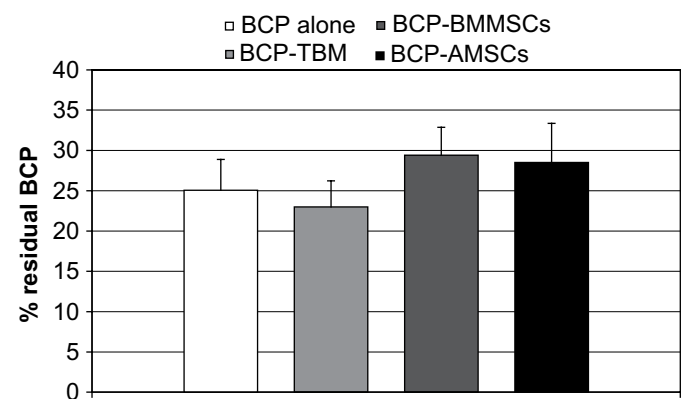


Fig. 5. BCP degradation in osseous defects: no statistical differences observed between the different implants ($p = ns$).

non-differentiated MSCs associated with a biomaterial provide better bone reconstruction than TBM associated with the same biomaterial in non-irradiated areas. As regards the above-mentioned data, irradiation therefore seemed to be the main factor that limited bone formation with the BCP–MSCs mixtures used in our study. The lack of vascularization and vascular growth factors commonly observed in irradiated bone [3] could be the major explanatory factor for these results. In a deprived bone marrow without appropriate blood perfusion, the osteogenic growth factors [29] and the cells producing them are probably lacking or unable to promote the osteogenic differentiation of MSCs *in vivo*.

This study shows the superiority of TBM over MSCs to enable bone repair in irradiated areas, when used in association with BCP. Thus, it is possible that certain components present in TBM contributed to this higher level of bone repair. Among these components, different cell lineages are contained in bone marrow [30]. A small number of them are considered to be MSCs, which are osteoblast precursors [22]. Other lineages include hematopoietic stem cells, which are the precursors of blood cells [31], osteoclasts [32] and endothelial cells [33]. Some growth factors required for osteogenic differentiation of MSCs may become available from cells carried over in the bone marrow [29] and not simply from MSCs, but some could be recruited from the peripheral blood. It is also possible that some of the osteogenic growth factors become available secondary to newly formed blood vessels, thanks to endothelial cell precursors (i.e., hematopoietic stem cells) [33]. The histological examination showed a richer bone marrow in BCP–TBM mixtures containing a large number of blood vessels. Together, our data therefore strongly suggest that not only MSCs but also other cell lineages, such as hematopoietic cells, are needed to enable significant bone reconstruction in irradiated bone.

There was no significant difference in BCP degradation between the different filling materials. This lack of difference may be due to the delay between implantation and explantation, which was probably too short in this study (i.e., 3 weeks) to allow for significant differences.

As a whole, our data clearly suggest that the BCP–TBM mixture is the most efficient for the reconstruction of bone defects after radiotherapy, particularly in the case of carcinomas of the upper aero-digestive tract.

5. Conclusion

This work compared bone reconstruction using a calcium phosphate biomaterial associated with TBM or undifferentiated MSCs from bone marrow or adipose tissue in irradiated areas. Histological examinations confirmed the biocompatibility and osteoconductivity of the BCP following external irradiation. Our results also confirmed that BCP should be associated with TBM for the purpose of bone reconstruction in irradiated areas. Interestingly, the association of MSCs derived from adipose tissue or bone marrow failed to improve bone repair. There is probably a link between this result and the cellular and vascular weakness observed in irradiated bone. The BCP–TBM mixture may induce the angiogenesis of repair tissue and thus balance the side-effects of irradiation. BCP associated with TBM appears to be the most efficient material for bone substitution in irradiated areas. On the other hand, the precise role of angiogenesis and hematopoietic cells in bone repair should be ascertained by further investigations.

Acknowledgments

This work was supported by grants from GEFLUC and “les gueules cassées” foundation.

We thank Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France) for supplying materials.

We thank Dr Richard Garand, Angélique Charnolé and Dr Pierre Corre for their contribution to this work.

Appendix

Figures with essential colour discrimination. Figure 2 of this article is difficult to interpret in black and white. The full colour image can be found in the on-line version, at [doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.051](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.051).

References

- [1] Head C, Alam D, Sercarz JA, Lee JT, Rawnsley JD, Berke GS, et al. Microvascular flap reconstruction of the mandible: a comparison of bone grafts and bridging plates for restoration of mandibular continuity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(1):48–54.
- [2] Klug C, Berzaczy D, Voracek M, Enislidis G, Rath T, Millesi W, et al. Experience with microvascular free flaps in preoperatively irradiated tissue of the oral cavity and oropharynx in 303 patients. *Oral Oncol* 2005;41(7):738–46.
- [3] Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991;26(6):505–10.
- [4] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(395):81–98.
- [5] Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27(26):4566–72.
- [6] Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36(2):323–30.
- [7] Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18(9):959–63.
- [8] Mankani MH, Kuznetsov SA, Shannon B, Nalla RK, Ritchie RO, Qin Y, et al. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. *Am J Pathol* 2006;168(2):542–50.
- [9] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007;28(6):1005–13.
- [10] Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* 1997;3(2):173–85.
- [11] 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(2):317–30.
- [12] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211–28.
- [13] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004;22(5):560–7.
- [14] Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B. Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J Biomed Mater Res* 1993;27(1):57–64.
- [15] Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl* 2005;27:89–94.
- [16] Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D, Bugeon L, Anegón I, Menoret S, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994;24(7):1627–31.
- [17] Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7(2):337–52.
- [18] Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000;106(5):1049–61.
- [19] Pelker RR, Friedlaender GE. The Nicolas Andry Award-1995. Fracture healing. Radiation induced alterations. *Clin Orthop Relat Res* 1997;(341):267–82.
- [20] Vanderpuye V, Goldson A. Osteoradionecrosis of the mandible. *J Natl Med Assoc* 2000;92(12):579–84.
- [21] Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):502–8.
- [22] 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(5411):143–7.
- [23] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267–74.

- [24] Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005;308(2):283–90.
- [25] Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48(6):913–27.
- [26] Caplan AI, Reuben D, Haynesworth SE. Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33(1–2):3–14.
- [27] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174(3):101–9.
- [28] Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(6):1686–96.
- [29] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14(11):1805–15.
- [30] Miura M, Miura Y, Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis* 2006;12(6):514–22.
- [31] Fukushima N, Ohkawa H. Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20(3):255–70.
- [32] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337–42.
- [33] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004;8(4):498–508.

L'incapacité des CSM à former de l'os en territoire irradié dans cette étude n'était pas attendue, devant leur capacité à régénérer de l'os en territoire sain. Ces résultats nous ont donc amené à reconsidérer l'environnement dans lequel les CSM évoluaient une fois implantées. Au sein de la MOT implantée, les cellules ostéprogénitrices « baignent » dans un environnement favorable, c'est-à-dire celui de la moelle osseuse saine, non irradiée. En les implantant au sein de l'os irradié, il semble que ces cellules n'aient pas trouvé les facteurs nécessaires à leur survie et au développement d'une néoformation osseuse. L'ensemble des éléments contenus dans la moelle osseuse semblait donc nécessaire et indispensable à la formation osseuse en terrain irradié (221).

IV.2. Evaluation de la néoformation osseuse en territoire irradié après implantation d'une association de CSM et de MOT au BCP

Une deuxième étude a donc intégré cette insuffisance et a proposé, afin d'augmenter la néoformation osseuse, d'associer à la MOT les CSM. Le but était ainsi de fournir une moelle enrichie en CSM pour quantitativement augmenter le nombre de cellules ostéoprogénitrices, tout en y associant les éléments reconnus comme indispensables à l'ostéoformation en terrain irradié. La différenciation des CSM dans la voie ostéoblastique a été réalisée avant implantation, afin de comparer les résultats en présence ou non de différenciation pré-implantatoire.

Le même modèle animal de séquelles d'irradiation osseuse que celui de l'étude précédente a été utilisé. Les pertes de substance osseuse créées sur chaque fémur et tibia de rat ont été comblées soit par du BCP seul, soit par une association BCP-MOT, ou BCP-MOT-CSM différenciées ou non différenciées dans la lignée ostéoblastique. Trois semaines après les implantations, les os ont été prélevés afin de réaliser une analyse qualitative et quantitative de la repousse osseuse. La néoformation osseuse était significativement supérieure pour les implants associant BCP-MOT ($p < 0,05$). L'ajout de concentrations élevées de CSM différenciées ou non, n'a pas permis d'augmenter la repousse osseuse. L'association BCP-MOT restait, là-aussi, le modèle le plus efficace pour la obtenir une néoformation osseuse en territoire irradié.

Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold.

P. Bléry^{1,2,3,4,5}, P. Corre^{1,2,4,6}, O. Malard^{1,2,4,7}, S. Sourice^{1,2}, P. Pilet^{1,2,4}, Y. Amourig^{1,2,3,4,5}, J. Guicheux^{1,2,4}, P. Weiss^{1,2,3,4}, F. Espitalier^{1,2,4,7}

1. INSERM, UMR-S 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, LIOAD, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
2. Université de Nantes, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, LIOAD, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
3. Université de Nantes, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
4. CHU Nantes, PHU 4 OTONN, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
5. CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Service d'Odontologie Restauratrice et Chirurgicale, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
6. CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Service de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
7. CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Service d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

Corresponding author : Pauline Bléry, INSERM, UMR-S 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, LIOAD, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France ; pauline.blery@univ-nantes.fr; phone number : 02.40.41.29.16 ; fax number : 02.40.08.37.12

Abstract

The consequences of the treatment of the squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract (bone removal and external radiation therapy) are constant. Tissue engineering using biphasic calcium phosphate (BCP) and mesenchymal stem cells (MSC) is considered as a promising alternative. We previously demonstrated the efficacy of BCP and total fresh bone marrow (TBM) in regenerating irradiated bone defect. The aim of this study was to know if adding MSC to BCP + TBM mixture could improve the bone formation in irradiated bone defects. Twenty-four Lewis 1A rats received a single dose of 20 Gy to the hind limbs. MSC were sampled from non-irradiated donors and amplified in proliferative, and a part in osteogenic, medium. Three weeks after, defects were created on femurs and tibias, which were filled with BCP alone, BCP + TBM, BCP + TBM + uncommitted MSC, or BCP + TBM + committed MSC. Three weeks after, samples were removed and prepared for qualitative and quantitative analysis. The rate of bone ingrowth was significantly higher after implantation of BCP+TBM mixture. The adding of a high concentration of MSC, committed or not, didn't improve the bone regeneration. The association BCP+TBM remains the most efficient material for bone substitution in irradiated areas.

Key words

Bone repair, tissue engineering, radiation, neovascularization, biomaterial

1. Introduction

The treatment of the squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract often requires large therapeutic surgical bone removal in association with external radiation therapy. Side effects of both therapies are especially damaging to the quality of life of patients, from a functional and aesthetic point of view [1–6]. Reconstruction of bone defects and surrounding tissues in irradiated tissue is then desirable since it can dramatically improve aesthetic and functional features. Micro-anastomosed free-flaps and autogenous bone graft are considered as the standard reconstruction procedures [7,8]. Thus, these therapies cannot be performed in all patients because of the high risk of morbidity following complex surgeries or prolonged anesthesia. So tissue engineering strategy using biphasic calcium phosphate (BCP) scaffold is booming and generating hopes. Biomaterials have been described and known for many years [9]. They have been used in combination with Total Bone Marrow (TBM) or Mesenchymal Stem Cells (MSC) for more than twenty years [10–15]. In non-irradiated areas, it has been shown that the association of BCP and TBM promoted new bone formation [10,14,15], as the mixture of BCP+MSC allowed better new bone formation than the association BCP+TBM [11,12]. Currently, few data on bone formation in irradiated tissues are available in literature. We have demonstrated that the association of BCP and TBM provided better bone reconstruction than BCP or TBM alone, in various animal models [16–19]. Since MSC have the capacity to differentiate into mesodermal cells (osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and myocytes) [20,21] and to repair non irradiated bone defect, they have been evaluated in comparison to the BCP and TBM mixture. Espitalier and al. showed that uncommitted MSC from bone marrow or adipous tissue didn't succeed in regenerating irradiated bone defects, due to the cellular and vascular poorness of irradiated bone [18]. Since, knowledge of tissue engineering is in development. If the MSC properties are not completely elucidated, the positive effect of cell commitment and cell concentration to promote bone formation is now acknowledged in non-irradiated territories. The osteogenic differentiation potential of MSC *in vitro* has been established for several years [10] and has been demonstrated *in vivo* in many studies [22,23]. Furthermore, the positive effect of increasing the number of implanted cells on bone regeneration has been clearly pointed [15]. Encouraged by the interesting results obtained in non-irradiated area by the use of committed MSC [11,12], or high density of implanted cells, we aimed to determine if the addition of a high density of MSC (committed or not) to the BCP+TBM mixture could improve the bone reconstruction in irradiated areas in rats.

2. Materials and methods

2.1 Biphasic calcium phosphate

Granules of macro- and microporous biphasic calcium phosphate ceramics were used as biomaterial (MBCP™, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). They were composed of 60% of hydroxyapatite and 40% of β tricalcium phosphate corresponding to a ratio of 1:60 of Ca:P. The mean granules diameter was $781 \pm 148.6 \mu\text{m}$ and the mean porosity was $40 \pm 10\%$. The granules were sterilized at 121°C for 20 minutes in Eppendorf tubes (Costar, Corning NY, USA), each containing 0.015g of granules.

2.2 Animals

Eight-week-old inbred Lewis 1A-haplotype RT1^a rats (n=30, 24 females, 6 donors), provided by a certified breeding centre (R. Janvier, Le Genest St. Isle, France), weighting about 225 g, were used for this study. Animal care was provided by the Department of Experimental Therapeutic (University of Nantes, France), in accordance with the European directive (DE 86/609/CEE; modified DE 2003/65/CE) for conducting animal experiments. The Ethics Committee of the Nantes University Hospital reviewed and approved the study design.

Twenty-four females were used for implantation after irradiation, and 6 animals were used as donors of TBM and MSC. At day 0, the 24 females were irradiated on the hind limbs, and 3 weeks later, bone defects and implantation were performed. Three weeks after implantation, the animals were euthanized and implanted bone defects were harvested (fig.1).

2.3 Radiation delivery procedure

The external radiation delivery as previously described (18) was performed at the Institute of Therapeutics Researches, University of Nantes, France under general anesthesia. The twenty four females were irradiated on the hind limbs (including tibias and femurs) and the rest of the body was protected by a lead bridge. External irradiation was delivered by X-Rays at 160 kV, an intensity of 6.3 mA, a 0.69 Gy/min flow, at 28 cm of the source from a Faxitron-X Ray (Faxitron-X Ray Corporation, Wheeling, USA). 29.30 min were needed to obtain the required dose. X-rays were delivered by a single dose of 20 Gy, which was equivalent to a dose of 60 Gy by multi-fractionated delivery.

2.4 Anesthetic and euthanasia protocol

All the surgical procedures were performed under general anesthesia using 4% isoflurane inhalation for induction and 2% for preservation. After harvesting the cell grafts from the six donors and after explantations, the rats were sacrificed by an overdose of CO₂.

2.5 Isolation and culture of bone marrow MSC

Rat bone marrow was isolated from three non-irradiated donors femurs and tibias. Both ends of bones were cut and 1 ml of saline serum was infused through the medullar cavity. The cells were seeded in α MEM medium (Invitrogen corporation, Paisley, UK) containing 10% fetal bovine serum (Dutscher, Brumath, France), 1% L-Glutamine (Invitrogen corporation), 1% 10^4 IU/ml penicillin and 10^4 mg/ml streptomycin (Invitrogen corporation) (proliferative medium) and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The culture medium was renewed every 2–3 days. Non-adherent cells were removed from the culture and the adherent cells constituted the bone marrow MSC fraction. MSC were expanded in culture for 2 weeks prior to implantation. For one week, half of the cells were seeded in osteogenic medium, containing the same proliferative medium with 10mM β -glycerophosphate (Calbiochem, Darmstadt, Germany), 50 μ M vitamin D3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 10nM of ascorbic acid (Sigma-Aldrich). At the time of implantation, MSC were detached by adding trypsin/EDTA (Dutscher, Brumath, France) for 2 min and the suspended cells were washed and counted by Trypan blue staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A quantity of 0.15×10^6 MSC was used for each defect.

2.6 Osteogenic Differentiation

2.6.1 Culture

For in vitro osteogenic differentiation of MSC, cells were seeded at a density of 1.10^4 cells/cm² in six-well plates and cultured in the presence of either proliferative or osteogenic medium for 28 days as previously described [24].

2.6.2 Calcium deposition

To assess the deposition of calcium phosphate, Alizarin Red S staining was used and detected at 14 and 28 days, as previously described [24]. Stained layers were visualized with phase microscopy using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000 E, Badhoevedorp, The Netherlands).

2.7 Isolation of total bone marrow

The TBM was collected the day of the implantations from the femurs of three non-irradiated donors and prepared for an extemporaneous graft. The collection technique was the same as described above and 2 ml of TBM was collected. The TBM was immediately placed into tubes containing heparin anticoagulant (Venoject II, Terumo Europe, Louvain, Belgium). A cytological myelographic analysis was performed to check the TBM composition. The nucleated cells in the TBM were quantified by Trypan blue exclusion dye.

2.8 Preparation of the implants surgical procedure

Three millimeter-diameter osseous defects were surgically created in bilateral tibial and femoral metaphyses, using a round burr cooled by saline serum under general anesthesia. Four defects were performed per animal. The granule samples for implantation (0.015 g) were prepared at the same time as the surgical creation of the bone defects. Four kinds of implantations were prepared: 1: granules of BCP only, mixed with 20 μ l of saline serum, 2: a mixture of BCP and 2.8×10^5 of TBM cells in 20 μ l of saline serum, 3: a mixture of BCP, 2.8×10^5 of TBM cells and 1.5×10^5 uncommitted MSC in 20 μ l of saline serum, 4: a mixture of BCP, 2.8×10^5 of TBM cells and 1.5×10^5 committed MSC in 20 μ l of saline serum. MSC were suspended in TBM before in heparin tube before mixing with BCP. The contact time between BCP and cells before implantation was less than 5 min. The defects were then totally filled with BCP only, a mixture of BCP+TBM, a mixture of BCP+TBM+uncommitted MSC, or a mixture of BCP+TBM+committed MSC. The same condition was implanted on each side. The muscles surrounding the filled bone defects were replaced and sewed up in order to maintain the implants on site. Subcutaneous tissue and skin were sutured in different layers. Three weeks after the surgical procedure, all the animals were sacrificed. Femurs and tibias were then dissected and removed for analysis.

2.9 Histological examinations

The non-decalcified explanted bone specimens were fixed for 72 h in a 4% paraformaldehyde phosphate-buffered saline (PBS, Seroderm, Berlin, Germany), then dehydrated through a graded series of ethanol and acetone and embedded in a glycol-methacrylate resin (GMA) as previously described (18). Serial 5 μ m sections were cut perpendicular to the osseous defects and surrounding bone using a diamond saw (Reichert-Jung 2050, Nussloch, Germany). The bone sections were stained with Goldner trichrome and Movat pentachrome. New-bone formations, connections between BCP and neighboring tissues, and blood vessel formations in osseous defects were observed under a light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.10 Scanning electron microscopy (SEM) and quantitative image analysis

GMA-embedded bone specimens were sanded on a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) gold-palladium-coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA) and studied with backscattered electrons (Leo 1450 VP, Zeiss, Oberkochen, Germany) in conjunction with image analysis. The defect boundaries were determined and the bone and ceramic areas then identified by software according to a gray-scale threshold determination, because of the different grey levels of the bone and biomaterial. The quantity of newly formed bone and ceramic degradation was determined using a semi-automatic image analyzer procedure from SEM observations (Leica microsystem imaging solution, Cambridge, UK) as previously described [25]. The quantity of newly formed bone, soft tissue and remaining BCP were automatically calculated within the total area. Their respective surfaces were expressed in mm^2 and as the relative percentage standard deviation (+/-) for each component.

2.11 Statistical analysis

Bone ingrowth and BCP degradation/resorption were compared using an analysis of variance statistical test (ANOVA) with statistical significance set at 5% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 Radiation delivery and surgical procedures

Despite lead protection, 2 rats died of dehydration after irradiation due to a gastrointestinal tract injury, a well-known complication [26]. The usual external radiation-related side effects (reversible, grade 1 dermatitis) were also observed. The surgical procedure itself was well tolerated; only 3 rats died 2 days after implantation due to the anesthesia complication. There was neither osseous infection nor osseous exteriorization. No graft versus host disease was observed. 19 rats were sacrificed three weeks after implantation and the studied bones were explanted: only 40 samples were analyzed because of the high number of fractures (n=10 for BCP alone, n=10 for BCP+TBM, n=11 for BCP+TBM+ uncommitted MSC, n=9 for BCP+TBM+ committed MSC).

3.2 Bone marrow qualitative and quantitative analysis

The total number of nucleated cells in the TBM was 19×10^6 cells. It represented 68 times the number of cells (2.8×10^5) used for each implant. A cytological myelographic analysis was performed to assess the quality of BM grafts. This included an assessment of the marrow cell lines (i.e., myeloblastic, myelocytic, erythroblastic, megakaryocytic lineages, lymphocytes, plasmocytes and monocytes). The results (Table 1) indicated that the harvested bone marrow included physiological lineage cells [27].

3.3 Osteogenic differentiation potential

Osteogenic differentiation was evaluated by the deposition of a calcified matrix demonstrated by Alizarin Red staining. Alizarin Red-positive staining was detected early from day 14 of culture (data not shown) and gradually increased until day 28 for cells cultured in the presence of osteogenic medium compared with cells cultured in the proliferative medium (Figure 2).

3.4 Histological examination

The aspects of new-bone formation, the connections between BCP and surrounding tissues, and the formation of blood vessels in the osseous defects were evaluated. New-bone formation was greater after BCP+TBM mixture implantation than with the other filling materials (Fig. 3). Newly formed bone was observed at the periphery of most of the osseous defects. Following BCP+TBM mixture implantation, new-bone formation was also observed towards the center of the defect. The close contact between newly formed bone and BCP granules occurred without fibrous interposition, showing the remaining capacities of osteoconduction of BCP after irradiation. New bone formations in the macropores of the granules were exclusively observed after implantation of the BCP+TBM mixture. When new-bone formation was large, despite irradiation, the bone marrow that was in contact with BCP granules was rich in cells and blood vessels. Many newly formed blood vessels were observed in the defects filled with the BCP+TBM mixture near the osteoid and new bone. In addition, osteoblasts were visible along the bone formation. Multinucleated cells were also identified. It was possible to highlight the intimate relationship between the newly formed bone and osteoid tissue and numerous blood vessels filled with erythrocytes (Fig.4). When BCP granules were implanted on their own or associated with committed or not MSC, a fibrous tissue was observed surrounding the BCP granules.

3.5 SEM and image analysis

3.5.1 Qualitative SEM study

The qualitative SEM study was correlated to the histological examination. New-bone formation was improved after BCP+TBM mixture implantation, at the periphery and towards the centre of the osseous defects. After implantation of BCP+TBM and MSC mixtures or BCP alone, bone formation was barely detectable and observed only at the periphery of the osseous defects (Fig. 5).

3.5.2 Quantitative SEM study

3.5.2.1 Bone ingrowth

The rate of bone ingrowth observed after implantation of the BCP+TBM mixture (8.5%) was significantly higher than after BCP alone, the BCP+TBM+ uncommitted MSC or BCP+TBM+ committed MSC (respective increases of 6.5-fold, 4.25-fold and 3.5-fold; Fig. 6). The rate of bone ingrowth observed after implantation of BCP alone, BCP+TBM+ uncommitted MSC or BCP+TBM+ committed MSC was not significantly different (Fig.6).

3.5.2.2 Ceramic degradation

The amount of BCP remaining three weeks after implantation was not significantly different between the various conditions (BCP: 37.1%; BCP+TBM: 30%; BCP+TBM+ non committed MSC: 33.2%; BCP+TBM+ committed MSC: 33.7%).

4. Discussion

BCP mimicks the mineral of bone extracellular calcified matrix and are known for their properties of biocompatibility, biodegradability, bioactivity and osteoconductivity. In the presence of bone marrow cells, BCP express osteoinductive capacity, so they are capable to induce new bone formation in ectopic implantation sites [28,29]. Healing of empty defect after irradiation has been studied before by the lab and has always shown absence of newly formed bone [16–17]; so used alone, BCP is considered as an empty defect in irradiated areas. The granules of BCP as bone substitute in this study was choiced after the synergistic effect shown in BCP associated with TBM in bone reconstruction in rats after irradiation [16–18]. In the literature, stem cells in addition with biomaterial are extensively studied for bone regeneration [20-21-30]. Given the risk of allograft rejection of bone marrow, and the difficulty to perform autografts in rats, the use of a conventional rat race was limited. Thus, inbred rats of the Lewis type IA - RT1a haplotype were used, as previously published [16–18]. These animals are tolerant to bone marrow allografts without immunosuppressive treatment. There's thus no risk of rejection or "graft versus host" reaction [31]. Because of the fragility of Lewis IA rats, it's important to adapt the anesthetic protocol and to increase the number of animals to meet the statistical requirements of the study. The rats were irradiated at the hind limbs by a single fraction of 20 Gy, which was equivalent to 60 Gy by multi-fractionated delivery in human. Sixty grays represent a routine dose used for the treatment of squamous cell carcinomas of the upper-digestive tract in humans. As the animals could not survive a 40 Gy irradiation in the brain or medullar area, the decision was made to irradiate the hind limbs of the animals instead of the mandible [5]. A same number of samples for the four conditions were included for quantitative analysis. The new bone formations were greater in the periphery of the bone defect and between the BCP granules for the condition BCP+TBM. Analysis of quantitative results showed that new bone formation obtained by the condition BCP+TBM was significantly higher than those obtained with the other conditions. To conclude, the addition of MSC committed or not to BCP and TBM didn't improve the new bone formation in irradiated bone, which are almost similar to those observed for BCP alone. Encouraged by the interesting results obtained in non-irradiated area by the use of differentiated MSC [11,12], this study was to know if the osteogenic differentiation of MSC prior to implantation would enhance the new bone formation. Furthermore, a precedent study showed the ineffectiveness of uncommitted MSC in combination with BCP in irradiated area [18], but confirmed the positive role of the association BCP+TBM. Perhaps bringing a large number of MSC in an environment rich in growth factors and bone vascular and hematopoietic stem cells would allow a better repair of the irradiated bone [18]. So, we wanted to test whether the addition of MSC to the BCP+TBM association magnified new bone formation. This study clearly demonstrated that MSC mixed with TBM were not able to enhance the bone

formation in irradiated defects. Surprisingly, MSC added to TBM seemed to play a negative role in the osteogenic process. To explain these findings one could suppose that the addition of a high density of cells to TBM may have induced an imbalance in the normal functioning of the TBM and BCP mixture. In physiological conditions, the bone marrow derived osteogenesis is based on a cellular synergy between hematopoietic and mesenchymal stem cells that are able to produce all components of bone despite their low density in bone marrow (about 1 cell per 1.10^5 in adult [20,21,30]). In the present study about $1.5.10^5$ MSC have been added to 50 μ l of TBM that contained roughly 2.8×10^5 nucleated cells and less than 100 stem cells. In this condition, the dilution of TBM cells could have prevented them from physiological features with hematopoietic stem cells responsible for neo-angiogenesis [32]. The functional ratio of MSC to HSC has to be clearly defined to facilitate the bone formation. Also, coculture of TBM and MSC may have prevented action of the two cells types. Coculture of endothelial cells and osteoblasts has shown a non-synergetic effect for bone healing in a critical-sized calvarial defect in rat [33]. Moreover, Aguirre and al. have shown a significant reduction of cell proliferation when coculturing bone marrow cells and MSC and suggested that was “associated with the down-regulation of a large group of growths factors including several TGF- β family members” [34]. Also an inhibitor effect on the lymphocyte production by the MSC in coculture was described [35]. So, several studies have shown a negative effect of coculture which could explain our results. Another explanation could be the short deadline for implementation used in our study. Three weeks could be not enough to ensure that MSC have enough time to graft and differentiate. The time of implantation observed in studies that yielded positive results in new bone formation with MSC was much longer [10–13,15]. A reduction of 40% of MSC two days after injection of MSC labeled with Indium¹¹¹ until 7 days has been shown, so that the benefit obtained after cell therapy was transient [36]. Also, a recent study has demonstrated that MSCs implanted in non-irradiated bone defect decreased in three weeks, while the amount of host cells increased during this period [37] suggesting a massive death of grafted MSC for ischemic or hypoxic reason. Irradiated bone is a weakened bone, whose healing abilities are clearly unfavorable for cells grafting. Irradiation causes side effects in vascularization, but also at the cellular level by reducing hematopoietic cells niche [38], bone-forming cells and osteogenic growth factors. A progressive fibrosis, a focal necrosis [1–6,38–42], and a myelofibrosis [1–6,39,40] are also observed in irradiated bone. So, we hypothesize that the inefficacy of the association of BCP+TBM+MSC may be due to the disappearance of the MSC, or by vascular ischemia and fibrosis of the irradiated tissue that may prevent grafting of MSC. After implantation, MSC may produce growth factors that would attract the host cells which are responsible for new bone formation [43]. Vascularization is important for the path of growth factors allowing the arrival of the host cells and thus bone formation [33,37,38,41]. But chemotaxis by MSC for the host cells may be limited by vascular insufficiency observed in irradiated tissue. Also, the recruitment by the MSC of host cells, including TBM cells, HSC, cytokines, necessary for the setting up of neo-angiogenesis, may be reduced in irradiated area [6,44–46]. So, in irradiated tissue, the absence of vascularization would not allow the MSC to produce and transmit their signals and growth factors to host cells, preventing bone formation. Also, MSC are known for their anti-inflammatory role [32]. Inflammation is necessary for new bone formation by activating the cascade of bone formation and bone resorption. We might suppose that the presence of MSC in bone defects inhibit bone formation by their anti-inflammatory action [35]. It seems interesting to study especially the role of the inflammation cells response. However, Liu and al have shown that the T cells inhibit the bone repair efficiency of the MSC, by leading to the MSC apoptosis [47]. The amount of MSC in the association BCP+TBM increased dramatically and thus could increase the LT reaction against all the MSC, derived from TBM and these

added for the experiments. These facts could explain the inefficacy of the association of BCP+TBM with addition of MSC. The irradiated bone is poor in vascular structures and so capacity of recruitment of stem cells and cytokines is limited. The TBM however can bring the cellular necessary for new-bone formation, particularly the vascular cells. From this perspective, further research will be conducted to decipher precisely the role and importance of neovascularization in bone regeneration in irradiated tissue and the role of the inflammatory microenvironment.

5. Conclusion

This study was the first testing the association of BCP+TBM+MSC, committed or not, for new-bone formation in irradiated areas. This association didn't enhance the bone formation. Interestingly the addition of MSC at TBM inhibited the osteoconductive effect of the TBM. Currently, the BCP+TBM mixture remains the most efficient strategy for bone substitution in irradiated areas. The BCP+TBM mixture may induce the angiogenesis of repair tissue and thus balance the side-effects of irradiation. However, the precise role of angiogenesis and hematopoietic cells and of inflammation in bone repair should be ascertained by further investigations.

Acknowledgments

The authors declare no industrial conflict of interest.

This work was supported by grants from “La Ligue Contre Le Cancer” foundation, committees “Pays de La Loire” and “Côtes d’Armor”.

We thank Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France) for supplying materials.

We thank Doctor Marion Eveillard for the bone marrow myelographic analysis.

Bibliography

- [1] Gal TJ M-AT. Radiation effects on osteoblasts in vitro: A potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Neck Surg* 2000;126:1124–8.
- [2] Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:1049–61.
- [3] Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:208–11.
- [4] Jegoux F, Malard O, Goyenvallée E, Aguado E, Daculsi G. Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2010;109:173–84.
- [5] Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:337–52.
- [6] Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: A new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009;47:602–7.
- [7] Head C, Alam D, Sercarz JA, Lee JT, Rawnsley JD, Berke GS, et al. Microvascular flap reconstruction of the mandible: a comparison of bone grafts and bridging plates for restoration of mandibular continuity. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 2003;129:48–54.
- [8] Goh BT, Lee S, Tideman H, Stoelinga PJW. Mandibular reconstruction in adults: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:597–605.
- [9] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002;81–98.
- [10] 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.
- [11] Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, Pollak C de, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959–63.
- [12] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997;6:125–34.
- [13] Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334–9.
- [14] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007;28:1005–13.
- [15] Mankani MH, Kuznetsov SA, Shannon B, Nalla RK, Ritchie RO, Qin Y, et al. Canine Cranial Reconstruction Using Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *Am J Pathol* 2006;168:542–50.
- [16] Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: An experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27:4566–72.
- [17] Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, Beauvillain de Montreuil C, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36:323–30.
- [18] Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials* 2009;30:763–9.
- [19] Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: Preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:103–11.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis—a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35:892–8.
- [23] Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue Engineering Approach to the Treatment of Bone Tumors: Three Cases of Cultured Bone Grafts Derived From Patients' Mesenchymal Stem Cells. *Artif Organs* 2006;30:115–8.
- [24] Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, et al. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2010;298:C355–C364.
- [25] Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B. Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J Biomed Mater Res* 1993;27:57–64.

- [26] Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl BIR* 2005;27:89–94.
- [27] Dumas J. *Rats d'élevage- Les animaux de laboratoire-*. Flammarion. Paris: 1953.
- [28] Bouler J-M, LeGeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: Influence of three synthesis parameters on the HA/ β -TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 2000;51:680–4.
- [29] Ohgushi H, Caplan AL. Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:913–27.
- [30] Miura M, Miura Y, Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis* 2006;12:514–22.
- [31] Cuturi M-C, Josien R, Cantarovich D, Bugeon L, Anegon I, Menoret S, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994;24:1627–31.
- [32] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568–84.
- [33] Cornejo A, Sahar DE, Stephenson SM, Chang S, Nguyen S, Guda T, et al. Effect of Adipose Tissue-Derived Osteogenic and Endothelial Cells on Bone Allograft Osteogenesis and Vascularization in Critical-Sized Calvarial Defects. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1552–61.
- [34] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:284–91.
- [35] Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20:161–71.
- [36] Phulpin B, Dolivet G, Marie P-Y, Poussier S, Huger S, Bravetti P, et al. Feasibility of Treating Irradiated Bone with Intramedullary Delivered Autologous Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1–9.
- [37] Boukhechba F, Balaguer T, Bouvet-Gerbetaz S, Michiels J-F, Bouler J-M, Carle GF, et al. Fate of Bone Marrow Stromal Cells in a Syngenic Model of Bone Formation. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2267–78.
- [38] Green DE, Adler BJ, Chan ME, Rubin CT. Devastation of adult stem cell pools by irradiation precedes collapse of trabecular bone quality and quantity. *J Bone Miner Res* 2012;27:749–59.
- [39] Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991;26:505–10.
- [40] Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2010;38:47–53.
- [41] Willey JS, Lloyd SAJ, Robbins ME, Bourland JD, Smith-Sielicki H, Bowman LC, et al. Early Increase in Osteoclast Number in Mice after Whole-Body Irradiation with 2 Gy X Rays. *Radiat Res* 2008;170:388–92.
- [42] Cao X, Wu X, Frassica D, Yu B, Pang L, Xian L, et al. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:1609–14.
- [43] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805–15.
- [44] Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 2004;83:204–10.
- [45] Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;8:980–9.
- [46] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004;8:498–508.
- [47] Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med* 2011;17:1594–601.

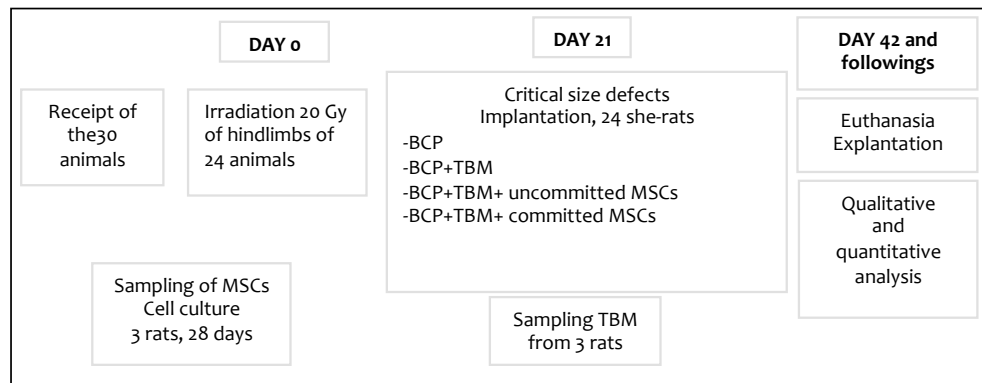


Figure 1. Outline of the protocol.

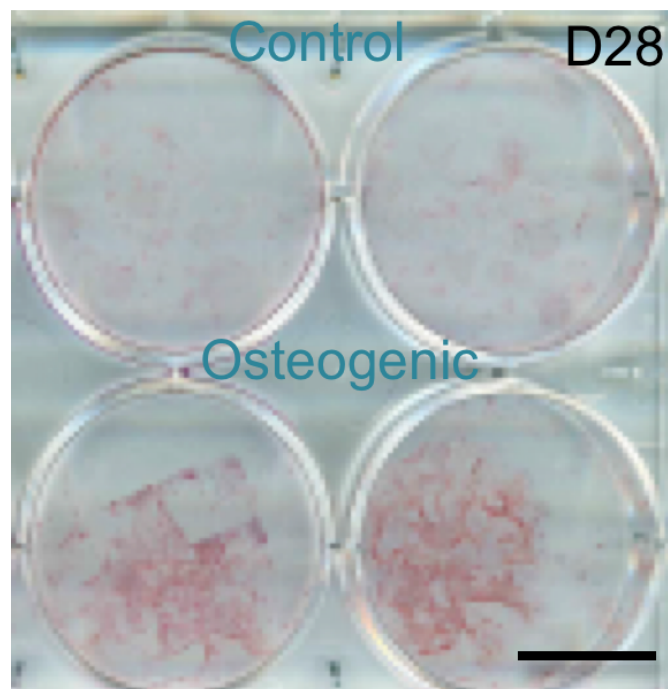


Figure 2. Calcium deposition was investigated by Alizarin Red staining as described in Materials and Methods section. Bar = 1cm.

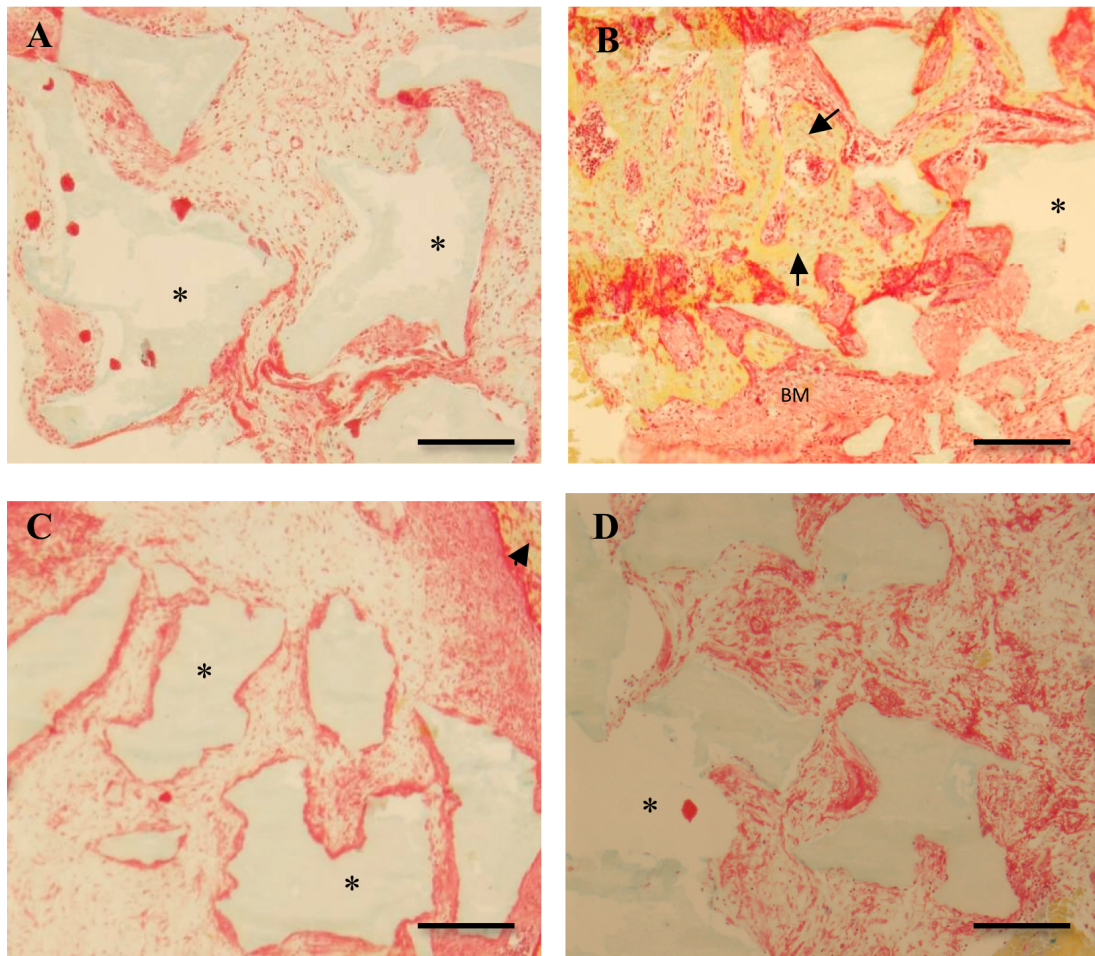


Figure 3. Movat pentachrome staining of histological sections at 3 weeks. A. Defect filled with BCP alone: fibroblast is observed in contact with BCP (*). B. Defect filled with BCP+TBM mixture: new-bone formation (arrows) is observed in contact with BCP (*). A rich bone marrow environment is seen between the BCP granules (BM). C. Defect filled with BCP+TBM mixture + uncommitted MSC: fibroblasts is observed between BCP granules. Bone repair can be observed at the periphery of the defect (arrow). D. Defect filled with BCP+TBM mixture + committed MSC: fibroblasts is observed between BCP granules. Bar = 500 μ m. (bone is colored in yellow, osteoid in red, BCP granules in white-blue).

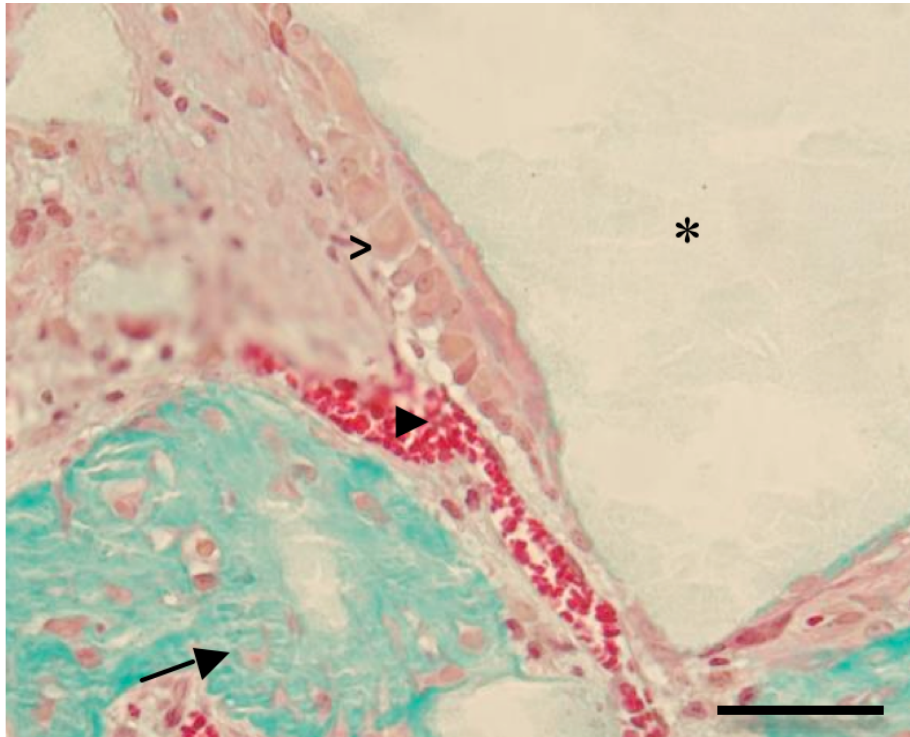


Figure 4. Histological section after Goldner staining. Defect filled with BCP+TBM mixture. Osteoid appeared in red-orange, new bone in blue. A newly formed bone (arrow) is observed in contact with BCP granules (*). Osteoblasts (>) are seen at the osteoid surface close to the vessels (▶). Bar = 100 μ m.

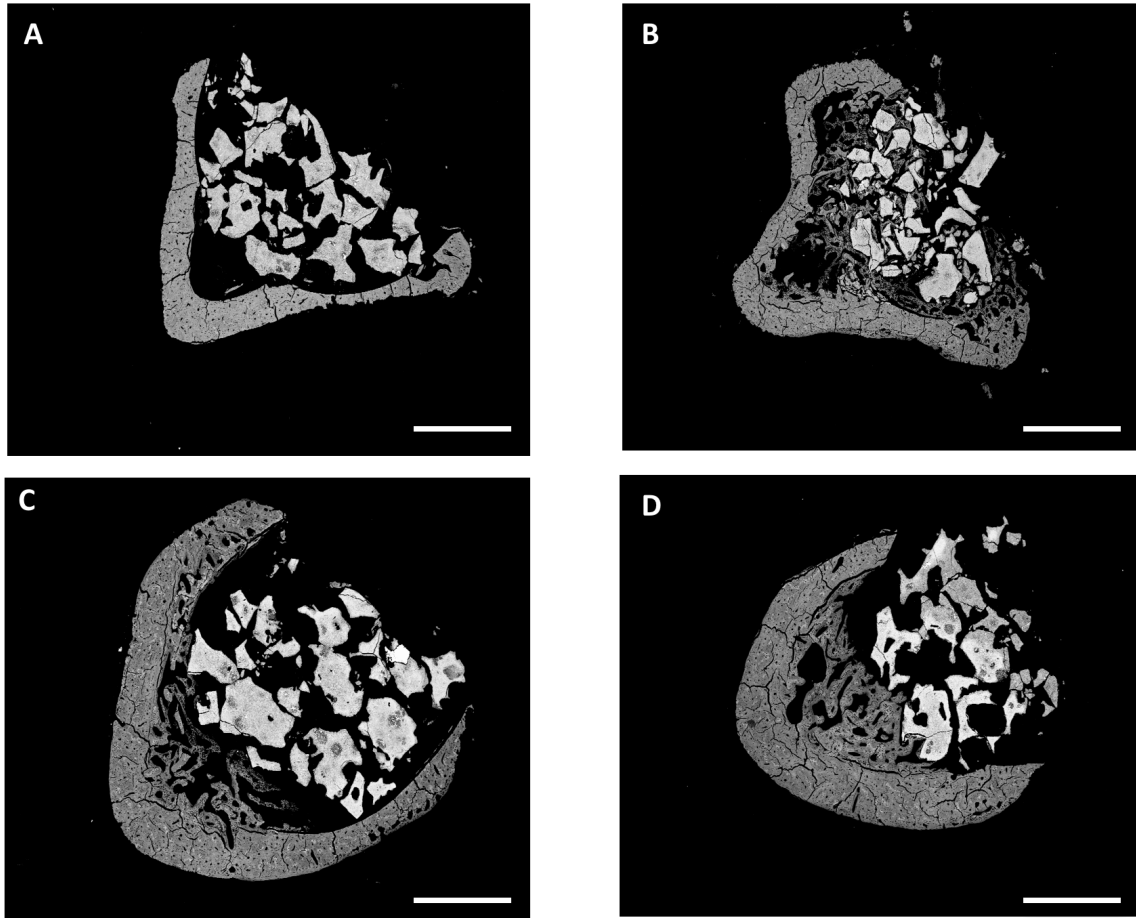


Figure 5. SEM backscattered electron images of samples. A. Defect filled with BCP alone. B. Defect filled with BCP+TBM mixture: newly formed bone is observed at the periphery and toward the center of the defect. C. Defect filled with BCP+TBM+ uncommitted MSC. Bone repair is only seen at the periphery of the defect. D. Defect filled with BCP+TBM+ committed MSC. Bone repair is only seen at the periphery of the defect. Bar = 1000 μm

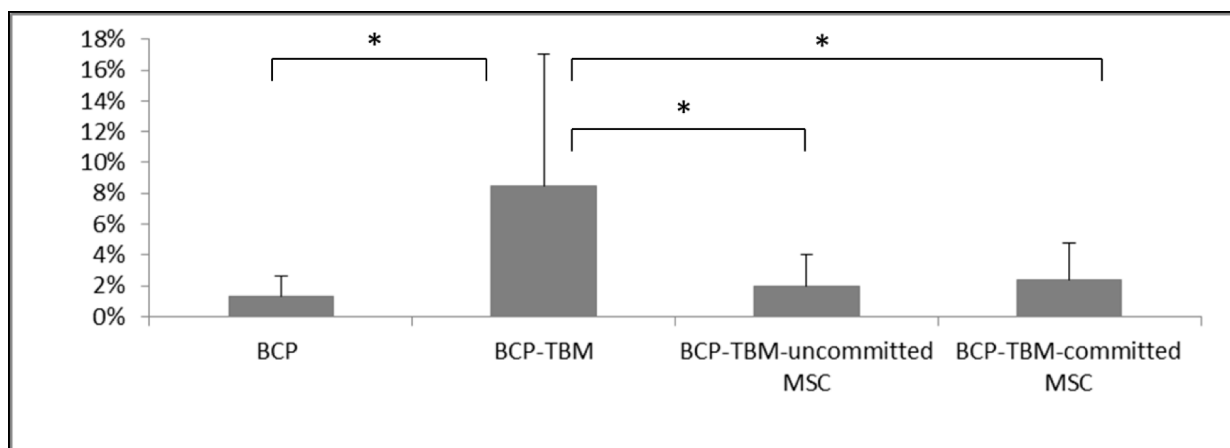


Figure 6. Bone ingrowth in osseous defects. % of new bone formation based on implantations * $p < 0.05$ as compared to BCP alone, BCP + TBM + Uncommitted MSC, and BCP + TBM + committed MSC.

L'enrichissement de la MOT par l'ajout de CSM n'a pas permis d'augmenter la néoformation osseuse en territoire irradié. De manière surprenante, il a même entraîné l'effet inverse, à savoir une diminution de l'effet osétoinducteur habituellement observé avec l'association BCP-MOT. Les différents mécanismes responsables de ces résultats restent mal compris, bien que différentes hypothèses puissent être avancées. Le fait qu'aucune autre étude similaire n'ait été recensée dans la littérature scientifique, même en tissu osseux sain, nous amène à penser que l'effet des radiations ionisantes n'est pas le seul facteur limitant de cette association MOT-CSM. Il semble que l'effet immunomodulateur des CSM ait influé sur les cellules de la MOT en inhibant la réaction inflammatoire nécessaire au déroulement de la cicatrisation osseuse.

IV.3. Evaluation de la néoformation osseuse en territoire irradié après implantation d'une association de fraction vasculaire stromale du tissu adipeux au BCP

Lors de la première étude, l'utilisation des CSM issues du tissu adipeux, à l'instar des CSM issues de la moelle osseuse, ne nous a pas permis de favoriser la réparation osseuse en territoire irradié, malgré leurs capacités ostéoprogénitrices. Le manque de facteurs de croissance et de progéniteurs endothéliaux lors de la seule présence des CSM a été l'hypothèse principale permettant l'explication de nos résultats, en comparaison avec le milieu favorable apporté avec l'ensemble des éléments constituant la MOT. Ainsi, cette nouvelle étude a utilisé, en association au BCP, la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux (FVS) pour favoriser la néoformation osseuse. A partir d'un prélèvement de tissu adipeux sous-cutané, la FVS est obtenue après digestion enzymatique de la graisse. Elle est alors constituée de CSM possédant des caractéristiques proches de celles de la moelle osseuse, mais également de précurseurs endothéliaux, et d'un ensemble de facteurs de croissance et de cytokines. La FVS constitue donc un réservoir de CSM plus important que la moelle osseuse et apporte, en plus des CSM, un environnement qui semble propice à la néoformation osseuse, que l'on peut rapprocher de la moelle osseuse totale.

Utilisant notre modèle animal de séquelles osseuses d'irradiation, des pertes de substance osseuse tibiales et fémorales ont été créées 4 semaines après l'irradiation des animaux. Elles ont été comblées par de la MOT ou de la FVS seules ou associées au BCP. Trois semaines après les implantations, les analyses qualitatives et quantitatives ont montré une néoformation osseuse significativement en faveur de l'association BCP-MOT ($p < 0,05$). L'association BCP-SVF a permis une néovascularisation de la perte de substance osseuse, sans toutefois permettre de néoformation osseuse. Les hypothèses

de l'insuffisance de facteurs de croissance osseux au sein de la SVF et de l'incapacité des CSMTA à se différencier en ostéoblastes en territoire irradié ont été avancées.

Preservation of the pro-angiogenic potential of the stromal vascular fraction from adipose tissue in the regeneration of irradiated bone

Audrey Thery^{a,b,e}, Pauline Bléry^{a,c,e}, Olivier Malard^{a,b,e}, Paul Pilet^{a,c}, Sophie Sourice^a, Pierre Corre^{a,d,e}, Jérôme Guicheux^{a,c,e}, Pierre Weiss^{a,c,e}, Florent Espitalier^{a,b,c,e*}

^a INSERM, UMRS 791, Laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

^b Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 1, France

^c Université de Nantes, UFR Odontologie, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

^d Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 1, France

^e Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Pôle hospitalo-universitaire 4 OTONN

* Corresponding author. E-mail address: florent.espitalier@chu-nantes.fr

Fax: +33 2 40 08 34 77

Abstract

Total bone marrow (TBM), in association with biphasic calcium phosphate (BCP), is the best combination for bone regeneration in an irradiated area. Recently, the stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue was described as an alternative to TBM for obtaining mesenchymal stem/stromal cells and promoting new bone formation. The aim of this study was to (i) identify the capacity of a freshly isolated SVF to induce neoangiogenesis and new bone formation in an irradiated area and (ii) compare TBM and SVF implantations. Four weeks after external radiation (20 Gy) of rat hind limbs, four bone defects were created per animal and filled with either SVF or TBM with and without BCP. Three weeks after the implantations, analyses showed that the BCP-TBM mixture improved bone ingrowth after radiation ($p < 0.05$). The BCP-SVF association induced significant neoangiogenesis but failed to enhance new bone formation. We hypothesize that a deficiency of cytokines and growth factors in the SVF together with a lack of differentiation of the cells into osteogenic pathway led to this limited bone formation, rather than a defect in vascularization. Therefore, we found that the BCP-TBM association remains the most effective material for the repair of irradiated bone.

Keywords: bone regeneration; irradiated bone; bone marrow graft; stromal vascular fraction; adipose tissue; calcium phosphate scaffold

1. Introduction

The treatment of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract usually requires tumor removal and external radiation therapy. One of the most dreaded side-effects of radiotherapy is osteoradionecrosis of the jaw, for both functional and aesthetic reasons [1]. Unfortunately, the number of therapeutics available to effectively treat these sequels is limited. When osteoradionecrosis requires the removal of a large amount of bone, the standard reconstruction procedure is a free flap transfer of autogenous bone [2]. However, this long surgery cannot be performed in patients with a poor general condition. Furthermore, there are complications associated with this procedure, such as free flap failure, and side-effects, such as pain at the site of bone harvesting. In this context, a tissue engineering strategy using biphasic calcium phosphate (BCP) has been developed as an alternative to the standard reconstruction procedure. Preclinical studies have shown that total bone marrow (TBM) associated with BCP can enhance bone formation in irradiated tissue [3,4]. By contrast, another study has demonstrated that the use of mesenchymal stem/stromal cells (MSC) in association with BCP is ineffective at the promotion of ossification, which is likely a function of the cellular and vascular weaknesses observed in irradiated bone [5].

Over the past decade, adipose tissue has been considered a cellular source for regenerative medicine [6]. Indeed, numerous publications have investigated the potential for tissue regeneration of the stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue [6,7]. Obtained from the enzymatic digestion of fat tissue, the SVF contains a variety of cells types, including endothelial progenitors and adipose-derived MSC (ASC) [8]. *In vitro*, ASC have differentiation capacities along multiple pathways, including adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages [9]. Able to regenerate soft tissue [10] and cartilage [11], the SVF has also been reported as an enhancer of bone ingrowth [12]. It is known that bone formation is an angiogenesis-dependent process [13], since studies have shown that osteoblast precursors may use the blood vessels along the abluminal surface of the endothelium

as a conduit to support their entry in the new bone [14,15]. In this context, endothelial cells obtained from SVF culture have been shown to enhance orthotopic bone regeneration [16]. In a hypotrophic tissue, such as an irradiated area, the vasculogenic properties of the SVF [17,18] could synthesize and support the vascular network needed for ossification. Therefore, we hypothesized that the SVF could be considered as an alternative to TBM because of its potential in bone reconstruction when used freshly digested [19,20], its ease in collection, and its availability in large quantities. The purpose of this study was to (i) evaluate the role of a freshly isolated SVF in promotion of neovascularization and bone formation in an irradiated condition and (ii) compare its results to those of the BCP-TBM association, currently the most efficient mixture for repair of irradiated bone.

2. Materials and methods

2.1 BCP

The biomaterial used in this study was granules of macroporous BCP (MBCP™, Biomatlante; Vigneux de Bretagne, France). The size of the granules was around 800 µm, and they were composed of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate in a 60:40 ratio, which corresponds to a 1:60 ratio of Ca:P. The measured mean porosity was around 40 ± 10%. Eppendorf tubes (Corning Inc.; Corning, NY, USA) containing 0.015 g of MBCP™ were steam-sterilized at 121°C for 20 min before implantation.

2.2 Animals

The study was performed on eight-week-old inbred Lewis 1A-haplotype RT1^a rats (n = 25), provided by a certified breeding centre (R. Janvier; Le Genest St. Isle, France), weighing approximately 250 g. Animal care was provided by the Experimental Therapeutic Unit (Research Scientific Institute, Nantes University, France), in accordance with the European directive number

DE 2003/65/CE. The study design was approved by the Ethics Committee (CEEA. 2012.82). The outline of the whole protocol is presented in Figure 1. Five rats were specially designated as cell graft donors: TBM was extracted from the femurs, and the SVF was extracted from the abdominal and peri-inguinal fat. Twenty rats underwent external radiation delivery. Bone defects and implantations were performed four weeks after irradiation. Three weeks after implantation, the implanted bones were removed just after the animals were sacrificed.

2.3 Radiation delivery procedure

Twenty rats were irradiated according to a previously described protocol [5]. The external fractionated radiation delivery was initiated and performed on the radioactivity platform (Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France). Radiation was delivered under general anesthesia induced with an isoflurane inhalation (Forene[®], Abbott France; Rungis, France) and preserved with an intramuscular injection (5 mg/100 g of body weight) of ketamine (Imalgene[®], Merial; Lyon, France) and with an intraperitoneal injection (2 mg/100 g of body weight) of sodium thiopental (Pentothal[®], HospiraTM France; Meudon La Forêt, France). The irradiation fields were localized on the hind limbs (including tibiae and femurs) and a lead bridge protected the rest of the body. External radiation was delivered with X-rays at 160 kV and an intensity of 6.3 mA using a Faxitron X-Ray system (Faxitron X-Ray Corporation; Wheeling, IL, USA). The total time of irradiation was 28.9 min, which was needed to obtain the required dose of 20 Gy. We calculated that this single dose of 20 Gy was equivalent to a 60 Gy multi-fractionated delivery dose. Seven rats died as a consequence of irradiation.

2.4 Surgical procedure

Four weeks after irradiation, thirteen rats received implantations.

2.4.1 Anesthesia and euthanasia protocols

All of the surgical procedures were performed under general anesthesia using 4% isoflurane inhalation for induction and 2% for preservation. The rats were sacrificed using an overdose of sodium thiopental.

2.4.2 Isolation of the SVF

On the day of implantation, the SVF was isolated from five rat donors. Under general anesthesia, the inguinal subcutaneous adipose tissue was removed after a median abdominal incision. The tissue was washed with sterilized saline solution, minced, and treated with 0.5 mL of Celase® (Cytos Therapeutics; San Diego, CA, USA) at 37°C with gentle agitation for 1 h. After digestion and centrifugation (5 min at $600 \times g$), 5 mL of fetal bovine serum (FBS, PAN-Biotech; Aidenbach, Germany) were added to the pellet twice to neutralize the enzymatic reaction. Then the mixture was filtered through a 70 μm cell strainer (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA). The cell pellet was resuspended in saline solution, and the nucleated cells were counted using the trypan blue exclusion test. An average of 5×10^6 cells were implanted in each defect.

2.4.3 Isolation of the TBM

The TBM was collected on the day of implantation from femurs of three non-irradiated donors and prepared for an extemporaneous graft. Both extremities of each femur were cut, and 1 mL of saline serum was infused through the medullar cavity. The bone marrow was collected and centrifuged (5 min at $600 \times g$). The cell pellet was resuspended in saline serum, and nucleated cells were counted using a trypan blue exclusion test. The TBM was immediately placed into tubes containing an anticoagulant (Vacuette Premium®, Greiner Bio-One; Frickenhausen, Germany). An average of 2.5×10^6 cells were implanted into each defect.

2.4.4 Preparation of the implants and defect filling

The SVF or TBM cells were suspended in the serum solution, with or without BCP (0.015 g). Four defects 3 mm in diameter were created per animal on irradiated tibiae and femurs. Five kinds of implants were prepared 5 min prior to their addition:

- BCP: granules only, mixed with 20 μ L of saline serum.
- BCP-TBM: mixture of granules and 2.5×10^6 TBM cells in 20 μ L of saline serum.
- BCP-SVF: mixture of granules and 5×10^6 SVF cells in 20 μ L of saline serum.
- TBM: 2.5×10^6 TBM cells in 20 μ L of saline serum.
- SVF: 5×10^6 SVF cells in 20 μ L of saline serum.

After implantation, the muscle surrounding the bone defects was replaced and sewn to maintain the implants at the site. The subcutaneous tissue and skin were sutured in different layers. Postoperative analgesia was immediately supported with a subcutaneous injection of Nalbuphine® (0.4 mg/kg, Mylan France; Cedex, France) and subsequently with simple analgesics.

In total, 52 defects were created and filled with the various implants ($n = 10$ for BCP, BCP-TBM, and TBM and $n = 11$ for BCP-SVF and SVF). Four rats died after implantation. Three weeks after the surgical procedure, all of the animals were sacrificed. The femurs and tibiae were then dissected and removed for analysis ($n = 36$).

2.5 Study of the explants

Twelve explants were excluded from the analysis:

- Eleven femoral fractures were identified during the removal.
- One defect (BCP-TBM) was incorrectly filled because granules were found outside the defect.

Twenty-four samples were finally harvested and analyzed. Each bone specimen was fixed with a 10% neutralized formalin solution over a five-day period.

2.5.1 Histological examination

After dehydration through a graded series of ethanol and acetone incubations, the non-decalcified bone specimens were infiltrated and embedded in methyl methacrylate (MMA) resin, which hardens at low temperatures (Technovit® 9100 NEW, Kulzer; Hanau, Germany). The basis solution was used in its destabilized form. After numerous steps of preinfiltration and infiltration, the polymerization mixture was made directly prior to use, and each embedded sample was placed at -20°C for a period of five-days until the end of the polymerization process. The samples were then stored at 4°C . When ready, the samples were brought to room temperature, and serial $5\text{ }\mu\text{m}$ sections were cut perpendicular to the osseous defects and surrounding bone using a diamond saw made for non-decalcified tissues (Polycut Leica SM2500, Leica Biosystems; Wetzlar, Germany). The bone sections were stained with Movat's pentachrome stain and observed under a light microscope (Axioplan 2, Zeiss; Jena, Germany).

2.5.2 Scanning electron microscopy (SEM) and quantitative image analysis

After histological sectioning, the MMA-embedded bone specimens were sanded with a Metaserv 2000 (Buehler; Lake Bluff, IL, USA) and then coated with gold-palladium using a Desk III (Denton Vacuum; Moorestown, NJ, USA). SEM studies on the implanted defects were performed with backscattered electrons (Leo 1450 VP, Zeiss; Jena, Germany) in conjunction with image analysis. The defect boundaries were determined, and the bone and ceramic areas were identified using software with a grey-scale threshold determination. The quantity of newly formed bone and ceramic degradation was determined using a semi-automatic image analyzer procedure from the SEM observations (Leica Microsystems; Milton Keynes, UK) as previously described [21]. The quantity of newly formed bone, soft tissue, and remaining BCP were automatically calculated within the

implanted areas. Their respective surfaces are expressed in mm² and as the relative percentage $\pm$ standard deviation for each component.

2.5.3 CD31 staining of microvessel density analysis

Microvessel density analysis was performed using a primary rabbit anti-rat antibody for CD31 (Abcam; Cambridge, UK). After polymer removal and rehydration, antigen retrieval was performed on the sections using a Tris-EDTA Buffer solution pH 9 (Dako; Glostrup, Denmark) at 90°C. The sections were then incubated in a 3% solution of hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) to block endogenous peroxidase activity in the tissue. Non-specific binding of immunoglobulins was blocked through incubation with a 10% solution of goat serum (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) and 4% BSA. The primary antibody CD31 was added at a dilution of 1:500. After incubation overnight (4°C), the slides were washed three times with PBS and then incubated with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (Dako; Glostrup, Denmark), at a dilution of 1:300, at 37°C for 1 h. The slides were incubated for 45 min with streptavidin-peroxidase (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, USA). Finally, the sections were reacted with a diaminobenzidine kit (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, USA). The slides were dehydrated and mounted with Eukitt® (Kindler GmbH; Steinberg, Austria) after dipping in a methylcyclohexane solution. For each slide, four hot spots were selected and observed at 100 $\times$ magnification under a light microscope (Axioplan 2, Zeiss; Jena, Germany). The brown cells were identified and calculated as a newly formed blood vessel. The data were statistically analyzed.

2.6 Statistical analysis

The different conditions were compared using the Mann-Whitney test for unpaired comparisons after validation using the Kruskal-Wallis test. For each test, a p value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Radiation delivery and surgical procedures

Despite lead protection, seven rats died of dehydration after irradiation because of a gastro intestinal tract injury, a typical complication following radiation [22]. The usual external radiation-related side-effect (reversible, grade 1 dermatitis) was also observed. The surgical procedure was not well tolerated in four of the rats. These rats died between the first and thirteenth day from general anesthesia and radiation-induced weakness. There was neither osseous infection nor osseous exteriorization, and no graft-versus-host disease was observed. Nine rats were sacrificed three weeks after implantation, and 24 samples were analyzed. Among the analyzed defects, six were filled with BCP, four with BCP-TBM, four with BCP-SVF, six with TBM, and four with the SVF.

3.2 Histological examination

The aspects of the newly formed bone, connection between BCP and the surrounding tissues, and formation of blood vessels in the osseous defects were evaluated. In the defects filled with BCP-TBM or TBM alone, new bone formation was observed. In the BCP-TBM mixture implantations, the bone was in contact with the granules, while in the TBM implantations, bone debris from the drilling were in contact with the newly formed bone. In both conditions, osteoblasts were located in a palisade arrangement, allowing it to synthesize the osteoid matrix. Numerous vessels and cells surrounded the newly formed bone. When the BCP granules were implanted on their own, fibroblastic cells, compatible with the hypocellular state of irradiated bone marrow, surrounded the granules. In the presence of the SVF, with or without BCP, no bone formation was observed, though various vessels were identified, especially neighboring the granules (Fig. 2).

3.3 SEM and image analysis

The qualitative SEM study was correlated with the histological examinations. SEM analysis was performed to quantitate the new bone formation and ceramic degradation using a grey-scale threshold (Fig. 3).

3.3.1 Bone ingrowth

The rate of bone ingrowth was significantly higher after implantation of the BCP-TBM mixture, in contrast to implantation with the BCP-SVF mixture, SVF alone, or BCP alone (Fig. 4). There was no significant difference in bone ingrowth between defects filled with TBM (10.68%) versus BCP-SVF (0.39%) or SVF (0.50%).

3.3.2 Ceramic degradation

The quantitative analysis of ceramic degradation showed a significant difference between defects filled with BCP-TBM versus BCP alone or BCP-SVF. Indeed, the degradation of the biomaterial was significantly higher when it was associated with bone marrow for three weeks than with the other conditions (Fig. 5).

3.4 Vessel staining

The sections were immunohistochemically analyzed using a specific antibody against the endothelial marker CD31 (Fig. 6). The number of capillaries surrounded by CD31+ labeling was manually counted. The BCP-SVF mixture promoted significantly more vascularization than BCP alone (Fig. 7). The BCP-TBM mixture, TBM, or SVF induced neoangiogenesis, but these results were not significantly different to BCP.

4. Discussion

The treatment of squamous cell carcinomas of the aerodigestive tract generally requires radiotherapy. Despite the benefits of irradiation, the side-effects can cause pain and impair the quality of life of patients [1]. From an histological point of view, the bone is weakened and the mechanical properties are affected after irradiation [23]. Proliferation and differentiation of osteoblasts are decreased and the bone morphology is modified, which is related to the hypocellularity and reduction in vascular network [24]. These irradiation-related side-effects could explain the delay in fracture union and osteoradionecrosis that is sometimes observed after this procedure [25]. The benefits observed with the addition of TBM on bone repair in preclinical studies [3-5] is thought to be related to the presence of stem cells, endothelial cells, and growth factors inside the marrow.

The SVF is a mixture of several cells lineages, isolated from adipose tissue after enzymatic digestion. It contains high numbers of T regulatory cells, endothelial cells, and smooth muscle cells [26]. Additionally, the SVF from adipose tissue is a rich source of MSC, containing up to 500× more than bone marrow [27]. ASC have been shown to have multiple differentiation capacities *in vitro* [9]. The SVF can be used to repair the myocardium [17], vascular network [28], or bone [29]. The osteogenic capacities of these cells are strongly potentiated by the addition of biomaterial or bone morphogenetic protein (BMP) or by osteogenic differentiation prior to implantation [12,29,30]. Moreover, endothelial cells derived from the SVF and added to differentiated ASC have been shown to enhance newly formed bone [16]. Recently, publications have described the capacity of a freshly isolated SVF to improve bone ingrowth [19,20]. The abundance of MSC in the SVF compared to bone marrow, relative ease of harvesting, the large quantities of available fat tissue, and rapidity of obtaining make the SVF an attractive alternative to TBM for one-step surgical procedures in regenerative medicine. Thus, this work was the first identified for the study of the SVF osteoinductive capacity in irradiated bone.

The animal model used in this work has been previously developed to mimic the side-effects of irradiation on bone [4,5]. Lewis 1A-haplotype RT1^a inbred rats were selected because of their tolerance to bone marrow allografts, making immunosuppressive treatment unnecessary. However, the fragility of these rats and the side-effects of the radiation treatment necessitated an increase in the quantity of animals included in the study for statistical reasons.

External radiation was delivered with a single fraction of 20 Gy. This dose is the biological equivalent of a 60 Gy multi-fractionated delivery, which is routinely used for the treatment of squamous cell carcinomas of the upper digestive tracts in humans. Given the difficulty in protecting the brain of these animals, the decision was made to irradiate the hind limbs instead of the mandible.

BCP was chosen as a bone filling material because of its biocompatibility, biodegradability, and osteoconductivity [31]. This phosphocalcic biomaterial is commonly used for bone substitution in procedures without any previous irradiation (orthopedic and dental surgeries). Furthermore, a synergistic effect between BCP and TBM has been previously demonstrated in bone repair after irradiation in rats [4,5].

The new bone formation that we observed in the defects filled with TBM was confirmed with quantitative analysis. The BCP-TBM mixture formed significantly more bone than BCP, BCP-SVF, or SVF; therefore, the contribution of the SVF was not equivalent to the TBM. Moreover, BCP was quickly resorbed in the presence of TBM, demonstrating efficient bone remodeling. These results are in accordance with previous studies, where a BCP-TBM mixture significantly enhanced bone formation in irradiated bone defects [3,5].

Histological examination of the BCP-SVF slides revealed granules surrounded by many blood vessels. The vascular network detected with CD31 labeling was significantly more developed when the defects were filled with BCP-SVF than with BCP alone. Otherwise, no significant differences in the vascular network were found between the defects filled with the SVF or TBM. Despite the

crucial role that vascularization plays in bone remodeling [13], BCP-SVF-induced neoangiogenesis failed to form new bone three weeks after implantation. Interestingly, a study performed in an ectopic, non-irradiated area using mesenchymal and endothelial progenitors from adipose tissue with hydroxyapatite scaffolds showed only capillaries at one, two, and four weeks after implantation, whereas bone ingrowth was present from the eighth week [16]. However, the discordant increased bone formation observed in our study with the BCP-TBM mixture after a three week period may reflect the need for additional time to obtain newly formed bone with implanted ASC in irradiated bone. These cells may not differentiate directly into osteoblasts and act instead as a recruiter and enhancer for host osteoprogenitor cells [32], which are brought during the neovascularization by the angiogenic-osteogenic coupling [14,15].

It is important to note that the previous studies addressing the *in vivo* osteogenic capacity of ASC in ectopic models preferentially used pre-differentiated cells [29], cells transfected with BMP-2 [30], or committed SVF cells cultured in a three-dimensional perfusion [33]. When a SVF was freshly used, it could only form a vascular network [30,34]. Therefore, the SVF constitutes a highly relevant reservoir of vascular progenitors [29], which can form vessels even in irradiated bone.

Many studies have addressed the effectiveness of ASC in *in vivo* bone healing in orthotopic models [12,19,20,35], independent of the type of scaffold used or the pre-differentiation of ASC. While such systems have the advantage of providing a more clinically relevant model, they do not easily allow the evaluation of the direct contribution of the implanted cells to the generation of bone tissue [29]. In our study, the bone-forming capacity of TBM in association with BCP were not fully elucidated, but a previous study performed in irradiated areas showed that MSC alone were insufficient to reconstruct bone and suggested that the presence of the different types of cells and cytokines inside the TBM were necessary to reconstruct bone [5]. In studies conducted in non-irradiated bone, ASC can differentiate into osteogenic tissue, likely because of the local wound milieu created by the surrounding osteoblasts and bone growth factors [36]. Interestingly, a

previous study showed that ASC engrafted into a chronic bone defect could not enhanced bone healing, compared with the bone repair observed in an acute defect. The absence of increased BMP expression (BMP2, BMP4, and BMP7) in the chronic defect was proposed to explain these contradictory results [36]. The decreased expression of BMP observed in irradiated bone [37] suggests that, as in chronic bone defects, the intake of ASC are insufficient to repair bone, despite the neovascularization that occurs. Furthermore, the difference of osteogenic capacities between ASC and BMSC [38], in association with the lack of growth factors resulting from irradiation, may have limited bone formation and explain our results obtained with the BCP-SVF mixture. To avoid these limiting factors, the association of TBM and SVF could be proposed in further studies, in order to promote both neovascularization and bone formation in irradiated areas.

5. Conclusions

This study evaluated the role of the SVF from rat adipose tissue in new bone formation in an irradiated area and compared these results to the osteoinductive capacity of TBM in association with BCP. Histological examination and SEM analysis revealed no bone ingrowth in the presence of SVF, while immunohistochemical examination showed a significant vascular network. Our results demonstrate that TBM can induce an efficient vascular network and chemotaxis between host and donor cells, enhancing bone formation in an irradiated area. By contrast, the SVF stimulates neoangiogenesis without bone ingrowth. These results suggest that the role of the environment might be important for ossification, particularly growth factors. Without osteogenic factors, SVF cells tend to spontaneously induce angiogenesis. Therefore, the SVF constitutes a highly relevant reservoir of vascular progenitors, which can form vessels even in irradiated bone. Finally, BCP associated with TBM appears to be the most efficient combination for bone reconstruction after radiotherapy. The precise role of angiogenesis, stem cells, osteogenic growth factors, and cytokines should be ascertained with further investigations.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the “La ligue contre le cancer-interrégion grand ouest” foundation, committees “Loire Atlantique”, “Côtes d’Armor”, and “Maine et Loire”.

We would like to thank Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France) and Cytori Therapeutics (San Diego, USA) for supplying the materials used in this study. We would also like to thank Pr Fraser, Dr Eveillard (bone marrow myelographic analysis), Marine Lombard, Vincent Hivernaud, and Pauline Colombier for their contributions to this work.

References

1. Chang EI, Leon P, Hoffman WY, Schmidt BL. Quality of life for patients requiring surgical resection and reconstruction for mandibular osteoradionecrosis: 10-year experience at the University of California San Francisco. *Head Neck* 2012;34(2):207–12.
2. Hidalgo DA. Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1989;84(1):71–9.
3. Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36(2):323–30.
4. Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27(26):4566–72.
5. Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials* 2009;30(5):763–9.

6. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279–95.
7. Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells* 2011;29(5):749–54.
8. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Translat Med* 2007;5(1):55.
9. Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med* 2012;7(2):225–35.
10. Liu B, Tan X-Y, Liu Y-P, Xu X-F, Li L, Xu H-Y, et al. The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet-rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation. *Tissue Eng Part C Methods* 2013;19(1):1–14.
11. Veronesi F, Maglio M, Tschon M, Aldini NN, Fini M. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: State-of-the-art in in vivo studies. *J Biomed Mater Res A* 2013;[Epub ahead of print].
12. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GRD. In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Tissue Eng* 2007;13(3):619–27.
13. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5(6):623–8.

14. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010;19(2):329-44.
15. Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013;99(3):170-91
16. Güven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials* 2011;32(25):5801–9.
17. Van Dijk A, Naaijken BA, Jurgens WJFM, Nalliah K, Sairras S, van der Pijl RJ, et al. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Research* 2011;7(3):219–29.
18. Feng Z, Ting J, Alfonso Z, Strem BM, Fraser JK, Rutenberg J, et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(12):3874–84.
19. Kim A, Kim DH, Song HR, Kang WH, Kim HJ, Lim HC, et al. Repair of rabbit ulna segmental bone defect using freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction. *Cytotherapy* 2012;14(3):296–305.
20. Rhee SC, Ji Y, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon E-S. In vivo evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev* 2011;20(2):233–42.

21. Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B. Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J Biomed Mater Res* 1993;27(1):57–64.
22. Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl* 2005;27:89–94.
23. Barth HD, Zimmermann EA, Schaible E, Tang SY, Alliston T, Ritchie RO. Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. *Biomaterials* 2011;32(34):8892–904.
24. Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg* 2010;38(1):47–53.
25. Markbreiter LA, Pelker RR, Friedlaender GE, Peschel R, Panjabi MM. The effect of radiation on the fracture repair process. A biomechanical evaluation of a closed fracture in a rat model. *J Orthop Res* 1989;7(2):178–83.
26. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* 2012;10:172.
27. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150–4.
28. Sheng L, Yang M, Li H, Du Z, Yang Y, Li Q. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *Tohoku J Exp Med* 2011;224(3):229–34.
29. Scherberich A, Müller AM, Schäfer DJ, Banfi A, Martin I. Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol* 2010;225(2):348–53.

30. Mehrkens A, Saxer F, Güven S, Hoffmann W, Müller AM, Jakob M, et al. Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater* 2012;24:308–19.
31. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(395):81–98.
32. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 2009;17(6):939–46.
33. Müller AM, Davenport M, Verrier S, Droeser R, Alini M, Bocelli-Tyndall C, et al. Platelet lysate as a serum substitute for 2D static and 3D perfusion culture of stromal vascular fraction cells from human adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 2009;15(4):869–75.
34. Müller AM, Mehrkens A, Schäfer DJ, Jaquiere C, Güven S, Lehmicke M, et al. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater* 2010;19:127–35.
35. Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS ONE* 2010;5(6):e11177.
36. Levi B, James AW, Nelson ER, Peng M, Wan DC, Commons GW, et al. Acute skeletal injury is necessary for human adipose-derived stromal cell-mediated calvarial regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2011;127(3):1118–29.
37. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, et al. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61(4):1189–96.
38. Brocher J, Janicki P, Voltz P, Seebach E, Neumann E, Mueller-Ladner U, et al. Inferior ectopic bone formation of mesenchymal stromal cells from adipose tissue compared to bone marrow: Rescue by chondrogenic pre-induction. *Stem Cell Res*;2013;11(3):1393-406.

Figure captions

Fig. 1. Outline of the protocol presenting the different events and deadlines.

Fig. 2. Images of histological sections of samples explanted 3 weeks after implantation (Movat's pentachrome stain). Defects filled with BCP alone (A), BCP-SVF (B), BCP-TBM (C), SVF alone (D), TBM alone (E). New bone formation (arrows) appeared green after staining in both defects filled with TBM. Biomaterial appeared blue (BCP).

Fig. 3. SEM backscattered electron images of samples explanted 3 weeks after implantation. Defects filled with BCP alone (A), BCP-SVF mixture (B), BCP-TBM mixture (C), SVF alone (D), TBM alone (E). A grey-scale threshold differentiates new bone formation (dark grey) from ceramic phosphocalcic (light grey).

Fig. 4. Bone ingrowth in osseous defects (representation in percentage of newly formed bone). Medians and quartiles of samples $n = 24$ (* $p = 0.021$).

Fig. 5. Degradation of BCP in osseous defects (representation in percentage of residual BCP). Medians and quartiles of samples with BCP $n = 14$ (* $p = 0.021$, ** $p = 0.011$).

Fig 6. Sections from a sample of BCP-SVF filling. Correlation between Movat's pentachrome stain (A) and immunohistochemistry CD31 labeling (B) highlighting the blood vessels (arrows).

Fig 7. Number of vessels per section. Medians and quartiles of samples $n = 24$ (* $p = 0.027$).

Figure 1

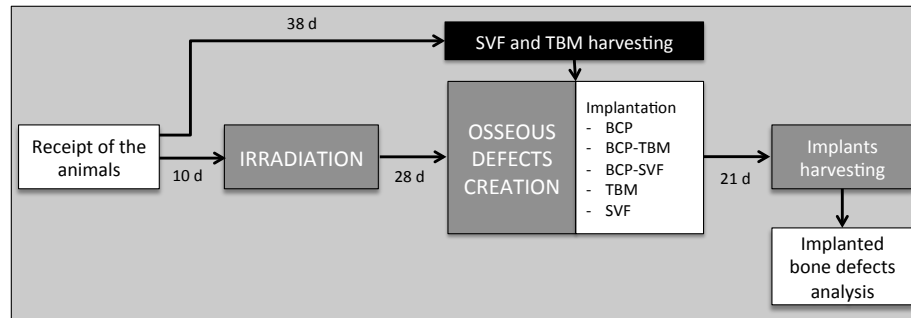


Figure 2

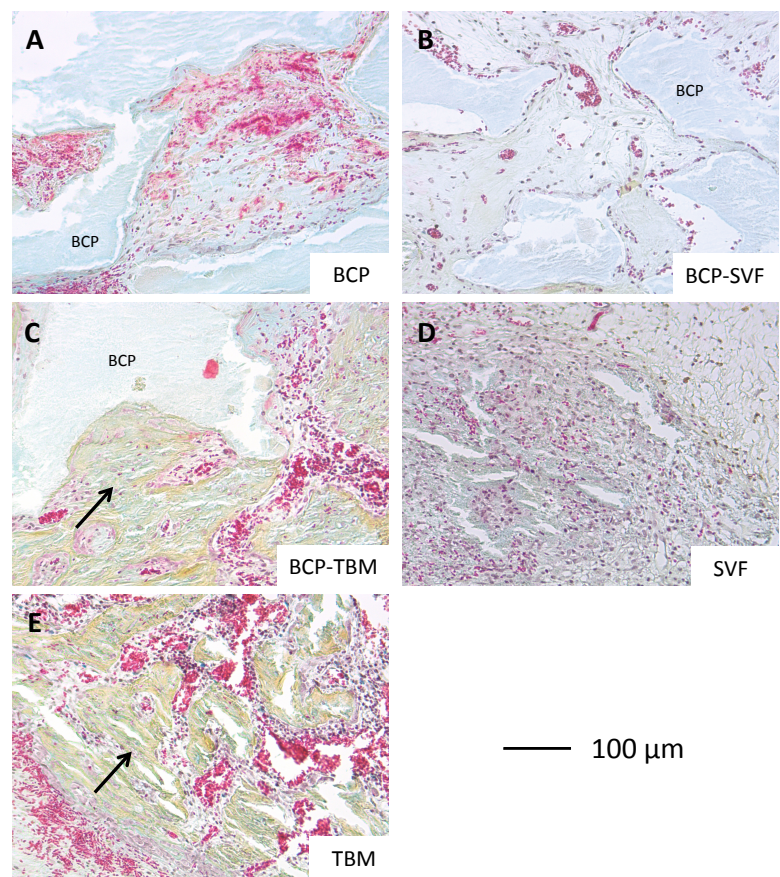
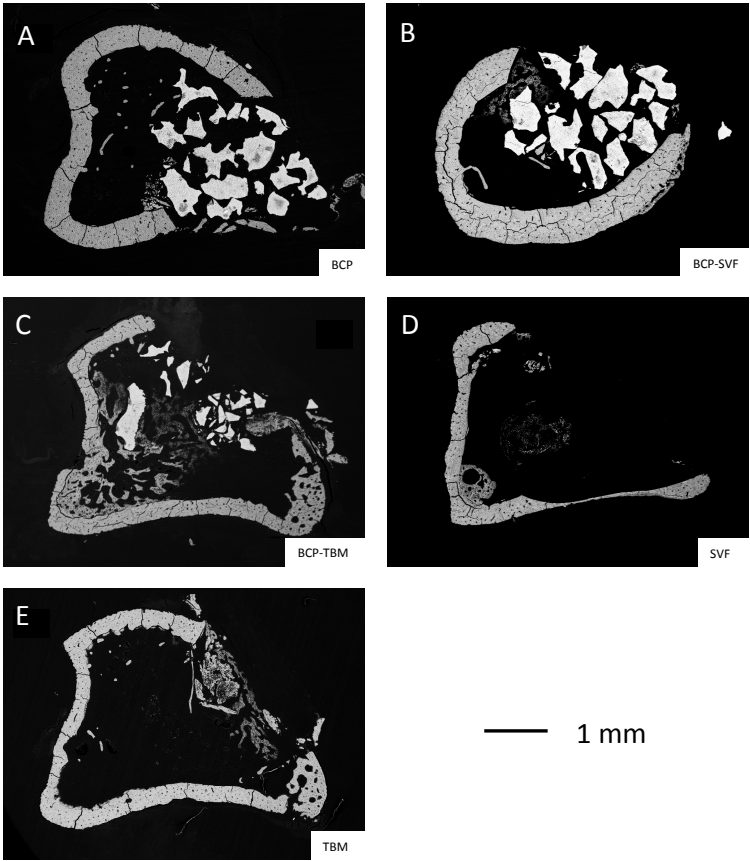
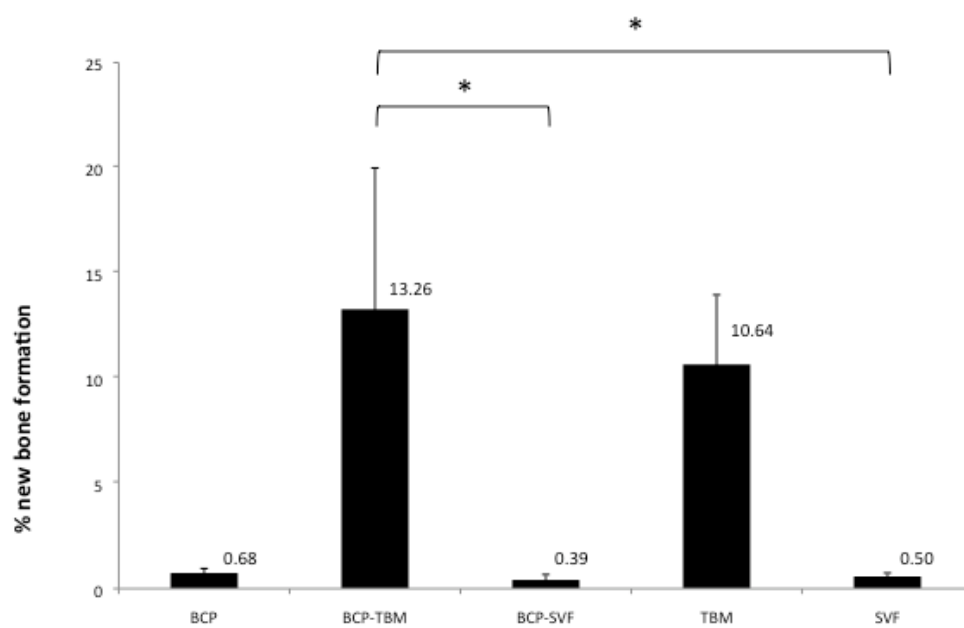


Figure 3





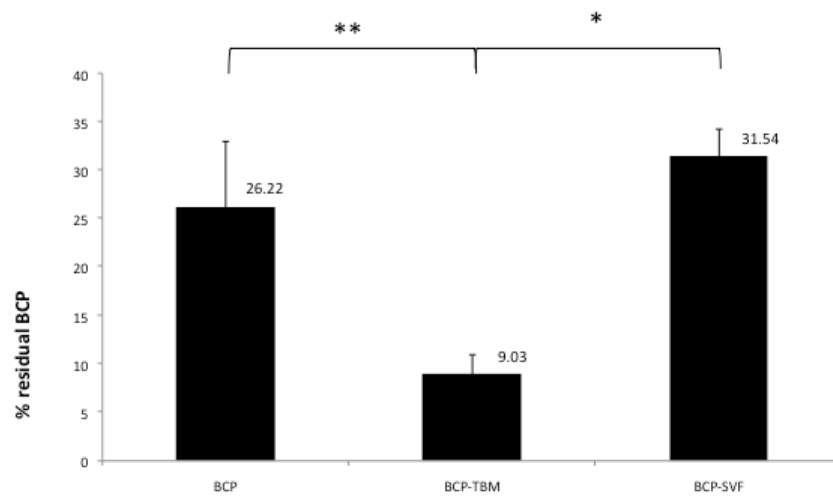
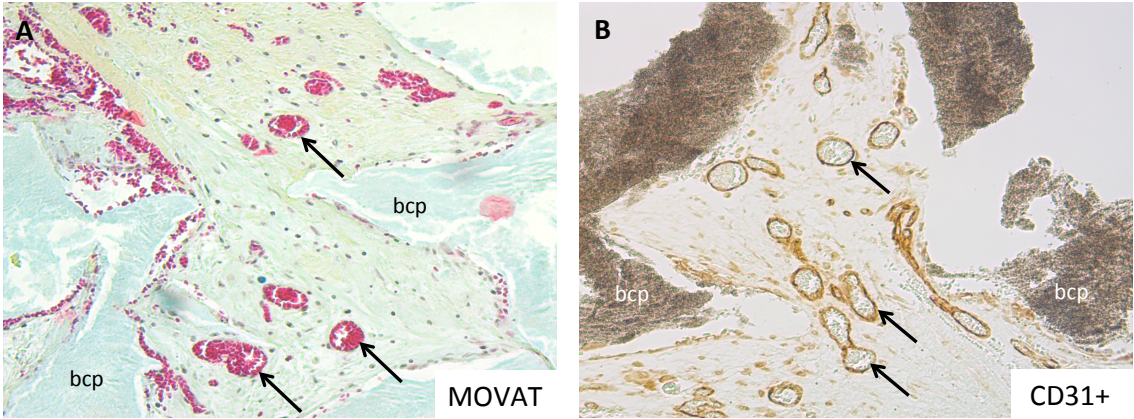
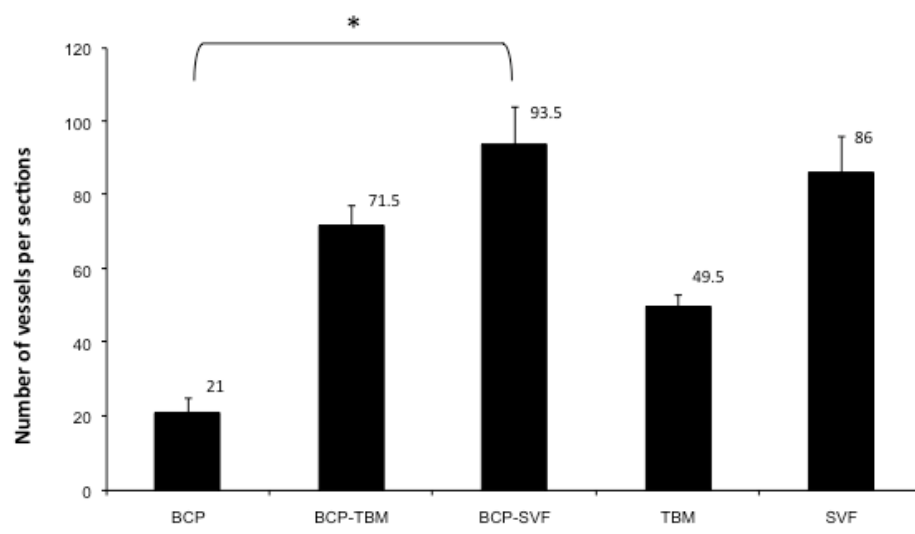


Figure 6





V. Devenir des cellules greffées

Le devenir des cellules implantées est une des questions majeures de l'ingénierie tissulaire, afin de comprendre le rôle joué par les différentes cellules dans la réparation, qu'elles soient issues du greffon ou de l'hôte. Initialement, les cellules souches ont été implantées dans le but d'obtenir leur différenciation dans la voie ostéogénique, afin qu'elles produisent directement de l'os. Il a cependant été démontré que les cellules jouaient également un rôle trophique qui permettait l'attraction des cellules de l'hôte qui entraient aussi dans le processus de réparation tissulaire (222). Différentes hypothèses ont alors été émises quant au devenir et au rôle joué par les cellules greffées pendant la réparation tissulaire. Le devenir de ces cellules est alors devenu un sujet de recherche spécifique, dans le but de mieux comprendre les interactions cellulaires lors de la régénération osseuse.

Différents processus de marquage ou de reconnaissance des cellules greffées sont actuellement disponibles. Il est par exemple possible de tracer les cellules humaines chez l'animal, notamment par la reconnaissance des séquences *alu* spécifiques à l'homme. La reconnaissance de cellules XY chez un receveur XX par hybridation *in situ* du chromosome Y est une autre technique disponible.

V.1. Immunotolérance d'une allogreffe de moelle osseuse induite par la

ciclosporine A sans interaction avec la réparation osseuse

Dans le but de suivre les cellules de MOT implantées dans notre modèle de rat irradié, nous avons développé un modèle de rat immunotolérant aux allogreffes de moelle de rats dont les cellules sont marquées par une protéine « rapporteuse ». Les avancées en génétique ont permis la création de rats transgéniques exprimant des protéines « rapporteuses » comme la GFP (Green Fluorescent Protein) (223). Cette protéine est dérivée d'une méduse et présente une expression stable dans les cellules des mammifères. De plus, son expression est bonne dans les cellules de la moelle osseuse (224). L'immunogénicité de la GFP étant importante, nous avons favorisé l'immunotolérance de ces rats par un traitement immunosuppresseur. Suite à une étude préliminaire ayant montré l'induction d'une immunotolérance plus importante par traitement par ciclosporine en comparaison au tacrolimus, une étude de la néoformation osseuse en terrain non irradié a été réalisée. Dix rats Wistar ont été inclus et ont reçu des implants de moelle issue de rats de souche Sprague-Dawley au sein de pertes de substance tibiales et fémorales. Cinq ont reçu des implants de MOT seule et les cinq autres ont reçu des implants de MOT associées au BCP. Huit jours ou six semaines après les implantations, les animaux ont été euthanasiés et une analyse qualitative et quantitative de la néoformation osseuse a été réalisée. Au temps précoce, la néoformation osseuse était peu importante, et comparable en présence ou non du BCP. Au temps tardif, la néoformation osseuse était significativement plus importante qu'au temps précoce ($p < 0,05$), et comparable en présence ou non du BCP. Cette étude a montré la possibilité d'une néoformation osseuse en présence d'une allogreffe de moelle, associée ou non au BCP, non significativement altérée par le traitement immunosuppresseur. Cette étude ouvre le champ des investigations dans le domaine

du suivi de cellules de moelle GFP greffée au sein de pertes de substance osseuse, afin de déterminer les intrications des différentes cellules et des voies de signalisation.

Immunotolerance of a bone marrow allograft induced by cyclosporin-A without bone repair interaction

Florent Espitalier^{a,b,c,d*}, Nicolas Durand^{a,b,d}, Paul Pilet^{a,c}, Sophie Sourice^a, Pierre Weiss^{a,c,d}, Jérôme Guicheux^{a,c,d}, Olivier Malard^{a,b,d}.

^a INSERM, UMRS 791, Laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

^b Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 1, France

^c Université de Nantes, UFR Odontologie, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

^d Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Pôle hospitalo-universitaire 4 OTONN

* Corresponding author. E-mail address: florent.espitalier@chu-nantes.fr

Fax: +33 2 40 08 34 77

1. Introduction

Bone repair is an important issue of tissue engineering, especially in hypotrophic conditions like irradiated bone. The treatment of the squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract usually requires large surgical removal associated with external radiation therapy. Mandibular ablative surgery to treat cancer or osteoradionecrosis – a redoubtable complication of radiotherapy – provides aesthetic and functional disorders which have to be repaired. The micro-anastomosed free-flaps represent the standard surgical reconstruction technique but complications are increased by preoperative radiation (1). Given these risks of failure and complications, the use of calcium phosphate biomaterials has been considered as an alternative to autogenous bone grafts. In irradiated areas, previous preclinical studies have shown that biphasic calcium phosphate (BCP) associated with total bone marrow (TBM) provides better bone reconstruction than TBM or BCP alone (2,3). More recently, we have shown that the use of mesenchymal stem cells in association with BCP can not provide better bone reconstruction than the BCP-TBM association which is considered as the most efficient material for bone substitution in irradiated areas (4).

Bone healing includes various processes, such as recruitment of stem cells and interactions with inflammatory cells (5). However, the origin and the role played by each type of cell still remains unclear. The study of differentiation and distribution of grafted cells within host tissue is an important element of the tissue engineering research and regenerative medicine. To highlight the fate of transplanted cells, many techniques are used to track these cells locally within the bone and in the whole organism. First, tracking cells must determine the need for the transplanted cells given that they seem to die early after implantation (6). Secondly, it must verify their safety of use. Indeed, some studies have shown that cells were trapped in the lungs after implantation (7,8), without studying their long-term potentially harmful role. Furthermore, the risk of malignant transformation of stem cells in case of implantation in a patient treated for a cancer is not clearly established (9,10). In this context, the development of an immunotolerant animal model to an allograft of bone marrow cells would be useful. However, the immune system is known to interact with bone turnover (11) and the absence of interference of the immunosuppressive drug on bone repair is needed.

The aim of this study was to develop an immunotolerant animal model to an allograft of total bone marrow from immunocompetent rats for bone reconstruction and to check the harmlessness of immunosuppressive drug on bone repair. This work focused on the study of qualitative and quantitative bone ingrowth after bone substitution by an allograft of TBM

alone or associated to BCP under immunosuppressive treatment. This study constitutes a preliminary assay for tracking bone marrow cells in bone repair.

2. Material and methods

2.1 Biphasic Calcium Phosphate (BCP)

The biomaterial used for this study was granules of a macroporous biphasic calcium phosphate (MBCP[®], Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). The granules were 781 $\pm$ 148.6 μ m in diameter and were composed of hydroxyapatite and β tricalcium phosphate in a 60/40 ratio corresponding to a 1:60 ratio of Ca:P. The measured mean porosity was 40 $\pm$ 10%. Eppendorf tubes (Corning, New York, USA), each containing 0.015 g of granules, were steam-sterilized at 121°C for 20 min before implantation.

2.2 Ethical concern

All the animals were provided by a certified breeding centre (R. Janvier, Le Genest St. Isle, France). Animal care was provided by the Experimental Therapeutic Unit (Faculty of Medicine of Nantes, France), in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEE.A.PdL.06) for conducting animal experiments. The European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE, modified DE 2003/65/CE) have been revised by the European directive 2010 (DE 2010/63/UE modified 22/09/2010). The translation of the UE regulation into the French one is effective from January 1st 2013. Submission of the project to the new Ethical Committee of the “Pays de la Loire” was not mandatory until January 1st 2013. Nevertheless, all the experiments were conducted prior to January 2013 accordingly to this new regulation.

2.3 Study of induction of immunotolerance

A preliminary study was performed to compare the efficiency of two immunosuppressive drugs (tacrolimus and cyclosporin-A) administered in immunocompetent Wistar rats which received a bone marrow allograft from GFP (Green Fluorescent Protein) Sprague-Dawley rats. GFP is a reporter protein deriving from a jellyfish, expressed by transgenic rats (12). The transfer of bone marrow GFP cells into immunocompetent hosts triggers an immune response, which can be highlighted by immunoglobulin quantification (13). This study was performed at the INSERM 643 Unit in Nantes, France.

The bone marrow donor was a GFP Sprague-Dawley rat. The TBM was collected from the two femurs, and prepared for subcutaneous injections, as described previously (4). Briefly, both ends of each femur were cut and 2 ml of saline serum was infused through the medullar

cavity. The bone marrow was collected and centrifugated (8 min, 353 g). The cell pellet was diluted in 1500 µl of saline serum, and six samples of 200 µl were prepared to be subcutaneously injected.

The injections of bone marrow were performed on eight-week-old Wistar rats (n = 6), weighing 290 g on average. Each rat received a subcutaneous injection of 200 µl of TBM. Two rats were treated by daily oral administrations of 15 mg/kg/d of cyclosporin-A (Néoral[®], Novartis Pharma, Basel, Swiss). Two rats were treated by daily intramuscular injections of 1 mg/kg/d of tacrolimus (Prograf[®], Astellas Pharma, Tokyo, Japon). Two control rats received no immunosuppressive drug. The determination of immunoglobulin G (IgG) anti-GFP was performed at days 14 and 28. After puncture of the orbital veinous sinus, blood was centrifugated, and IgG determination was performed by ELISA.

2.4 Study of bone repair under immunosuppression

2.4.1 Animals

The study was performed on eight-weeks old Wistar rats (n = 10), weighing ≥ 280 g. The outline of the whole protocol is presented in Fig.1. Two Sprague-Dawley rats were specially designated as TBM donor. Bone defects were performed on Wistar rats and filled with two types of implants. Six weeks after implantations, implanted bone defects were removed just after euthanasia.

2.4.2 Surgical Procedure

2.4.2.1 Anesthetic and euthanasia protocol

All the surgical procedures (bone marrow harvesting, implantations, femurs and tibiae removing) were performed under general anesthesia using 4% isoflurane inhalation for induction and 2% for preservation. After harvesting the bone marrow from the donor and at the end of the experimentation, the rats were sacrificed by an overdose of sodium thiopental (Nesdonal[®], Rhône-Merieux, Lyon, France).

2.4.2.2 Total bone marrow harvesting

The TBM was collected the day of the implantations from the femurs of the two Sprague-Dawley donor rats and prepared for an extemporaneous graft. Rat bone marrow was isolated from femurs as described previously (4). The TBM was immediately placed into tubes containing heparin anticoagulant (Venoject II, Terumo Europe, Louvain, Belgique). A cytological myelographic analysis was performed to check the TBM composition. The nucleated cells in the TBM were quantified by Trypan blue exclusion. The total number of nucleated cells in the TBM was 77×10^6 cells and 1/40 of the total number of cells (1.93×10^6) was used for each implant.

2.4.2.3 Preparation of the implants and defect filling

Two types of implants were prepared at the same time as the surgical creation of the bone defects:

- TBM only (1/40 of total harvested bone marrow cells; n = 20),
- a mixture of BCP (0.015 g of granule samples for implantation) and TBM (1/40 of total harvested bone marrow) in 20 µl of saline serum (n = 20).

The contact time between BCP and TBM before implantation was less than 5 min. Three millimeters-diameter osseous defects were surgically created in bilateral tibial and femoral metaphyses, using a round burr cooled by saline serum: four defects were created per animal. The defects were then totally filled with either TBM only or a mixture of BCP and TBM. The muscles surrounding the bone defects were replaced and sewed up in order to maintain the implants on site. Subcutaneous tissue and skin were sutured in different layers. Thus, 40 defects were created and filled with regard to different conditions (n= 20 per condition). The animals were sacrificed after two periods: an early period and a late period, respectively 8 days and 6 weeks after the surgical procedure. Femurs and tibiae were then dissected and removed for analysis. 40 implants were finally harvested and analyzed (n=10 per condition).

2.4.3 Immunosuppressive treatment

An immunosuppressive therapy with cyclosporin-A has been administrated to prevent the phenomena related to the bone marrow allograft like transplant rejection or graft versus host (GVH) reaction. The treatment which started the day of implantation has been daily administrated per os (15 mg/kg/d) until euthanasia. This drug has been chosen according to the results of the preliminary study of induction of immunotolerance.

2.4.4 Histological examinations

The 40 explanted bone specimens were fixed for 48 h in a 4% paraformaldehyde phosphate-buffered saline (PBS, Seroderm, Berlin, Germany), then dehydrated through a graded series of ethanol and defatted in xylene for 12 hours. All samples were embedded in Technovit 9100N (Heraeus-Kulzer, Friedrichsdorf, Germany), consisting basically of monomeric methyl-metacrylate (MMA), polymethyl-metacrylate (PMMA) powder, dibenzoyl-peroxide, and N,N-3,5-tetramethylaniline as catalysts, and decane-1-triol as regulator. After dehydration, the samples were immersed 24 hours in equal parts of stabilized Technovit 9100N basic solution and xylene at 4°C (“preinfiltration”). Preinfiltration was continued stepwise with xylene, stabilized and destabilized Technovit 9100N basic solution and

hardener (all provided with the Technovit 9100N kit). Infiltration was accomplished with the addition of methyl-methacrylate (MMA) powder. For low-temperature polymerization, each specimen was transferred into a plastic vessel, filled with a fresh mixture of 1 part of stock embedding medium A and 9 parts stock embedding medium B, capped and stored at -20°C for 7 days (embedding media A and B provided in the Technovit 9100N kit). The polymerized blocks were allowed to warm up to 4°C over 24h and stored at room temperature. Serial 7-µm sections were cut perpendicular to the osseous defects and surrounding bone using a diamond saw purpose - made for non-decalcified tissues (Reichert-Jung 2050, Nussloch, Germany). The bone sections were stained with Movat pentachrome, dehydrated and covered. New-bone formation, connections between BCP and neighboring tissues, and blood vessels formation in osseous defects were observed under a light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.4.5 Scanning Electron Microscopy (SEM) and quantitative image analysis

After histological sections, Technovit 9100N-embedded bone specimens were sanded on a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) then gold-palladium-coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA). SEM studies of implanted defects were performed with backscattered electrons (Leo 1450 VP, Zeiss, Oberkochen, Germany) in conjunction with image analysis. The defect boundaries were determined and the bone and ceramic areas then identified by software according to a gray-scale threshold determination. The quantity of newly formed bone was determined using a semi-automatic image analyzer procedure from SEM observations (Leica microsystem imaging solution, Cambridge, UK) as previously described (14). The quantity of newly formed bone, soft tissue and remaining BCP was automatically calculated within the total area. Their respective surfaces were expressed in mm² and as the relative percentage +/- standard deviation for each component.

2.4.6 Statistical analysis

Bone ingrowth of each condition were compared using an analysis of variance statistical test (ANOVA) with statistical significance set at 5% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 Study of induction of immunotolerance

Animals showed good tolerance of the administration of TBM and immunosuppressive drugs, and presented a normal behavior and growth. The oral administration of cyclosporin-A was better tolerated than the intramuscular injections of tacrolimus.

Immunoglobulin quantification showed stable and reproducible greater immunosuppressive effect for cyclosporin-A (Fig. 2). Therefore, cyclosporin-A has been chosen for the study of bone repair under immunosuppression.

3.2 Study of bone repair under immunosuppression

3.2.1 Surgical procedure and clinical observations

The surgical procedure was well tolerated without death or major side effect. There was neither osseous infection nor osseous exteriorization and no GVH disease was observed. The administration of cyclosporin-A has been well tolerated and animals presented a normal behavior and growth. Five rats were sacrificed after an early period (eight days after implantation), the other five after a late period (six weeks after implantation) and their grafts explanted.

3.2.2 Bone marrow myelographic analysis

A cytological myelographic analysis was performed to assess the quality of BM grafts. This included an assessment of the marrow cell lines (i.e., myeloblastic, myelocytic, erythroblastic, megakaryocytic lineages, lymphocytes, plasmocytes and monocytes). The results (presented in [Table 1](#)) indicated that the harvested bone marrow included physiological lineage cells.

3.2.3 Histological examination

New-bone formation was observed with the two filling materials. At the early period, newly formed bone was observed not only in the periphery of most of the osseous defects, but in contact and between the granules of BCP, towards the centre of the defect. The close contact between newly formed bone and BCP granules occurred without fibrous interposition, showing the remaining capacities of osteoconduction of the BCP (early and late period). The amount of newly formed bone increased after 6 weeks (late period) with the reconstitution of the cortical bone for implants with TBM alone or associated with BCP. New-bone formation in the macropores of the granules was observed after implantation of the BCP-TBM mixture. Connections between fragments of newly formed bone carried out a real grid towards the

osseous defect. This phenomenon was more obvious with the BCP-TBM association. When new-bone formation was large, the bone marrow that was in contact with BCP granules or newly formed bone was rich in numerous cells and blood vessels (Fig. 3).

3.2.4 SEM and image analysis

SEM analysis allowed not only a qualitative but also a quantitative evaluation of new-bone formation.

3.2.4.1 Qualitative SEM study

The qualitative SEM study was correlated to the histological examination. New-bone formation appeared at day 8 in the periphery of the osseous defects filled with either TBM or BCP-TBM association. It was present and denser after BCP-TBM mixture implantation towards the centre of the osseous defects too. At the late period, the amount of newly formed bone was increased, compared with the early period with the two types of implants with reconstitution of a neocortical bone. The association of BCP and TBM promoted the formation of interconnection between fragments of newly formed bone (Fig. 4).

3.2.4.2 Quantitative SEM study

The rate of bone ingrowth was significantly higher after 6 weeks than after 8 days. At the early period as at the late period, there was no significant difference in bone ingrowth between the two filling materials (Fig. 5).

4. Discussion

This study confirmed the capacity of the TBM graft alone or associated to BCP to reconstruct a bone defect as observed in previous studies (2–4). Isolated mesenchymal stem cells are insufficient to repair bone in irradiated areas, but the role played by each component of the bone marrow remains to be elucidated (4). The fate of grafting cells in tissue regeneration remains unclear. The mechanisms by which bone marrow cells repair organs have been investigated. Authors have suggested that bone marrow cells differentiate into cells of the organ to be reconstructed (15). The possibility of fusion of bone marrow cells with the cells of the tissues has been proposed (16). More recently, a paracrine effect of the bone marrow cells has been investigated to explain the organ repair and regeneration (17). This last hypothesis suggests that cytokines, growth and other factors induce cytoprotection, neovascularization, and mediate endogenous tissue regeneration via activation of resident tissue stem cells (18). However, all these mechanisms may occur at different levels.

Bone healing is a complex cell-interaction process which includes mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells and inflammatory cells (5). The origin and the role played by each type of cell remains unclear. It has been reported that bone marrow-derived macrophages possess angiogenic function and accelerate the effect of angiogenesis in wound healing (19). Endothelial progenitor cells seem to be bone marrow-derived and recruited during angiogenesis with the existing blood vessels (20). The origin of osteoblasts is still unclear. Authors showed that donor bone marrow cells can differentiate into osteoblasts and osteocytes (21), whereas the origin of osteoprogenitor cells might be pericytes which are mesenchymal stem cells located around blood vessels (22). The fact that osteoclasts are donor bone marrow-derived cells is supported by the role of bone marrow transplantation in the treatment of osteopetrosis which is characterized by osteoclast dysfunction (23).

To elucidate the mechanisms of bone repair and to explore the potential side effects of stem cell transplant (lung trapping, malignant transformation) (7-10), tracking the cells of a TBM allograft would be useful. Studies observed the fate of grafted MSC in bone defects, without the need of immunosuppression (24), because mesenchymal stem cells are considered to have immune modulatory effects (16). However, TBM allograft induces an immune reaction, as demonstrated in this study. Furthermore, in irradiated conditions, only a TBM graft can regenerate bone when mesenchymal stem cells are insufficient (4).

In this context, this study has developed an immunotolerant animal model to an allograft of marrow cells. Because of the immunogenicity of TBM allograft, the induction of immunotolerance was performed by a daily administration of 15mg/kg/d cyclosporin-A. However, the interaction of the immune system with bone turnover (11) forced us to check the harmlessness of cyclosporin-A on bone repair. Cyclosporin-A is an immunosuppressive agent which alters the immune response by selectively interfering with T cell function and cytokine cascade (25). However, the effect of cyclosporin-A on bone turnover is not clear. *In vitro* studies have shown the capacity of cyclosporin-A to decrease bone resorption and osteoclast formation by inhibiting the fusion of the osteoclasts precursors (26). Conversely, *in vivo* studies have shown that cyclosporin-A resulted in a significant increase in bone remodeling with bone loss in rats (27,28). However, Warren et al. have shown that cyclosporin-A did not significantly alter the biomechanical properties of fracture repair or intact bone turnover in rats (29). In this context, our results showed an effective bone repair with reconstruction of the cortical bone 6 weeks after the creation of the defects, and a significant chronological increase in bone regeneration. These results suggested that

cyclosporin-A did not significantly alter bone repair. The presence of the calcium phosphate scaffold did not influence the quantitative results, as observed by Lerouxel et al. in non-irradiated control (3). Bone healing capacities after tibiae and femurs 3 mm-diameter bone defects creation in rats have been observed in previous studies in postradiation conditions (3,4,30). The capacity of BCP associated to a bone marrow graft to repair bone defect has been proved in irradiated areas. The fact that cyclosporin-A did not significantly alter bone repair in this work allows us to consider the use of this new immunotolerant rat model to track labelled bone marrow allograft. This tracking would precise the fate and the role played by each type of cell in bone healing in further studies, especially in irradiated areas.

5. Conclusion

This work was performed to develop an immunotolerant rat model of bone marrow allograft. The cyclosporin-A showed a stable and reproducible greater immunosuppressive effect than the tacrolimus. The study of bone repair showed no significant interaction of immunosuppressive drug (cyclosporin-A) with osseous regeneration. This new immunotolerant rat model of bone marrow allograft will help to clarify the fate and the role played by each type of cell of bone marrow graft in bone healing in further studies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from “les gueules cassées” foundation and Sanofi Aventis Laboratories (perspectives ORL 2009).

We thank Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France) for supplying materials.

We thank Dr Françoise Accard and Dr Antoine Rouger for their contribution to this work.

References

1. Mueller CK, Schultze-Mosgau S. Radiation-induced microenvironments--the molecular basis for free flap complications in the pre-irradiated field? *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2009 Dec;93(3):581–5.
2. Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone*. 2005 Feb;36(2):323–30.
3. Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(26):4566–72.
4. Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):763–9.
5. Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):421–8.
6. Boukhechba F, Balaguer T, Bouvet-Gerbetaz S, Michiels JF, Bouler JM, Carle GF, et al. Fate of bone marrow stromal cells in a syngenic model of bone formation. *Tissue Eng Part A*. 2011 Sep;17(17-18):2267-78.
7. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):573-6.
8. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):54-63.
9. Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One*. 2010 Jun 8;5(6):e10999.
10. Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, Chevallier N, Rouard H. Regenerative therapy with mesenchymal stem cells at the site of malignant primary bone tumour resection: what are the risks of early or late local recurrence? *Int Orthop*. 2014 Jun 7. [Epub ahead of print]
11. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev*. 2005 Dec;208:181–93.
12. Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, et al. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 31;286(4):779–85.
13. Rosenzweig M, Connoles M, Glickman R, Yue SP, Noren B, DeMaria M, et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood*. 2001

Apr 1;97(7):1951–9.

14. Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B. Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J Biomed Mater Res*. 1993 Jan;27(1):57–64.
15. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(4):487–500.
16. Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnem JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*. 2004 Jul 2;305(5680):90–3.
17. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2009 Jun;17(6):939–46.
18. Tran SD, Liu Y, Xia D, Maria OM, Khalili S, Wang RW-J, et al. Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PloS One*. 2013;8(4):e61632.
19. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Kishi K, Suda T, Kubota Y. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5264–72.
20. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004 Dec;8(4):498–508.
21. Dominici M, Marino R, Rasini V, Spano C, Paolucci P, Conte P, et al. Donor cell-derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4386–91.
22. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301–13.
23. Tolar J, Bonfim C, Grewal S, Orchard P. Engraftment and survival following hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Dec;38(12):783–7.
24. Tsujigiwa H, Hirata Y, Katase N, Buery RR, Tamamura R, Ito S, et al. The role of bone marrow-derived cells during the bone healing process in the GFP mouse bone marrow transplantation model. *Calcif Tissue Int*. 2013 Mar;92(3):296–306.
25. Keown PA, Stiller CR. Cyclosporine: a double-edged sword. *Hosp Pract Off Ed*. 1987 May 15;22(5):207–15, 219–20.
26. Orcel P, Denne MA, de Vernejoul MC. Cyclosporin-A in vitro decreases bone resorption, osteoclast formation, and the fusion of cells of the monocyte-macrophage lineage. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1638–46.
27. Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, Ismail F, Thomas S. Cyclosporin-A in vivo

produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. *Endocrinology*. 1988 Nov;123(5):2571–7.

28. Matsunaga T, Shigetomi M, Hashimoto T, Suzuki H, Gondo T, Tanaka H, et al. Effects of bisphosphonate treatment on bone repair under immunosuppression using cyclosporine A in adult rats. *Osteoporos Int J*. 2007 Nov;18(11):1531–40.

29. Warren SB, Pelker RR, Friedlaender GE. Effects of short-term cyclosporin-A on biomechanical properties of intact and fractured bone in the rat. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1985;3(1):96–100.

30. Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;47(8):602–7.

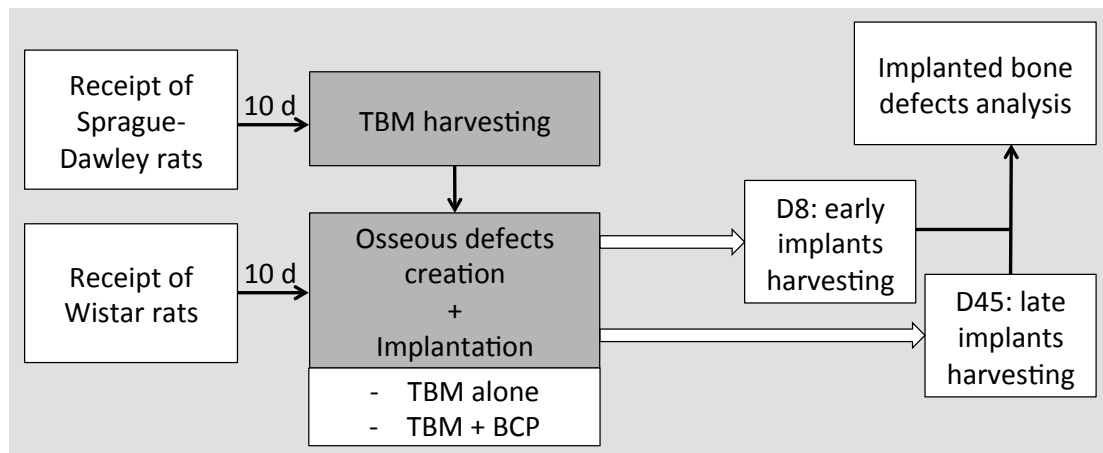


Figure 9. Outline of the protocol

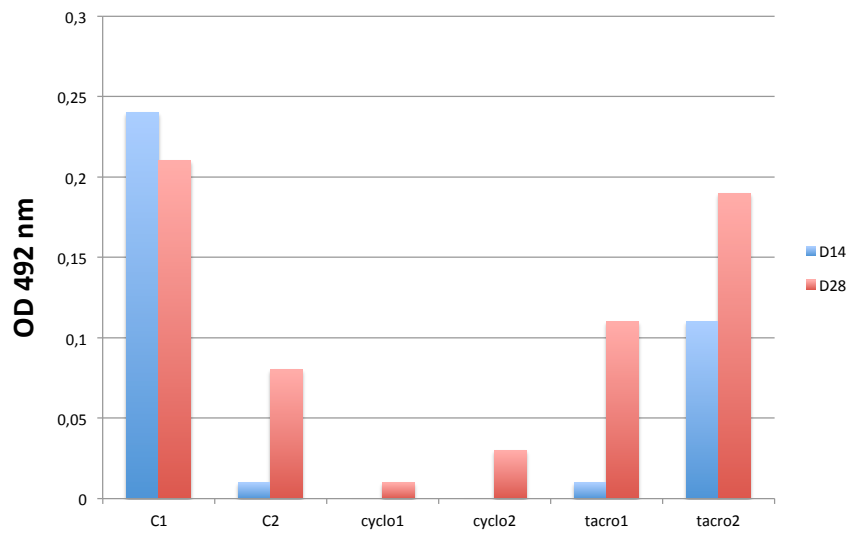


Figure 10. IgG anti-GFP quantification (results expressed in terms of absorbance at 492 nm). C1: control rat n°1; C2: control rat n°2; cyclo1: rat treated with cyclosporin-A n°1; cyclo2: rat treated with cyclosporin-A n°2; tacro1: rat treated with tacrolimus n°1; tacro2: rat treated with tacrolimus n°2.

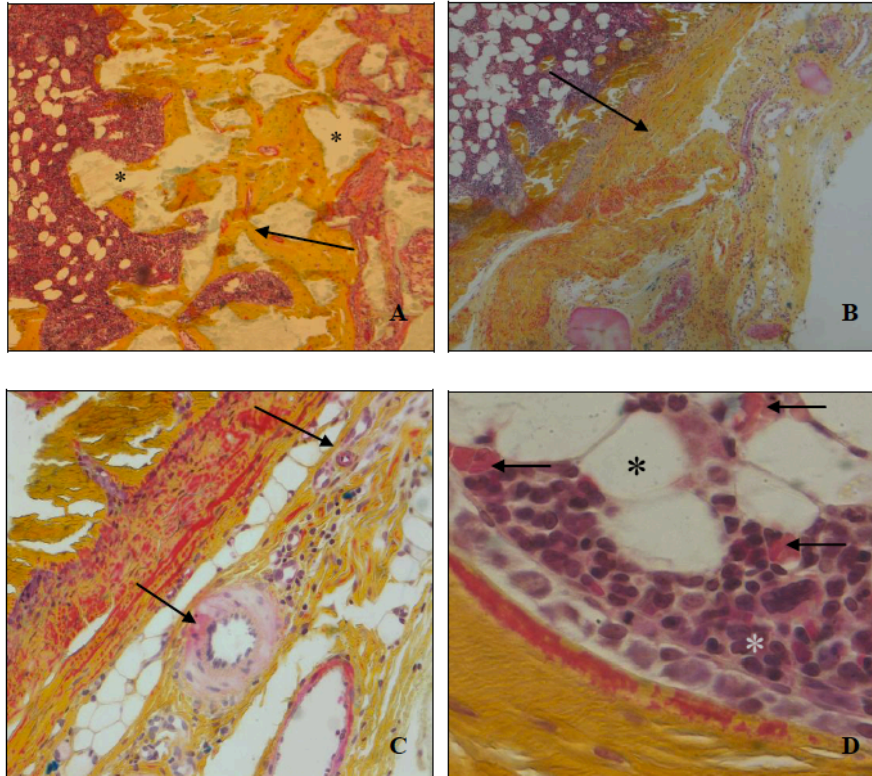


Figure 3. Images of histological bone sections 6 weeks after implantation (Movat pentachrome staining). A. Defect filled with BCP-TBM mixture: new cortical bone (arrow) in contact with BCP (asterix) with rich bone marrow in contact, x50. B. Defect filled with TBM only: new cortical bone (arrow), x50. C. Defect filled with TBM only: presence of newly formed blood vessels (arrows) in new bone formation, x200. D. Defect filled with TBM only: rich bone marrow in contact with new bone formation; bone marrow cells (white asterix), blood vessels (arrows) and lipid vacuoles (black asterix), x400.

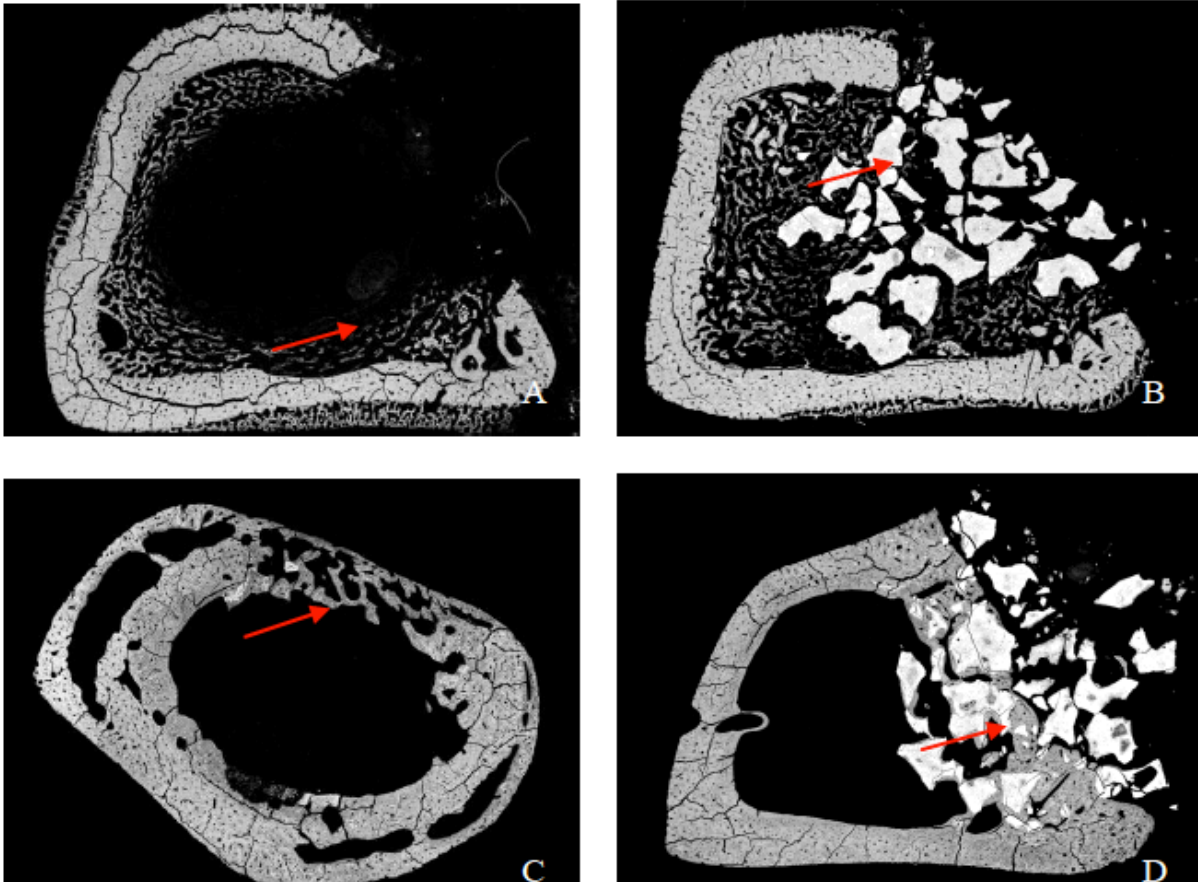


Figure 4. SEM backscattered electron images of samples. A. Early period, defect filled with TBM only: new bone formation in the periphery of the defect (arrow). B. Early period, defect filled with BCP-TBM mixture: new bone formation in the periphery of the defect and in contact with BCP (arrow). C. Late period, defect filled with TBM only: new cortical bone formation (arrow). D. Late period, defect filled with BCP-TBM mixture: new cortical bone formation in contact with BCP (arrow).

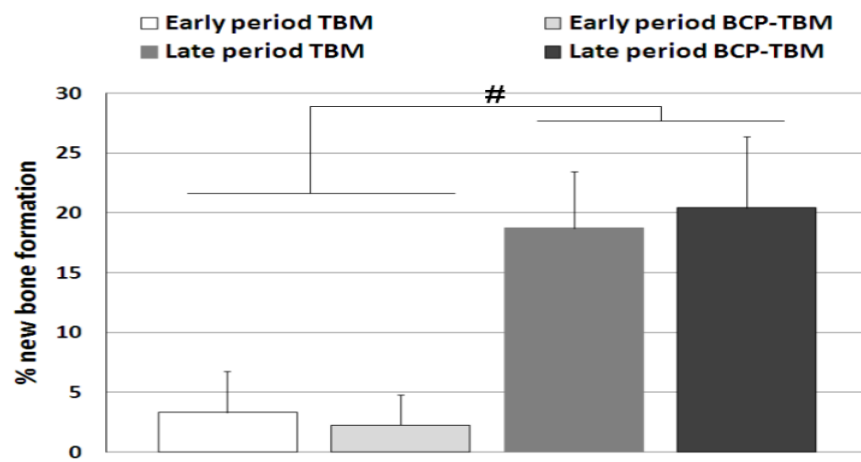


Figure 5. Bone ingrowth in osseous defects (# $p < 0.05$ comparing early and late periods).

Granulocytic lineages		Erythroblastic lineage	Megacaryocytic lineage	Lymphocyte	Plasmocyte	Monocyte
Myeloblastic	Myelocytic					
1	28	11	++	53.5	1.5	6

Table 3. Cytological analysis of the bone marrow. Results are expressed as a percentage of cells per lineage.

Plusieurs études ont permis d'obtenir des informations quant au devenir des cellules greffées dans le but de réparer une perte de substance osseuse.

Il semble tout d'abord que de nombreuses CSM implantées meurent de manière précoce, probablement en rapport avec une ischémie au sein de la perte de substance osseuse mal vascularisée, associant une baisse de la pression partielle en oxygène, et une diminution du glucose (225). Toutefois, la durée de survie des cellules implantées est sujette à controverse. Les études menées sur des animaux immunocompétents ont montré que les cellules greffées ne demeuraient qu'une à trois semaines au sein de l'hôte, et que la néoformation osseuse en site ectopique était le fait des cellules de l'hôte qui avaient été attirées par les cellules implantées, grâce au rôle trophique joué par les CSM (226,227). Pour les études utilisant des animaux immunotolérants, la durée de survie des CSM était sensiblement augmentée à 8 semaines (228,229). La principale critique émise vis-à-vis de ces dernières études est justement l'absence de défense immunitaire qui pourrait favoriser la survie prolongée des cellules greffées, non reconnues par l'hôte comme étrangères, et donc non éliminées. Cependant, étant donné le rôle immunomodulateur des CSM, il semble qu'elles ne soient pas ou peu reconnues comme des cellules étrangères, et donc qu'elles ne soient pas particulièrement éliminées en tant que cellules étrangères à l'hôte. Une étude récente a comparé la formation osseuse ectopique chez des souris syngéniques immunocompétentes et chez des souris immunodéficientes « nude », où une implantation associant BCP et cellules de moelle osseuse a été réalisée en sous-cutané. La durée de vie des cellules implantées était significativement augmentée chez la souris « nude » et la formation osseuse ectopique y était plus importante (230). Cette étude démontre que l'inflammation médiée par les cellules T joue un rôle majeur dans la formation osseuse, et donc que l'utilisation

d'animaux immunocompétents permet d'obtenir des résultats plus proches de la pratique clinique.

Afin d'étudier la provenance des cellules au sein d'un os néoformé, une étude récente a utilisé de la moelle osseuse de souris GFP (green fluorescent protein, un marqueur cellulaire) injectée par voie veineuse à des souris receveuses après irradiation corps entier de 10 Gy. Une perte de substance osseuse a ensuite été réalisée afin d'observer la provenance des cellules dans le processus de régénération osseuse. Les résultats montraient que les ostéoblastes et ostéocytes n'exprimaient pas la GFP, alors que les cellules hématopoïétiques et les ostéoclastes l'exprimaient. Ces résultats étaient donc en faveur d'une absence de différenciation des CSM greffées en ostéoblastes. Ainsi, les cellules de moelle greffées se seraient différenciées en ostéoclastes, cellules endothéliales et cellules inflammatoires, nécessaires à la préparation de la néoformation osseuse (231) mais la formation osseuse en tant que telle serait dépendant des cellules de l'hôte. On aboutissait alors à la formation d'un os chimérique. Cette observation a également été signalée par d'autres études, où les cellules de moelle dérivées des CSH provenaient des cellules greffées, alors que les cellules osétoformatrices dériveraient des cellules de l'hôte (232,233).

Le devenir des cellules injectées en territoire osseux irradié n'a été observé que dans une seule étude. La quantité de cellules du donneur décroissait progressivement jusqu'à ne représenter que 38% de cellules présentes au sein de l'os irradié 7 jours après l'injection cellulaire. Cette injection de CSM permettait d'augmenter significativement le flux sanguin et le métabolisme de l'os irradié dans la semaine suivant l'injection, mais ces effets n'étaient plus présents à 2 mois (234).

Le devenir et le rôle des cellules greffées restent donc débattus. Toutefois, il semble que les CSM ne demeurent qu'un temps limité, permettant l'attraction des cellules de l'hôte,

ce phénomène aboutissant au final à la néoformation osseuse, notamment grâce au tissu de « soutien » fourni par les autres éléments de la MOT du donneur en cas d'implantation de MOT, ou du receveur à proximité immédiate de la perte de substance osseuse, en cas d'apport de CSM seules.

VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'os irradié, par son insuffisance vasculaire et cellulaire, et par le développement d'une fibrose radio-induite voit ses capacités de cicatrisation et de régénération diminuer. Tenter de reconstruire un os après une irradiation à dose thérapeutique à partir d'un biomatériau et de matériel autologue (des cellules souches, de la moelle osseuse, de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux) est aujourd'hui encore du domaine de la recherche, la reconstruction communément admise nécessitant une autogreffe d'un péroné.

Les études réalisées dans ce travail ont montré que l'ensemble des cellules et des facteurs de croissance osseuse et cytokines de la moelle osseuse greffée ont permis la néoformation osseuse sur un os irradié, là où les CSM seules étaient incapables de l'assurer. Malgré l'ajout de moelle osseuse aux cellules souches mésenchymateuse, celles-ci semblent avoir inhiber la réaction inflammatoire nécessaire à la réparation osseuse grâce à leur pouvoir immunomodulateur. Les progéniteurs endothéliaux au sein de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux ont permis la formation de néovaisseaux nécessaires à l'établissement de toute formation osseuse, mais les cellules souches mésenchymateuses contenues au sein de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux n'ont pu se différencier en précurseurs ostéogéniques afin de permettre la formation osseuse. De plus, il semble que l'absence de facteurs de croissance osseuse au sein de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux n'a pas permis d'attirer les cellules de l'hôte afin d'envisager la formation osseuse.

Les mécanismes de réparation osseuse sont complexes et interdépendants entre eux, et l'irradiation déstabilise cet équilibre. Le modèle de rat immunodéprimé développé ici devrait permettre l'étude du devenir de cellules de moelle osseuse afin de comprendre leur rôle ainsi que le rôle des cellules de l'hôte dans la réparation osseuse.

Le but ultime de ces travaux est de fournir chez l'homme une alternative aux reconstructions osseuses lourdes et parfois irréalisables. Les résultats obtenus avec le meilleur modèle expérimental de reconstruction osseuse en territoire irradié, à savoir l'association de BCP et de moelle osseuse totale, ont permis une application clinique directement en rapport avec les travaux réalisés au Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, sous forme d'une étude clinique de phase I bicentrique (étude ORN) dont les résultats encourageants doivent permettre une étude multicentrique avant son application courante en pratique clinique (*Clinicaltrials.gov* NCT01147315).

VII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ligier K, Belot A, Launoy G, Velten M, Bossard N, Iwaz J, et al. Descriptive epidemiology of upper aerodigestive tract cancers in France: incidence over 1980-2005 and projection to 2010. *Oral Oncol.* 2011 Apr;47(4):302-7.
2. Cojocariu OM, Huguet F, Lefevre M, Périé S. Facteurs pronostiques et prédictifs des cancers des voies aéro-digestives supérieures. *Bull Cancer (Paris).* 2009 Apr;96(4):369-78.
3. Jacobson AS, Zevallos J, Smith M, Lazarus CL, Husaini H, Okay D, et al. Quality of life after management of advanced osteoradionecrosis of the mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Sep;42(9):1121-8.
4. Urken ML, Buchbinder D, Costantino PD, Sinha U, Okay D, Lawson W, et al. Oromandibular reconstruction using microvascular composite flaps: report of 210 cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jan;124(1):46-55.
5. Mueller CK, Schultze-Mosgau S. Radiation-induced microenvironments--the molecular basis for free flap complications in the pre-irradiated field? *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2009 Dec;93(3):581-5.
6. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop.* 2002 Feb;(395):81-98.
7. Jegoux F, Malard O, Goyenvallée E, Aguado E, Daculsi G. Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Feb;109(2):173-84.
8. Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone.* 2005 Feb;36(2):323-30.
9. Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials.* 2006 Sep;27(26):4566-72.
10. Blanchard D, Rame J-P, Louis M-Y, Gery B, Florescu C, Raucourt D de, et al. Oropharyngeal cancer. *Bull Cancer (Paris).* 2014 May 1;101(5):429-37.
11. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglà E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Épidémiologie Santé Publique.* 2008 Jun;56(3):159-75.
12. Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, St Guily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997 May;123(5):513-6.
13. Lim YC, Koo BS, Lee JS, Lim J-Y, Choi EC. Distributions of cervical lymph node metastases in oropharyngeal carcinoma: therapeutic implications for the N0 neck. *The Laryngoscope.* 2006 Jul;116(7):1148-52.

14. De Monès E, Vergez S, Barry B, Righini C, Rolland F, Raoul G, et al. Initial staging for squamous cell carcinoma of the mouth, larynx and pharynx (except nasopharynx). Part 3: general assessment. 2012 SFORL recommendations. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2013 Jun;130(3):165–72.
15. De Monès E, Bertolus C, Salaun PY, Dubrulle F, Ferrié JC, Temam S, et al. Initial staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx and pharynx (excluding nasopharynx). Part 2: Remote extension assessment and exploration for secondary synchronous locations outside of the upper aerodigestive tract. 2012 SFORL guidelines. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2013 Apr;130(2):107–12.
16. Vergez S, Morinière S, Dubrulle F, Salaun P-Y, De Monès E, Bertolus C, et al. Initial staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx and pharynx (excluding nasopharynx). Part I: Locoregional extension assessment: 2012 SFORL guidelines. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2013 Feb;130(1):39–45.
17. Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1993 Apr;7(2):337–52.
18. Bensadoun R-J, Pinel B. Radiothérapie des cancers oto-rhino-laryngologiques. EMC. Elsevier Masson SAS; 2013.
19. Kam MKM, Leung S-F, Zee B, Chau RMC, Suen JJS, Mo F, et al. Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Nov 1;25(31):4873–9.
20. Comet B, Kramar A, Faivre-Pierret M, Dewas S, Coche-Dequeant B, Degardin M, et al. Salvage stereotactic reirradiation with or without cetuximab for locally recurrent head-and-neck cancer: a feasibility study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Sep 1;84(1):203–9.
21. Mantravadi RV, Skolnik EM, Applebaum EL. Complications of postoperative and preoperative radiation therapy in head and neck cancers. A comparative study. *Arch Otolaryngol Chic Ill* 1960. 1981 Nov;107(11):690–3.
22. Wennerberg J. Pre versus post-operative radiotherapy of resectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1995 Jul;115(4):465–74.
23. Huang DT, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, Grimes M. Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;23(4):737–42.
24. Pignon J-P, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2009 Jul;92(1):4–14.

25. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567–78.
26. Domenge C, Hill C, Lefebvre JL, De Raucourt D, Rhein B, Wibault P, et al. Randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in oropharyngeal carcinoma. French Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC). *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(12):1594–8.
27. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11;359(11):1116–27.
28. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Jun 10;24(17):2606–11.
29. Maciejewski B, Preuss-Bayer G, Trott KR. The influence of the number of fractions and of overall treatment time on local control and late complication rate in squamous cell carcinoma of the larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1983 Mar;9(3):321–8.
30. Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23(2):457–67.
31. Williams J, Chen Y, Rubin P, Finkelstein J, Okunieff P. The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol*. 2003 Jul;13(3):182–8.
32. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003 Sep;4(9):529–36.
33. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991 May 15;21(1):109–22.
34. Rubin P, Casarett GW. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer*. 1968 Oct;22(4):767–78.
35. Bensadoun R-J, Le Page F, Darcourt V, Bensadoun F, Ciais G, Rostom YA, et al. Mucite radio-induite des voies aérodigestives : prévention et prise en charge. Recommandations du groupe Mucites MASCC/ISOO. *Bull Cancer (Paris)*. 2006 Feb;93(2):201–11.
36. Chambers MS, Toth BB, Martin JW, Fleming TJ, Lemon JC. Oral and dental management of the cancer patient: prevention and treatment of complications. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. 1995 May;3(3):168–75.
37. Bensadoun RJ, Etienne MC, Dassonville O, Chauvel P, Pivot X, Marcy PY, et al. Concomitant b.i.d. radiotherapy and chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in unresectable squamous-cell carcinoma of the pharynx: clinical and

- pharmacological data of a French multicenter phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 Sep 1;42(2):237–45.
38. Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jul 15;68(4):1110–20.
 39. Epstein JB, Beaumont JL, Gwede CK, Murphy B, Garden AS, Meredith R, et al. Longitudinal evaluation of the oral mucositis weekly questionnaire-head and neck cancer, a patient-reported outcomes questionnaire. *Cancer.* 2007 May 1;109(9):1914–22.
 40. LENT SOMA scales for all anatomic sites. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Mar 30;31(5):1049–91.
 41. Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S. Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Mar 30;31(5):1141–64.
 42. Franzén L, Funegård U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1992;28(2-3):457–62.
 43. Eisbruch A, Schwartz M, Rasch C, Vineberg K, Damen E, Van As CJ, et al. Dysphagia and aspiration after chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: which anatomic structures are affected and can they be spared by IMRT? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Dec 1;60(5):1425–39.
 44. Lyons A, Ghazali N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Dec;46(8):653–60.
 45. Støre G, Boysen M. Mandibular osteoradionecrosis: clinical behaviour and diagnostic aspects. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2000 Oct;25(5):378–84.
 46. Delanian S, Chatel C, Porcher R, Depondt J, Lefaix J-L. Complete restoration of refractory mandibular osteoradionecrosis by prolonged treatment with a pentoxifylline-tocopherol-clodronate combination (PENTOCLO): a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Jul 1;80(3):832–9.
 47. Bennett MH, Feldmeier J, Hampson N, Smee R, Milross C. Hyperbaric oxygen therapy for late radiation tissue injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(3):CD005005.
 48. Annane D, Depondt J, Aubert P, Villart M, Géhanno P, Gajdos P, et al. Hyperbaric oxygen therapy for radionecrosis of the jaw: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial from the ORN96 study group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2004 Dec 15;22(24):4893–900.
 49. Curi MM, Dib LL. Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 1997 Jun;55(6):540–544; discussion 545–546.

50. Tubiana M. [Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol*. 2009 Jul;13(4):238–58.
51. Malard O, Toquet C, Gayet-Delacroix M, Bordure P, Beauvillain de Montreuil C, Bardet E. Radiation-induced cancers of the pharynx and larynx: a study of five clinical cases. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2002 Feb;27(1):68–74.
52. Martin M, Delanian S, Sivan V, Vozenin-Brotons MC, Reisdorf P, Lawrence D, et al. [Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol*. 2000 Oct;4(5):369–84.
53. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, et al. Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 1999 Dec;53(3):233–45.
54. Bourgier C, Monceau V, Bourhis J, Deutsch E, Vozenin M-C. [Pharmacological modulation of late radio-induced side effects]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol*. 2011 Aug;15(5):383–9.
55. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2001;40(6):702–11.
56. Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Feb 1;49(2):353–65.
57. Fleckenstein K, Gauter-Fleckenstein B, Jackson IL, Rabbani Z, Anscher M, Vujaskovic Z. Using biological markers to predict risk of radiation injury. *Semin Radiat Oncol*. 2007 Apr;17(2):89–98.
58. Westbury CB, Yarnold JR. Radiation fibrosis--current clinical and therapeutic perspectives. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. 2012 Dec;24(10):657–72.
59. Gaugler M-H. A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *BJR Suppl BIR*. 2005;27:100–5.
60. Fajardo LF. The endothelial cell is a unique target of radiation: an overview. The radiation biology of the vascular endothelium. CRC Press. 1998. p. 1–13.
61. Milliat F, François A, Tamarat R, Benderitter M. [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Ann Cardiol Angéiologie*. 2008 Jun;57(3):139–48.
62. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):583–94.
63. Yarnold J, Brotons M-CV. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2010 Oct;97(1):149–61.

64. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349–63.
65. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):199–210.
66. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10;331(19):1286–92.
67. Moulin V. Growth factors in skin wound healing. *Eur J Cell Biol.* 1995 Sep;68(1):1–7.
68. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury--a complex "wound." *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2002 May;63(2):129–45.
69. Terrell TG, Working PK, Chow CP, Green JD. Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol.* 1993;34 Pt B:43–67.
70. Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, Jurukovski V, Erickson AC, Walian PJ, et al. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiat Res.* 2006 Dec;166(6):839–48.
71. Anscher MS, Thrasher B, Rabbani Z, Teicher B, Vujaskovic Z. Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jul 1;65(3):876–81.
72. Denton CP, Merkel PA, Furst DE, Khanna D, Emery P, Hsu VM, et al. Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum.* 2007 Jan;56(1):323–33.
73. Leask A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: targeting myofibroblast differentiation and recruitment. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:8.
74. Greenberger JS, Epperly M. Bone marrow-derived stem cells and radiation response. *Semin Radiat Oncol.* 2009 Apr;19(2):133–9.
75. Coppes RP, van der Goot A, Lombaert IMA. Stem cell therapy to reduce radiation-induced normal tissue damage. *Semin Radiat Oncol.* 2009 Apr;19(2):112–21.
76. Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Nov;297(5):L1002–1011.
77. Epperly MW, Guo H, Gretton JE, Greenberger JS. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Aug;29(2):213–24.

78. Aquino JB, Bolontrade MF, García MG, Podhajcer OL, Mazzolini G. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* 2010 Jun;17(6):692–708.
79. Fajardo LF. The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol Stockh Swed.* 2005;44(1):13–22.
80. Rodemann HP, Blaese MA. Responses of normal cells to ionizing radiation. *Semin Radiat Oncol.* 2007 Apr;17(2):81–8.
81. Girinsky T. [Effects of ionizing radiation on the blood vessel wall]. *J Mal Vasc.* 2000 Dec;25(5):321–4.
82. Delanian S, Lefaix J-L. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2004 Nov;73(2):119–31.
83. Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 1994 Jul;32(1):12–20.
84. Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S, Lefaix J-L. Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Jul 1;21(13):2545–50.
85. Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix J-L. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8570–9.
86. Gothard L, Cornes P, Earl J, Hall E, MacLaren J, Mortimer P, et al. Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2004 Nov;73(2):133–9.
87. Haydont V, Bourgier C, Pocard M, Lusinchi A, Aigueperse J, Mathé D, et al. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5331–40.
88. Gaugler M-H, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotons M-C, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res.* 2005 May;163(5):479–87.
89. Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1-2):48–60.

90. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Dec;23(3-4):311–22.
91. Zhao W, Robbins MEC. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2009;16(2):130–43.
92. Delanian S, Lefaix JL. [Mature bone radionecrosis: from recent physiopathological knowledge to an innovative therapeutic action]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol.* 2002 Feb;6(1):1–9.
93. Chevassieux P, Meunier P. *Histologie et cytologie de l'os normal.* EMC. Paris: Elsevier Masson SAS; 2003.
94. Thomas T, Martin A, Lafage-Proust M-H. *Physiologie du tissu osseux.* EMC. Paris: Elsevier Masson SAS; 2008.
95. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1990 Aug;5(8):825–30.
96. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000 Aug;21(4):393–411.
97. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br.* 1990 Sep;72(5):822–9.
98. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop.* 2000 Sep;(378):224–37.
99. Howland WJ, Loeffler RK, Starchman DE, Johnson RG. Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. *Radiology.* 1975 Dec;117(3 Pt 1):677–85.
100. Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, Mann KA. Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *J Biomech.* 2010 Oct 19;43(14):2738–46.
101. Jia D, Gaddy D, Suva LJ, Corry PM. Rapid loss of bone mass and strength in mice after abdominal irradiation. *Radiat Res.* 2011 Nov;176(5):624–35.
102. Pitkänen MA, Hopewell JW. Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta Radiol Oncol.* 1983;22(3):253–6.
103. Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, Morita R. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol Stockh Swed* 1987. 1998 Jan;39(1):43–6.

104. Hübner W, Blume A, Pushnjakova R, Dekhtyar Y, Hein H-J. The influence of X-ray radiation on the mineral/organic matrix interaction of bone tissue: an FT-IR microscopic investigation. *Int J Artif Organs*. 2005 Jan;28(1):66–73.
105. Burton B, Gaspar A, Josey D, Tupy J, Grynpas MD, Willett TL. Bone embrittlement and collagen modifications due to high-dose gamma-irradiation sterilization. *Bone*. 2014 Jan 16;61C:71–81.
106. Sugimoto M, Takahashi S, Toguchida J, Kotoura Y, Shibamoto Y, Yamamuro T. Changes in bone after high-dose irradiation. Biomechanics and histomorphology. *J Bone Joint Surg Br*. 1991 May;73(3):492–7.
107. King MA, Casarett GW, Weber DA. A study of irradiated bone: I. histopathologic and physiologic changes. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1979 Nov;20(11):1142–9.
108. Cabanne F, Bonenfant J, Gagne F. Anatomie pathologique : principes de pathologie générale et spéciale. Paris: Maloine; 1980.
109. Drouet F, Lagrange J-L. [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: bone marrow]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol*. 2010 Jul;14(4-5):392–404.
110. Coquard R. [Late effects of ionizing radiations on the bone marrow]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol*. 1997;1(6):792–800.
111. Knospe WH, Blom J, Crosby WH. Regeneration of locally irradiated bone marrow. I. Dose dependent, long-term changes in the rat, with particular emphasis upon vascular and stromal reaction. *Blood*. 1966 Sep;28(3):398–415.
112. Aitasalo K, Aro H. Irradiation-induced hypoxia in bones and soft tissues: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1986 Feb;77(2):256–67.
113. Mussano F, Lee KJ, Zuk P, Tran L, Cacalano NA, Jewett A, et al. Differential effect of ionizing radiation exposure on multipotent and differentiation-restricted bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2010 Oct 1;111(2):322–32.
114. Song CW, Uckun FM, Levitt SH, Kim TH. Comments on “Radiation dose-fractionation and dose-rate relationships for long-term repopulating hemopoietic stem cells in a murine bone marrow transplant model” by R. van Os, H. Thames, A. W. T. Konings and J. D. Down (*Radiat. Res*. 136, 118-125, 1993). *Radiat Res*. 1994 Mar;137(3):414–6.
115. Cao X, Wu X, Frassica D, Yu B, Pang L, Xian L, et al. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 25;108(4):1609–14.
116. Cmielova J, Havelek R, Soukup T, Jiroutová A, Visek B, Suchánek J, et al. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int J Radiat Biol*. 2012 May;88(5):393–404.

117. Willey JS, Lloyd SAJ, Nelson GA, Bateman TA. Ionizing Radiation and Bone Loss: Space Exploration and Clinical Therapy Applications. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2011 Mar;9(1):54–62.
118. Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, Li G, Earle JD, Chao EY. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am*. 1988 Mar;70(3):392–9.
119. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Oct;106(5):1049–61.
120. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000 Sep;126(9):1124–8.
121. Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone*. 2004 Jan;34(1):148–56.
122. Sakurai T, Sawada Y, Yoshimoto M, Kawai M, Miyakoshi J. Radiation-induced reduction of osteoblast differentiation in C2C12 cells. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2007 Nov;48(6):515–21.
123. Park S-S, Kim K-A, Lee S-Y, Lim S-S, Jeon Y-M, Lee J-C. X-ray radiation at low doses stimulates differentiation and mineralization of mouse calvarial osteoblasts. *BMB Rep*. 2012 Oct;45(10):571–6.
124. Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiat Res*. 1998 Nov;150(5 Suppl):S109–120.
125. Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2010 Jan;38(1):47–53.
126. Rohrer MD, Kim Y, Fayos JV. The effect of cobalt-60 irradiation on monkey mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1979 Nov;48(5):424–40.
127. Rabelo GD, Beletti ME, Dechichi P. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. *Microsc Res Tech*. 2010 Oct;73(11):1015–8.
128. Willey JS, Lloyd SAJ, Robbins ME, Bourland JD, Smith-Sielicki H, Bowman LC, et al. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiat Res*. 2008 Sep;170(3):388–92.
129. Kondo H, Searby ND, Mojarraab R, Phillips J, Alwood J, Yumoto K, et al. Total-body irradiation of postpubertal mice with (137)Cs acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts. *Radiat Res*. 2009 Mar;171(3):283–9.

130. Margulies B, Morgan H, Allen M, Strauss J, Spadaro J, Damron T. Transiently increased bone density after irradiation and the radioprotectant drug amifostine in a rat model. *Am J Clin Oncol*. 2003 Aug;26(4):e106–114.
131. Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol*. 2003 Sep;41(3):208–11.
132. Phulpin B, Dolivet G, Marie P-Y, Poussier S, Gallet P, Leroux A, et al. Re-assessment of chronic radio-induced tissue damage in a rat hindlimb model. *Exp Ther Med*. 2010;1(4):553–60.
133. Aitasalo K. Effect of irradiation on early enzymatic changes in healing mandibular periosteum and bone. A histochemical study on rats. *Acta Radiol Oncol*. 1986 Jun;25(3):207–12.
134. Regaud C. Sur la sensibilité du tissu osseux normal vis-à-vis des rayons X et gamma et sur le mécanisme de l'ostéoradionécrose. *C R Soc Biol*. 1922;87:629–32.
135. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1983 May;41(5):283–8.
136. Chrcanovic BR, Reher P, Sousa AA, Harris M. Osteoradionecrosis of the jaws--a current overview--part 1: Physiopathology and risk and predisposing factors. *Oral Maxillofac Surg*. 2010 Mar;14(1):3–16.
137. Raoul G, Maes J, Pasquier D, Nicola J, Ferri J. Ostéoradionécroses des maxillaires (maxillaire et mandibulaire). EMC. Elsevier Masson SAS; 2005.
138. Beumer J, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Osteoradionecrosis: predisposing factors and outcomes of therapy. *Head Neck Surg*. 1984 Apr;6(4):819–27.
139. Bras J, de Jonge HK, van Merkesteyn JP. Osteoradionecrosis of the mandible: pathogenesis. *Am J Otolaryngol*. 1990 Aug;11(4):244–50.
140. Murray CG, Daly TE, Zimmerman SO. The relationship between dental disease and radiation necrosis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Feb;49(2):99–104.
141. Studer G, Studer SP, Zwahlen RA, Huguenin P, Grätz KW, Lütolf UM, et al. Osteoradionecrosis of the mandible: minimized risk profile following intensity-modulated radiation therapy (IMRT). *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Röntgenges Al*. 2006 May;182(5):283–8.
142. Meyer I. Infectious diseases of the jaws. *J Oral Surg Am Dent Assoc* 1965. 1970 Jan;28(1):17–26.
143. Dambrain R. [The pathogenesis of osteoradionecrosis]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 1993;94(3):140–7.
144. Hansen T, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. Actinomyces in infected osteoradionecrosis--underestimated? *Hum Pathol*. 2006 Jan;37(1):61–7.

145. Pelker RR, Friedlaender GE. The Nicolas Andry Award-1995. Fracture healing. Radiation induced alterations. *Clin Orthop*. 1997 Aug;(341):267–82.
146. Arnold M, Stas P, Kummermehr J, Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 1998 Sep;48(3):259–65.
147. Hopewell JW, Young CM. Changes in the microcirculation of normal tissues after irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1978 Feb;4(1-2):53–8.
148. Lehner B, Bauer J, Rödel F, Grabenbauer G, Neukam F-W, Schultze-Mosgau S. Radiation-induced impairment of osseous healing with vascularized bone transfer: experimental model using a pedicled tibia flap in rat. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jul;33(5):486–92.
149. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, et al. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Mar 15;61(4):1189–96.
150. Eisenschenk A, Witzel C, Lautenbach M, Ekkernkamp A, Weber U, Küntscher MV. Impact of radiation therapy on healing and stability of vascularized bone grafts in a dog model. *Microsurgery*. 2006;26(5):412–6.
151. Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;47(8):602–7.
152. Nicholls F, Janic K, Filomeno P, Willett T, Gryn timer M, Ferguson P. Effects of radiation and surgery on healing of femoral fractures in a rat model. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2013 Aug;31(8):1323–31.
153. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007 Sep;38 Suppl 4:S3–6.
154. Miura M, Miura Y, Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis*. 2006 Nov;12(6):514–22.
155. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341–7.
156. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013;45:e54.
157. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004 Feb 10;109(5):656–63.

158. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(3):377–84.
159. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439–41.
160. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*. 2005;12(1):47–57.
161. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292–8.
162. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230–47.
163. Da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A*. 2009 Feb;15(2):221–9.
164. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41–9.
165. 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 Nov;254(2):317–30.
166. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007 Nov;25(11):2739–49.
167. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
168. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4164–73.
169. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
170. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 15;72(4):570–85.

171. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):150–4.
172. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279–95.
173. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005 Apr;129(1):118–29.
174. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101–9.
175. Caplan, Reuben, Haynesworth. Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Aug 3;33(1-2):3–14.
176. Shi Y-Y, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg.* 2005 Nov;116(6):1686–96.
177. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006 Feb;24(2):376–85.
178. Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2009 Dec;13(11-12):4385–402.
179. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2007 Feb;28(6):1005–13.
180. Mankani MH, Kuznetsov SA, Shannon B, Nalla RK, Ritchie RO, Qin Y, et al. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):542–50.
181. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997 Apr;6(2):125–34.
182. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):959–63.
183. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(6):913–27.

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 Mar;14(3):211–8.
185. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):385–6.
186. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*. 2007 May;13(5):947–55.
187. Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 2006 Feb;30(2):115–8.
188. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(21):3053–61.
189. Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Oct;30(5):373–9.
190. Terheyden H, Warnke P, Dunsche A, Jepsen S, Brenner W, Palmie S, et al. Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Dec;30(6):469–78.
191. Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3163–7.
192. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004 Sep 28;364(9436):766–70.
193. Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR*. 2014 Feb;100(1 Suppl):S107–112.
194. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*. 1989 Jun;60(3):334–9.
195. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*. 1995 Dec;18(12):1153–8.
196. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Sep;88 Suppl 1 Pt 2:322–7.

197. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430–7.
198. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(29):3973–82.
199. Jäger M, Jelinek EM, Wess KM, Scharfstadt A, Jacobson M, Kevy SV, et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009 Jan;4(1):34–43.
200. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893–9.
201. Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem (Tokyo)*. 2012 Mar;151(3):247–54.
202. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Aug;85-A(8):1425–35.
203. Zhang F, Qiu T, Wu X, Wan C, Shi W, Wang Y, et al. Sustained BMP signaling in osteoblasts stimulates bone formation by promoting angiogenesis and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2009 Jul;24(7):1224–33.
204. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg*. 2007 Aug;77(8):626–31.
205. Liebergall M, Schroeder J, Mosheiff R, Gazit Z, Yoram Z, Rasooly L, et al. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2013 Aug;21(8):1631–8.
206. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(6):CD006950.
207. Epstein NE. Commentary on research of bone morphogenetic protein discussed in review article: Genetic advances in the regeneration of the intervertebral disc. *Surg Neurol Int*. 2013;4(Suppl 2):S106–108.
208. Ali IHA, Brazil DP. Bone Morphogenetic Proteins and their Antagonists: Current and Emerging Clinical Uses. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr 24;
209. Sweeny L, Lancaster WP, Dean NR, Magnuson JS, Carroll WR, Louis PJ, et al. Use of recombinant bone morphogenetic protein 2 in free flap reconstruction for osteonecrosis of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2012 Aug;70(8):1991–6.

210. Mendonça JJ, Juiz-Lopez P. Regenerative facial reconstruction of terminal stage osteoradionecrosis and other advanced craniofacial diseases with adult cultured stem and progenitor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Nov;126(5):1699–709.
211. Pohl F, Hassel S, Nohe A, Flentje M, Knaus P, Sebald W, et al. Radiation-induced suppression of the Bmp2 signal transduction pathway in the pluripotent mesenchymal cell line C2C12: an in vitro model for prevention of heterotopic ossification by radiotherapy. *Radiat Res*. 2003 Mar;159(3):345–50.
212. Howard BK, Brown KR, Leach JL, Chang CH, Rosenthal DI. Osteoinduction using bone morphogenetic protein in irradiated tissue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Sep;124(9):985–8.
213. Würzler KK, DeWeese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg*. 1998 Mar;9(2):131–7.
214. Khouri RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg*. 1996 Jul;98(1):103–9.
215. Nussenbaum B, Rutherford RB, Krebsbach PH. Bone regeneration in cranial defects previously treated with radiation. *The Laryngoscope*. 2005 Jul;115(7):1170–7.
216. Kokorina NA, Zakharkin SO, Krebsbach PH, Nussenbaum B. Treatment effects of rhBMP-2 on invasiveness of oral carcinoma cell lines. *The Laryngoscope*. 2011 Sep;121(9):1876–80.
217. Kokorina NA, Lewis JS Jr, Zakharkin SO, Krebsbach PH, Nussenbaum B. rhBMP-2 has adverse effects on human oral carcinoma cell lines in vivo. *The Laryngoscope*. 2012 Jan;122(1):95–102.
218. Sand JP, Kokorina NA, Zakharkin SO, Lewis JS Jr, Nussenbaum B. BMP-2 expression correlates with local failure in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol-Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2014 Feb;150(2):245–50.
219. Desai SC, Sclaroff A, Nussenbaum B. Use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 for mandible reconstruction. *JAMA Facial Plast Surg*. 2013 May;15(3):204–9.
220. Xu J, Zheng Z, Fang D, Gao R, Liu Y, Fan Z, et al. Mesenchymal stromal cell-based treatment of jaw osteoradionecrosis in Swine. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1679–86.
221. Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):763–9.

222. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2009 Jun;17(6):939–46.
223. Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, et al. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 31;286(4):779–85.
224. Remy S, Tesson L, Usal C, Menoret S, Bonnamain V, Nerriere-Daguin V, et al. New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res*. 2010 Oct;19(5):745–63.
225. Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C, Bensidhoum M, et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011 Jul;15(7):1505–14.
226. Boukhechba F, Balaguer T, Bouvet-Gerbettaz S, Michiels J-F, Bouler J-M, Carle GF, et al. Fate of bone marrow stromal cells in a syngenic model of bone formation. *Tissue Eng Part A*. 2011 Sep;17(17-18):2267–78.
227. 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 Aug;15(8):2203–12.
228. Fang D, Seo B-M, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007 Apr;25(4):1021–8.
229. Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(29):5879–89.
230. 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 Jun 12;
231. Tsujigiwa H, Hirata Y, Katase N, Buery RR, Tamamura R, Ito S, et al. The role of bone marrow-derived cells during the bone healing process in the GFP mouse bone marrow transplantation model. *Calcif Tissue Int*. 2013 Mar;92(3):296–306.
232. Corre P, Merceron C, Vignes C, Sourice S, Masson M, Durand N, et al. Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an “all-in-one” study in nude mice. *PloS One*. 2013;8(12):e81599.
233. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop*. 1991 Aug;(269):274–83.

234. Phulpin B, Dolivet G, Marie P-Y, Poussier S, Huger S, Bravetti P, et al. Feasibility of treating irradiated bone with intramedullary delivered autologous mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:560257.

VIII. COMMUNICATIONS ISSUES DE CES TRAVAUX

Communications écrites

Publiées :

A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

Biomaterials 2009 Feb;30(5):763-9

Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck.

Malard O, **Espitalier F**, Bordure P, Daculsi G, Weiss P, Corre P.

Expert Rev Med Devices 2007;4(5):729-739

Soumises :

Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold.

Bléry P, Corre P, Malard O, Sourice S, Pilet P, Amouriq Y, Guicheux J, Weiss P, **Espitalier F**.

J Mater Sci-Mater M 2014 (en cours de révision)

Preservation of the pro-angiogenic potential of the stromal vascular fraction from adipose tissue in the regeneration of irradiated bone.

Thery A, Bléry P, Malard O, Pilet P, Sourice S, Corre P, Guicheux J, Weiss P, **Espitalier F**.

Bone 2014

Immunotolerance of a bone marrow allograft induced by cyclosporin-A without interaction on bone repair.

Espitalier F, Durand N, Pilet P, Sourice S, Weiss P, Guicheux J, Malard O.

Communications orales

Role of stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold to regenerate bone in irradiated area.

Espitalier F, Thery A, Bléry P, Guicheux J, Pilet P, Sourice S, Weiss P, Malard O.

ESB 2014, Liverpool (Angleterre), accepté.

Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue associated to a biomaterial to regenerate bone in irradiated area.

Thery A, Bléry P, Malard O, Guicheux J, Pilet P, Sourice S, Weiss P, **Espitalier F**.

TERMIS 2014, Genova (Italie).

Apport de l'ingénierie tissulaire pour la reconstruction osseuse d'un modèle de séquelles d'irradiation.

Espitalier F, Théry A, Bléry P, Guicheux J, Weiss P, Malard O.

46^{ème} congrès de la société française de carcinologie cervico-faciale 2013, Liège (Belgique).

Apport de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux associée à un biomatériau dans la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Thery A, Bléry P, Malard O, Guicheux J, Weiss P, **Espitalier F**.

120^{ème} congrès de la société française d'ORL Chirurgie de la face et du cou 2013, Paris.

Surgical technology for mandibular radionecrosis reconstruction using calcium phosphate bioceramics and total bone marrow.

Espitalier F, Jégoux F, Malard O.

International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials-ISACB6 2013, Nantes.

Evaluation de la néoformation osseuse en territoire irradié par l'apport de cellules souches mésenchymateuses à l'association phosphate de calcium biphasé-moelle osseuse totale.

Bléry P, **Espitalier F**, Corre P, Sourice S, Pilet P, Amouriq Y, Guicheux J, Weiss P, Malard O.

Société Française des Biomateriaux Dentaires 2012, Clermont-Ferrand.

Association de biomatériau, cellules souches et/ou moelle osseuse pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F.

Forum de recherche chirurgicale, 114^e congrès français de Chirurgie 2012, Paris.

Etude de l'association moelle osseuse / phosphate de calcium pour la régénération osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Grimandi G.

Journée dédiée à la réglementation des thérapies innovantes, Atlanpole Biotherapies 2012, Nantes.

Bone regeneration and engineering in irradiated fields.

Malard O, **Espitalier F**, Jegoux F, Weiss P, Daculsi G.

9th World Biomaterial Congress 2012, Chengdu (Chine).

Osseous Regeneration with GFP-labelled Bone Marrow Allograft in an Immunotolerant Rat Model.

Durand N, **Espitalier F**, Rémy S, Sourice S, Pilet P, Malard O, Guicheux J, Weiss P.

ESB 2011, Dublin (Irlande).

Allogreffe de moelle osseuse totale marquée et biomatériau phosphocalcique pour la reconstruction osseuse dans un modèle d'immunotolérance induite chez le rat.

Durand N, **Espitalier F**, Rémy S, Corre P, Sourice S, Pilet P, Colombeix C, Weiss P, Guicheux J, Malard O.

13^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés 2011, Paris.

Comparaison entre l'apport de cellules souches mésenchymateuses et l'apport de moelle osseuse à une céramique phosphocalcique pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Durand N, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

Matériaux 2010, Nantes.

Bone reconstruction in irradiated areas: comparison between mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Durand N, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

ESB 2010, Tampere (Finlande).

Nouvelles technologies chirurgicales de reconstruction osseuse en territoire irradié et dans les séquelles de radionécroses par biomatériaux hybrides. Des modèles animaux aux protocoles de recherche clinique de phase I.

Malard O, Jegoux F, **Espitalier F**, Weiss P, Daculsi G.

19th Interdisciplinary Research Conference on Biomaterials (GRIBOI) 2009, Martinique.

Comparaison entre l'apport de cellules souches mésenchymateuses et l'apport de moelle osseuse à une céramique phosphocalcique pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

9^{ème} forum des jeunes chercheurs en odontologie / Assises nationales de la recherche en odontologie 2008, Nantes.

Communications affichées

Stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a calcium phosphate scaffold to regenerate bone in irradiated area.

Espitalier F, Thery A, Bléry P, Guicheux J, Pilet P, Sourice S, Weiss P, Malard O.

16^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés 2014, Limoges.

Apport de cellules souches mésenchymateuses à l'association biomatériau phosphocalcique-moelle osseuse pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Bléry P, Corre P, Guicheux J, Weiss P, Malard O.

119^{ème} congrès de la société française d'ORL Chirurgie de la face et du cou 2012, Paris.

Apport des cellules souches mésenchymateuses à l'association BCP-moelle osseuse totale pour la néoformation osseuse en territoire irradié.

Bléry P, **Espitalier F**, Corre P, Weiss P, Guicheux J, Giumelli B, Amouriq Y, Malard O.
14^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés 2012, Bordeaux.

Evaluation de la néoformation osseuse en territoire irradié par l'apport de cellules souches mésenchymateuses à l'association phosphate de calcium biphasé – moelle osseuse totale.

Bléry P, **Espitalier F**, Corre P, Sourice S, Pilet P, Amouriq Y, Guicheux J, Weiss P, Malard O.

Forum des jeunes chercheurs en odontologie septembre 2011, Brest.

Apport de cellules souches mésenchymateuses à l'association phosphate de calcium biphasé – moelle osseuse totale pour la néoformation osseuse en territoire irradié.

Bléry P, **Espitalier F**, Corre P, Weiss P, Guicheux J, Giumelli B, Amouriq Y, Malard O.

35^{èmes} journées du collège national des enseignants en prothèses odontologiques septembre 2011, Marseille.

Comparaison entre l'apport de cellules souches mésenchymateuses et l'apport de moelle osseuse à une céramique phosphocalcique pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Durand N, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

5^{ème} colloque national des cellules souches de l'IFR 26 2009, Nantes.

Bone reconstruction in irradiated bone sequels: comparison between mesenchymal stem cells and total bone marrow in association to calcium phosphate scaffold.

Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, Jegoux F, Daculsi G, Weiss P, Malard O.

Griboi 2008, Montréal (Canada).

Comparaison entre l'apport de cellules souches mésenchymateuses et l'apport de moelle osseuse à une céramique phosphocalcique pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Espitalier F, Lerouxel E, Vinatier C, Beauvillain de Montreuil C, Weiss P, Malard O.

114^{ème} congrès de la société française d'ORL Chirurgie de la face et du cou 2007, Paris.

RESUMÉ et MOTS CLÉS

NOUVELLES APPROCHES D'INGENIERIE TISSULAIRE POUR LA RECONSTRUCION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIÉ

La chirurgie et la radiothérapie sont les principaux traitements de cancers des voies aéro-digestives supérieures. Les séquelles engendrées par ces traitements sont parfois lourdes. La reconstruction de la mandibule nécessite une autogreffe osseuse par lambeau vascularisé microanastomosé. Cependant, cette technique non dépourvue de complications, n'est pas toujours réalisable après radiothérapie. Une alternative est proposée par l'ingénierie tissulaire osseuse. Les précédentes études menées chez l'animal ont montré l'intérêt de l'association d'une greffe de moelle osseuse à un biomatériau phosphocalcique pour favoriser la régénération de l'os irradié.

Ce travail a eu pour but d'associer pour la première fois en territoire irradié des cellules issues de la moelle osseuse ou tissu adipeux à un biomatériau phosphocalcique, en raison de leurs capacités de réparation osseuse supérieures à la moelle osseuse démontrées en tissu osseux sain. Un modèle animal d'immunotolérance à l'allogreffe de moelle osseuse a par ailleurs été développé dans le but de suivre le devenir des cellules greffées.

La greffe de moelle osseuse a montré sa supériorité dans la réparation osseuse en territoire irradié. L'apport de fraction stromale du tissu adipeux a toutefois permis une néovascularisation sans formation osseuse. Les hypothèses émises sont en faveur du rôle trophique joué par la greffe de moelle, par l'intermédiaire des facteurs de croissance et des cytokines présentes au sein de la moelle et sécrétées par les cellules.

L'association biomatériau phosphocalcique-moelle osseuse est actuellement le matériau de comblement le plus efficace pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.

Mots-clés : Cancers des voies aéro-digestives supérieures, radiothérapie, ostéoradionécrose, ingénierie tissulaire, biomatériau phosphocalcique, cellules souches mésenchymateuses, moelle osseuse, tissu adipeux.

NEW TISSUE ENGINEERING APPROACHES FOR BONE RECONSTRUCTION IN IRRADIATED AREAS

Surgery and radiotherapy are both necessary to treat squamous cell cancer of the upper aerodigestive tract. The side effects of these treatments are important. Reconstruction of the mandible bone requires a vascularized bone autograft. Complications are observed with this technique, which cannot always be performed after radiotherapy. Bone tissue engineering gives an alternative. Previous animal studies showed that an association of a bone marrow graft with a calcium phosphate scaffold was necessary to regenerate bone in irradiated areas.

This work aimed to associate bone marrow cells or adipose tissue cells with a calcium phosphate scaffold for the first time in irradiated areas. These cells have shown better bone repair abilities than bone marrow graft in healthy bone. An immunotolerant animal model to bone marrow allograft has also been developed to follow the fate of the grafted cells.

Bone marrow graft showed its superiority in bone repair in irradiated areas. However, the contribution of vascular fraction of adipose tissue allowed neovascularization without bone formation. Hypotheses were in favour of the trophic role of the bone marrow, through growth factors and cytokines present in the bone marrow and secreted by the cells.

The association of bone marrow and calcium phosphate scaffold is currently the most effective filling material for bone reconstruction in irradiated areas.

Key words: cancer of the upper aerodigestive tract, radiotherapy, osteoradionecrosis, tissue engineering, calcium phosphate scaffold, mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue.