

UNIVERSITE DE NANTES
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Année 2017

Thèse n° 056

**Cellules souches mésenchymateuses et
biomatériaux : intérêt en médecine
régénératrice osseuse oro-faciale. Du
laboratoire à la clinique.**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

Serge BAROTH

Né le 09 décembre 1979

Le 05 décembre 2017, devant le jury ci-dessous :

Président : M. le Professeur Pierre WEISS

Assesseur : M. le Docteur Zahi BADRAN

Assesseur : M. le Docteur Xavier STRUILLLOU

Assesseur : M. le Docteur Guy DACULSI

Directeur de thèse : M. le Professeur Philippe LESCLOUS

UNIVERSITÉ DE NANTES	
Président	Pr LABOUX Olivier
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE	
Doyen	Pr GIUMELLI Bernard
Assesseurs	Dr RENAUDIN Stéphane Pr SOUEIDAN Assem Pr WEISS Pierre
Professeurs des Universités Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	
Monsieur AMOURIQ Yves Monsieur GIUMELLI Bernard Monsieur LE GUEHENNEC Laurent Monsieur LESCLOUS Philippe	Madame LICHT Brigitte Madame PEREZ Fabienne Monsieur SOUEIDAN Assem Monsieur WEISS Pierre
Professeurs des Universités	
Monsieur BOULER Jean-Michel	
Professeurs Emérites	
Monsieur BOHNE Wolf	Monsieur JEAN Alain
Praticiens Hospitaliers	
Madame DUPAS Cécile Madame LEROUXEL Emmanuelle	Madame HYON Isabelle Madame GOEMAERE GALIERE Hélène
Maîtres de Conférences Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	Assistants Hospitaliers Universitaires des C.S.E.R.D.
Monsieur AMADOR DEL VALLE Gilles Madame ARMENGOL Valérie Monsieur BADRAN Zahi Madame BLERY Pauline Monsieur BODIC François Madame DAJEAN-TRUTAUD Sylvie Madame ENKEL Bénédicte Monsieur GAUDIN Alexis Monsieur HOORNAERT Alain Madame HOUCHMAND-CUNY Madline Madame JORDANA Fabienne Monsieur KIMAKHE Saïd Monsieur LE BARS Pierre Madame LOPEZ-CAZAUX Serena Monsieur NIVET Marc-Henri Madame RENARD Emmanuelle Monsieur RENAUDIN Stéphane Madame ROY Elisabeth Monsieur STRUILLLOU Xavier Monsieur VERNER Christian	Monsieur ABBAS Amine Monsieur AUBEUX Davy Madame BERNARD Cécile Monsieur BOUCHET Xavier Madame BRAY Estelle Madame CLOITRE Alexandra Monsieur DRUGEAU Kévin Madame GOUGEON Béatrice Monsieur LE BOURHIS Antoine Monsieur LE GUENNEC Benoît Monsieur LOCHON Damien Madame MAÇON Claire Madame MAIRE-FROMENT Claire-Hélène Madame MERCUSOT Marie-Caroline Monsieur OUVRARD Pierre Monsieur PRUD'HOMME Tony Monsieur SARKISSIAN Louis-Emmanuel
Maître de Conférences	
Madame VINATIER Claire	
Enseignants Associés	A.T.E.R.
Monsieur KOUADIO Ayepa (Assistant Associé) Madame LOLAH Aoula (MC Associé) Madame MERAMETDJIAN Laure (MC Associé) Madame RAKIC Mia (PU Associé)	

Mise à jour le 01/09/2017

Par délibération en date du 6 décembre 1972, le conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

SOMMAIRE

I. Partie I : Tissu osseux et cicatrisation	4
A. Organisation du tissu osseux	4
B. Biologie de la réparation tissulaire osseuse :	5
1. Phase inflammatoire	5
2. Phase réparatrice	6
3. Phase de remodelage	7
C. Etiologies des pertes osseuses de la sphère oro faciale et leurs conséquences	8
1. Les fentes cranio-faciales	9
2. Les cancers de la cavité orale	9
3. Traumatismes	10
4. Les pertes bucco-parodontale	10
a) Parodontologie	10
b) Implantologie	10
D. Les approches thérapeutiques pour la régénération osseuse	11
1. Les greffes osseuses biologiques	11
2. Les matériaux et substituts osseux synthétiques	11
E. L'ingénierie tissulaire osseuse : Définition	12
II. Partie II : Biomatériaux d'intérêt et ingénierie tissulaire osseuse	14
A. Les matrices utilisées en ingénierie tissulaire osseuse :	14
1. Les polymères d'origine naturelle :	15
a) Collagène :	16
b) Cellulose :	16
c) La fibronectine	17
d) Le chitosan	17
e) L'alginate et l'agarose	17
f) La fibroïne	18
2. Les polymères synthétiques :	18
a) Les polylactides :	18
b) Les polyglycolides :	19
c) Le polycaprolactone	19
3. Les céramiques :	20
a) L'hydroxyapatite	20
b) Le phosphate tricalcique	20
c) Les phosphates de calcium biphasés	20
d) Le bioverre	20
4. La combinaison des matériaux	21
B. Les différents facteurs impliqués (exogènes et de structure)	21
1. Modification des biomatériaux pour la culture des cellules souches :	21
a) Nanostructures	22
b) Porosité	23
c) Apport de molécules bioactives	23
2. Les facteurs de croissance utilisés en ITO	25
3. Les différentes stratégies d'incorporation des molécules bioactives	26
4. Importance de la vascularisation	28
Partie III : Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire osseuse	31
C. Les cellules	31
1. Les ostéoblastes	31

2.	Les cellules souches	31
3.	Les cellules souches embryonnaires (CSE)	32
4.	Les cellules souches adultes (CSA)	32
D.	Différenciation ostéogénique des CSM	35
1.	Critères définissant les CSM selon la société internationale pour la thérapie cellulaire ISCT : ..	35
2.	Les marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéogénique	36
3.	Evaluation de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses cultivées in vitro	38
4.	Facteurs chimiques de différenciation ostéogénique in vitro des CSM :	39
a)	Le dexaméthasone	40
b)	L'acide ascorbique	40
c)	Le β -glycérophosphate	41
d)	La vitamine D3	41
5.	Facteurs de croissance et différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses :	42
a)	Superfamille TGF- β	42
b)	Le transforming growth factor-beta (TGF- β)	42
c)	Les bone morphogenic proteins (BMP)	42
d)	Les protéines wnt	43
e)	Insulin growth factor (IGF)	44
f)	Fibroblast growth factor (FGF)	44
g)	Platelet derived growth factor (PDGF)	45
h)	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	45
i)	Platelet rich plasma (PRP)	45
6.	Facteurs physiques de différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses : ..	46
7.	Les bioréacteurs	47
III.	Partie IV : Etudes <i>in vivo</i> : Analyse de la littérature scientifique	50
A.	Méthodologie de recherche documentaire :	50
a)	Critères d'inclusion	50
b)	Critères d'exclusion	50
2.	Bases de données de recherche bibliographique	51
3.	Éléments relevés	51
B.	Résultats	52
1.	Etudes animales :	52
a)	Allogreffe :	56
b)	Xénogreffe :	56
c)	β -TCP :	57
d)	HA/TCP :	57
e)	Matériaux composites :	58
2.	Etudes chez l'homme : Sphère oro-faciale :	58
a)	Greffe osseuse biologiques (autogreffe, allogreffe et xenogreffe) :	60
b)	β -TCP	60
c)	HA/TCP	61
C.	Discussion :	62
1.	Etudes précliniques	62
a)	Selon le modèle animal :	62
b)	Du point de vue des méthodes de préparation des construits cellules/matrices	63
c)	Selon les méthodes analytiques	65
d)	Du point de vue des matériaux	65

e) Selon les résultats.....	66
2. Etudes chez l'homme.....	67
D. Conclusion	68
E. Bibliographie.....	69
F. Table des abréviations	89
G. Tables des illustrations.....	90
H. Liste des tableaux	91

I. PARTIE I : TISSU OSSEUX ET CICATRISATION

A. Organisation du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé impliqué dans la protection et le mouvement du corps. Il est composé d'une phase organique et d'une phase minérale. La matrice organique est constituée à 90% de collagène (dont 80% de type I), les 10% restant, étant les protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéonectine, sialoprotéines et divers protéoglycanes). Les protéines non collagéniques participent au processus de maturation de la matrice, sa minéralisation et la régulation des cellules osseuses. La phase minérale est constituée de cristaux de phosphate de calcium dont le rapport Ca/P varie selon la maturation de ceux-ci. On trouve à l'intérieur de cette matrice osseuse, des espaces médullaires ainsi que des vaisseaux sanguins. Les trois principaux types cellulaires identifiés sont les ostéoblastes (cellules responsables de la formation de l'os), les ostéocytes (cellules dérivées des ostéoblastes englobées dans la matrice et responsables des signaux matriciels) et les ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse). Durant la phase de formation osseuse, les ostéoblastes sont recrutés à partir des cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentes dans la moelle osseuse (MO). Les ostéoclastes sont quant à eux dérivés des cellules souches hématopoïétiques (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) qui fusionnent, laissant place à des cellules géantes multinucléées (1). La compréhension des mécanismes qui contrôlent la différenciation des CSM en ostéoblastes est un élément déterminant pour appréhender la régénération osseuse.

B. Biologie de la réparation tissulaire osseuse :

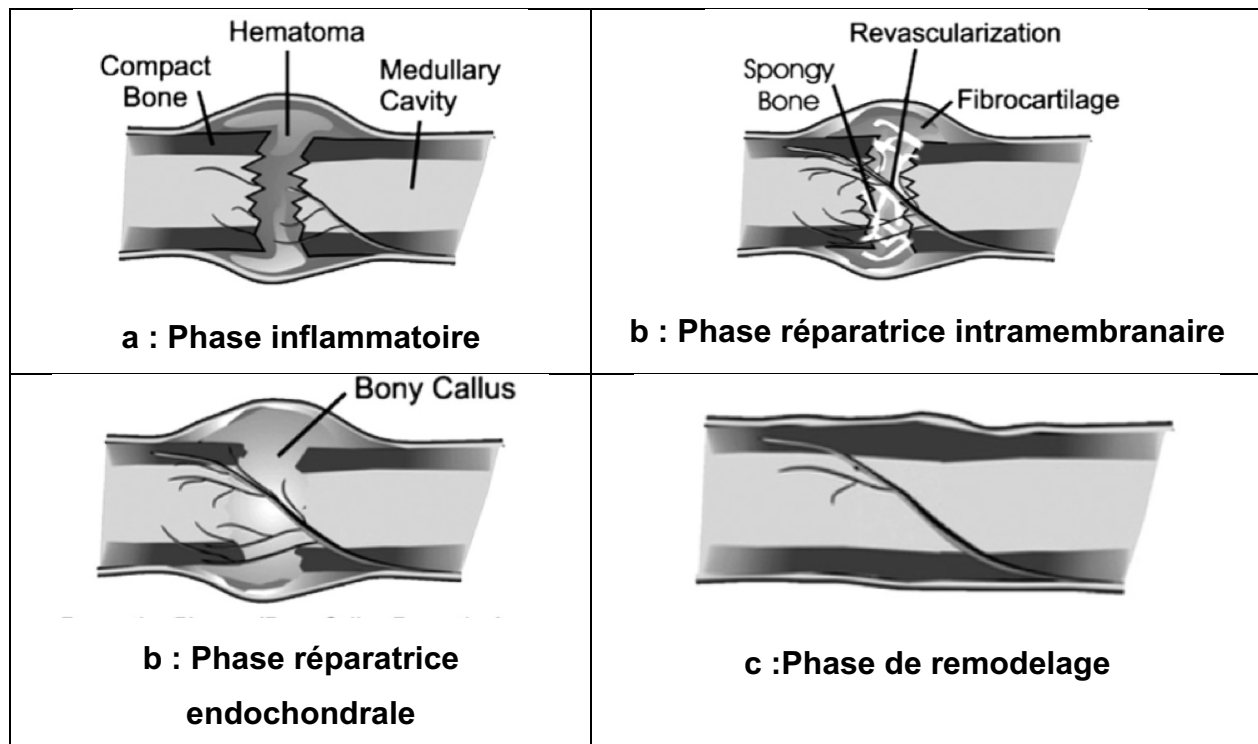


Figure 1 : Représentation des différentes phases de la réparation d'une fracture osseuse

D'après (2)

La séquence des événements cellulaires et moléculaires qui ont lieu durant la cicatrisation et le développement du tissu osseux est maintenant mieux connue (3) (4). Plusieurs types cellulaires sont recrutés à différentes étapes de la cicatrisation en réponse aux facteurs de croissance et des cytokines. Les travaux réalisés ont permis d'établir et de proposer différentes stratégies pour la réparation osseuse. Trois phases principales peuvent être distinguées (figure 1) (5) :

- 1) Phase inflammatoire
- 2) Phase réparatrice (incluant l'ossification intramembranaire et endochondrale)
- 3) Phase de remodelage

1. Phase inflammatoire

Cette phase intervient immédiatement après la fracture osseuse et dure chez l'homme environ 1 semaine. Les lésions de la moelle osseuse et des vaisseaux vont permettre la formation d'un hématome qui facilite l'arrivée des cellules souches mésenchymateuse

CSM sur le site de fracture (5). La réponse pro-inflammatoire initiale induit la sécrétion du tumor necrosis factor alpha (TNF- α), et des interleukines IL-1 et IL-6 notamment. Ces facteurs permettent le recrutement des cellules inflammatoires et favorisent l'angiogenèse. Pendant l'homéostasie, les plaquettes vont libérer du transforming growth factor beta (TGF- β) et du platelet derived growth factor (PDGF) afin de stimuler les CSM et les macrophages. Les macrophages, initialement recrutés pour éliminer les débris et le tissu nécrotique sécrète à leur tour des cytokines et des facteurs de croissance comme le fibroblast growth factor FGF-1 et FGF-2, l'IL-1 et à nouveau le TGF- β qui favorisent également l'angiogenèse au sein de la fracture (6). Les CSM recrutées à partir de la moelle osseuse, du périoste se différencient en fibroblastes, chondrocytes et ostéoblastes (7).

Formation de l'hématome + Infiltration des fibroblastes

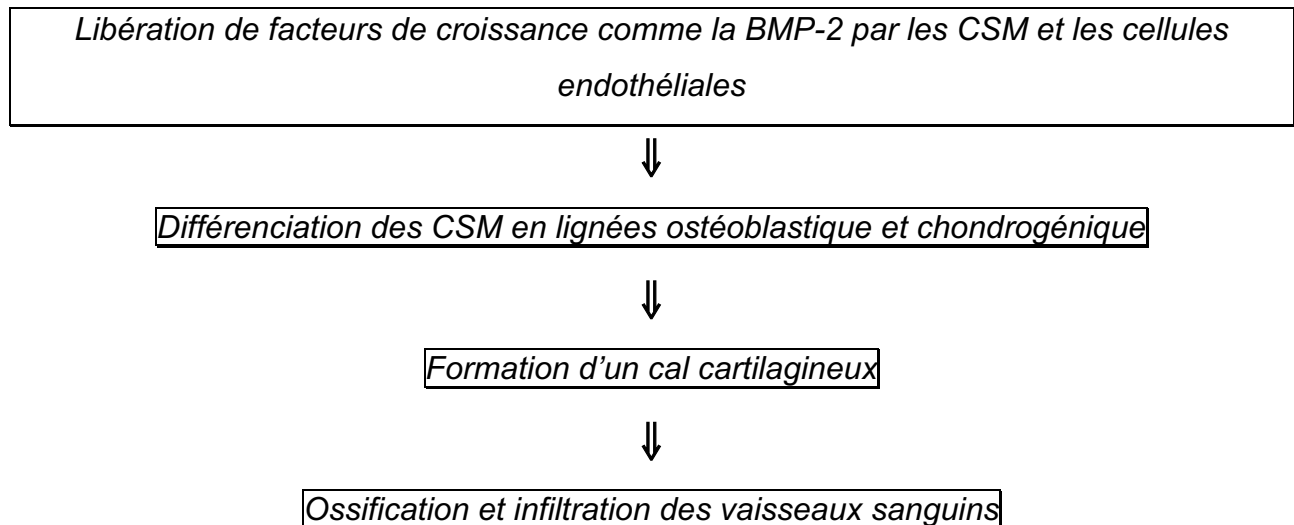


Infiltration des plaquettes, neutrophiles et macrophages + Libération de FGF, TNF- α , PDGF, VEGF, TGF- β , IL-1 et IL-6 + Recrutement des ostéoprogéniteurs

2. Phase réparatrice

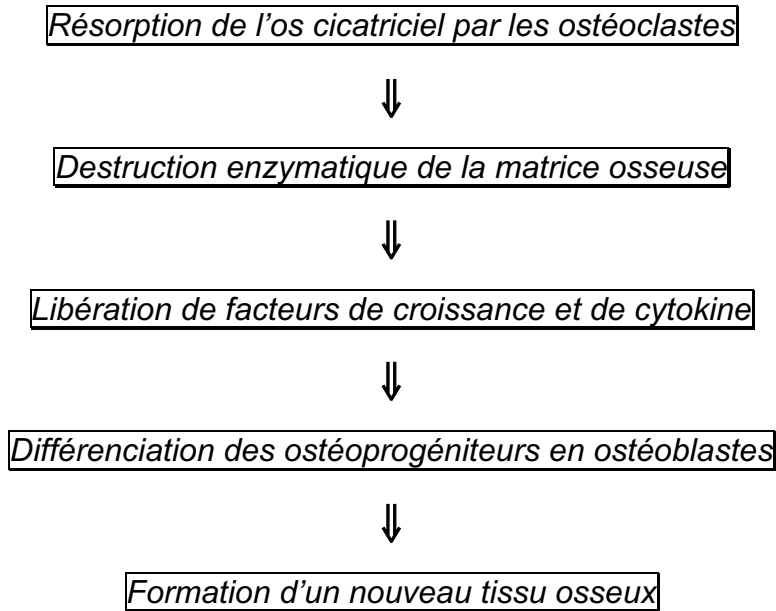
Lors de cette phase, l'ossification intramembranaire (IM) et endochondrale (EC) se produisent simultanément. L'ossification IM va induire immédiatement la différenciation ostéoblastique pour produire un cal dur. Ces ostéoblastes vont sécréter du TGF- β , du fibroblast growth factor FGF-1/FGF-2, de l'insulin-like growth factor I (IGF-I), ainsi que des bone morphogenetic protein BMP. Au contraire, l'ossification EC requière en amont la formation d'un tissu cartilagineux intermédiaire avant ossification. Les chondrocytes présents au sein de ce cal mou prolifèrent et expriment différents facteurs TGF- β , IGF-I, IGF-II, BMP-2, BMP-4, and BMP-7 en association avec une augmentation de la synthèse de collagène et de la matrice cartilagineuse (2). Les chondrocytes présents vont s'hypertrophier et permettent la régulation du VEGF nécessaire à la vascularisation et l'ossification du cartilage. Les vaisseaux néoformés, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules de la moelle osseuse envahissent alors la matrice cartilagineuse hypertrophique. La minéralisation qui s'en suit est régulée par l'expression de la

phosphatase alcaline PAL, l'ostéonectine ON (protéine de liaison du calcium), l'ostéocalcine OC (régulateur de l'hydroxyapatite), le TGF- β (augmente l'expression de la PAL et de l'ON) et des BMP 2, 4, 7 et 9. L'IL-6 est produite par les ostéoblastes afin de stimuler la résorption osseuse, pendant que l'IGF-II module la résorption médiée par les ostéoclastes. La phase de remodelage peut alors débuter (3) (8) (5).



3. Phase de remodelage

Cette phase consiste au remplacement de l'os primaire cicatriciel par un os lamellaire par les ostéoprogéniteurs qui se différencient en ostéoblastes (formation osseuse) et en ostéoclastes (résorption osseuse). L'ostéopontine permet l'ancrage des ostéoclastes à la matrice osseuse lors de la résorption pendant le remodelage(9). Les contraintes mécaniques vont ensuite agir dans le processus de remodelage.



C. Etiologies des pertes osseuses de la sphère oro faciale et leurs conséquences

La réparation spontanée *ad integrum* a toutefois ses limites. Notamment dans des situations comme les défauts osseux de taille critique (perte de substance osseuse dont le comblement ne peut intervenir spontanément du fait des seules capacités physiologiques du patient), des zones lésées hypotrophiques que l'on peut retrouver après traumatisme, malformation, ou en cas d'irradiation. Le tissu osseux ne sera alors pas en mesure de cicatriser correctement. Dans ce cas, il y aura persistance d'un défaut osseux ou d'un tissu cicatriciel incapable de remplir ses rôles mécanique et physiologique.

Il existe plusieurs étiologies des atteintes cliniques du tissu osseux dans le contexte de la région maxillo-faciale et qui nécessitent l'apport d'un matériau permettant la cicatrisation osseuse *ad integrum*. Ces pertes osseuses sont variées et peuvent survenir tout au long de la vie du patient (10). Ainsi, on différencie :

- Les défauts osseux congénitaux (macrognathie, fentes) ;
- Les pertes osseuses pathologiques (maladies parodontales, kystes, ostéonécroses, tumeurs) ;
- Les pertes osseuses traumatiques ;
- Les pertes osseuses chirurgicales (avulsion de dent incluse, résection apicale...) ;

1. Les fentes cranio-faciales

Ce sont des malformations congénitales acquises lors du développement embryonnaire. Les fentes alvéolaires, qu'elles soient associées ou non à une fente du palais nécessitent pour être traitées, un apport osseux afin de combler le hiatus entre l'orifice nasal et palatin (figure 2). Lors de la reconstruction de la partie osseuse du palais primaire (os alvéolaire) une greffe osseuse est nécessaire dans environ 40 % des cas.

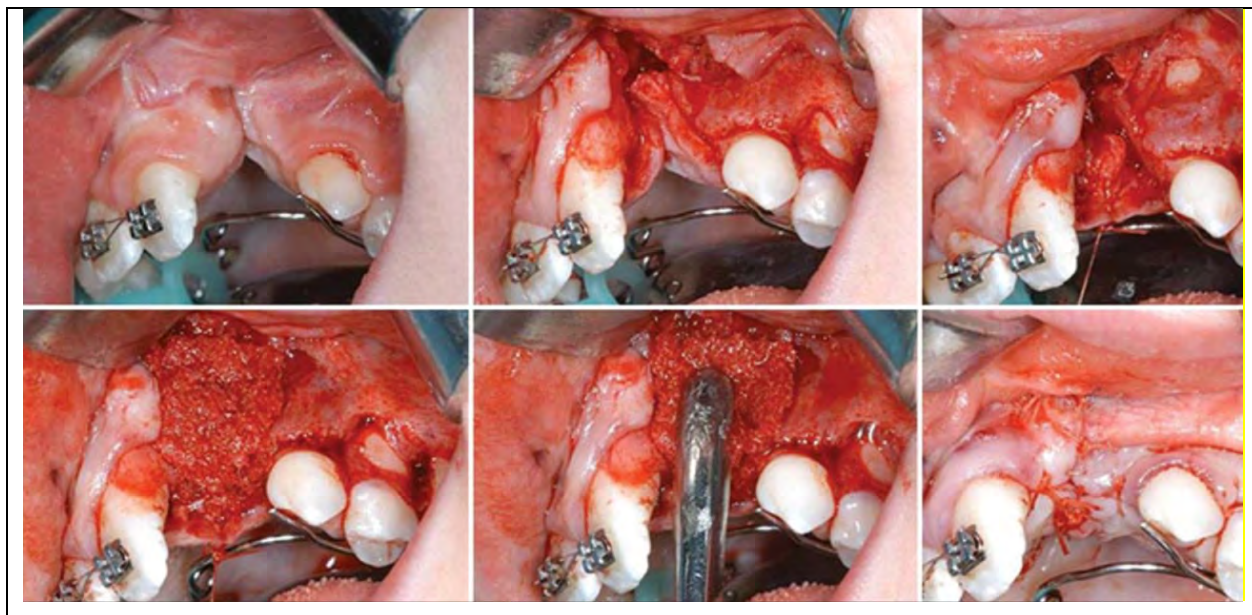


Figure 2 : Illustration d'un comblement osseux d'une fente palatine à l'aide d'un biomatériau

D'après (11)

2. Les cancers de la cavité orale

Ils sont dus essentiellement à l'association de deux substances cancérigènes : le tabac et l'alcool. Il s'agit le plus souvent de carcinomes épidermoïdes. Le traitement, s'effectue par une chirurgie d'exérèse lorsqu'elle est possible, associée à une radiothérapie et/ou une chimiothérapie. La réhabilitation fonctionnelle passe par une reconstruction adaptée notamment sur le plan osseux par utilisation de plaques en titane et les adjonctions par greffes osseuses libres ou anastomosées. Néanmoins, les radiations ionisantes peuvent engendrer de graves complications osseuses, à savoir l'ostéoradionécrose. Elles vont fortement diminuer le potentiel de régénération osseuse par hypoxie, hypocellularité et hypovascularisation.

3. Traumatismes

Les causes traumatiques des défauts osseux cranio faciaux sont multiples : rixes, accidents de la voie publique, chutes, lésions balistique. Les localisations fracturaires et les pertes osseuses sont multiples et peuvent nécessiter l'apport d'une greffe osseuse.

4. Les pertes bucco-parodontale

a) Parodontologie

Les substitutions osseuses en parodontologie concernent les lésions angulaires (poches parodontales), les lyses inter-radiculaires (LIR), et les pertes de volume antérieures. Les techniques régénératrices ne s'adressent qu'aux lésions intra-osseuses angulaires ou circonférentielles égales ou supérieures à 3 mm. Indépendamment de la profondeur et de la largeur de la lésion, le nombre de parois osseuses résiduelles ainsi que leur morphologie et leur situation vont être déterminantes pour l'application de ces techniques.

b) Implantologie

A la suite des pertes dentaire, le déficit osseux se caractérise par des déhiscences, des fenestrations, des manques de hauteur ou de largeur de la crête osseuse. Dans un esprit conservateur et régénérateur, l'application de biomatériaux immédiatement après une extraction permet d'accélérer la cicatrisation osseuse et d'éviter l'alvéolyse et donc de conserver le capital osseux, afin de favoriser la pose de futurs implants (figure 3). En effet, la résorption osseuse alvéolaire la plus importante survient dans les trois mois suivant la perte dentaire. La paroi vestibulaire du maxillaire, surtout dans le secteur incisivo-canin est particulièrement touchée par ce phénomène, la corticale osseuse y étant particulièrement fine.

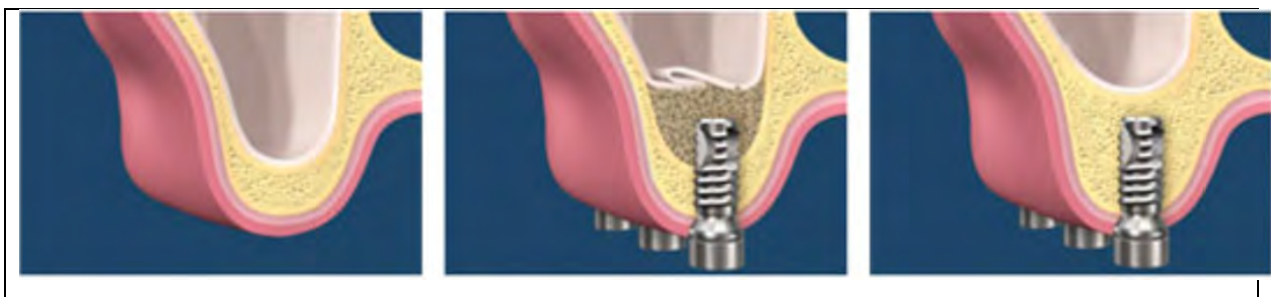


Figure 3 : Illustration d'une résorption osseuse suite à une extraction dentaire et son comblement permettant la mise en place d'un implant dentaire

D. Les approches thérapeutiques pour la régénération osseuse

Plusieurs approches existent et utilisent des matériaux d'origine biologique ou bien des substituts osseux synthétiques permettant la régénération osseuse (12).

1. *Les greffes osseuses biologiques*

L'utilisation des greffes osseuses biologiques demeure majoritaire. On distingue principalement deux types de greffes osseuses : l'autogreffe et l'allogreffe. (i) L'autogreffe, considéré comme le « gold » standard des greffes osseuses car le plus anciennement et le plus couramment utilisé (13), possède un grand potentiel ostéogénique et n'induit pas de réponse immunitaire de rejet. Le greffon est prélevé sur le patient (crête iliaque, os parietal, branche montante...) et est ensuite réimplanté au niveau du site receveur (14). Cependant, la nécessité d'un second site chirurgical peut entraîner des complications (morbidity) et les quantités d'os disponibles sont limitées. (ii) L'allogreffe prise à partir de donneurs ou de cadavres, contourne les inconvénients de l'autogreffe. Néanmoins ce type de greffe présente le risque de transmission de pathogènes (virus, prions) ; par exemple, il est estimé que le risque de transmission du VIH est de 1 pour 1,6 million (15). Afin de minimiser ces risques, différents traitements sont appliqués aux allogreffes comme la congélation, la stérilisation par irradiation ou vapeur d'oxyde d'éthylène, ceux-ci altérant les propriétés biologiques et / ou mécaniques du tissu et entraînent d'importants coûts.

Les inconvénients liés aux greffes osseuses d'origine biologique ont incité les communautés scientifiques et médicales à développer des matériaux alternatifs aux greffes osseuses d'origine biologique.

2. *Les matériaux et substituts osseux synthétiques*

Le nombre et la variété des biomatériaux implantés en chirurgie réparatrice sont importants. Dans le domaine de la reconstruction des tissus durs uniquement (16), cette diversité est toute aussi importante et l'on peut retrouver des matériaux d'origine variée comme :

- Les métaux comme le titane, les alliages de titane, l'acier inoxydable, les alliages cobalt-chrome ;
- Les polymères comme les poly-méthyl méthacrylates, les poly-lactides, le poly-éthylène haute densité ;
- Les céramiques comme les oxydes de zircon, l'oxyde d'alumine, les bioverres, les phosphates de calcium ;

En dépit des multiples stratégies utilisées dans la technologie de ces matériaux et qui ont largement contribué à l'amélioration de la régénération osseuse, aucun ne remplit toutes les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du gold standard qu'est la greffe osseuse autologue. La cicatrisation osseuse incomplète génère alors un tissu cicatriciel qui ne permet pas à l'os de retrouver ses fonctions biologique et fonctionnelles *ad integrum*.

Dans le milieu des années 80 se développe alors un nouvel axe qu'est l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO)

E. L'ingénierie tissulaire osseuse : Définition

Langer et Vacanti (17) définissent l'ingénierie tissulaire ITO comme « un champ de recherche interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie au travers du développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction d'un tissu ». Au contraire des approches classiques utilisant des biomatériaux seuls, l'ingénierie tissulaire (IT) est basée sur la compréhension des mécanismes permettant de former et régénérer des tissus biologiques avec pour objectif d'induire un nouveau tissu fonctionnel plutôt que de changer simplement un implant (18). Les chercheurs ont l'espoir d'atteindre cet objectif en combinant les connaissances de plusieurs disciplines incluant la physique, la chimie, l'ingénierie, la science des matériaux, la biologie et la médecine (17-19).

Quels sont les éléments requis à la croissance d'un nouvel os ? D'un point de vue biologique, des cellules, une matrice extracellulaire, des interactions intercellulaires et cellules/matrice ainsi que des facteurs de croissance sont essentiels. Néanmoins, ces composants ne sont pas les seuls éléments nécessaires à l'ITO. En effet le tissu osseux possède une architecture tridimensionnelle et les cellules qui induiront un nouvel os ont

besoin d'une structure 3D lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*. Cette matrice devra imiter la structure osseuse afin que le tissu néoformé se développe dans un environnement 3D. De plus tous les composants cellulaires et matriciels se doivent d'être coordonnés parfaitement dans l'espace et le temps.

Historiquement, l'ITO consiste dans un premier temps à prélever la moelle osseuse du patient. Les CSM sont ensuite isolées, amplifiées et différenciées *in vitro* pour finalement êtreensemencées sur des matrices spécifiques avant réimplantation de l'ensemble de la construction sur le patient au niveau du défaut osseux (figure 4). Des études *in vivo* ont cherché à évaluer et démontrer l'efficacité de l'ITO sur la régénération osseuse avec des résultats contrastés notamment sur les essais cliniques (20-22). Ces résultats mitigés sont dus à des difficultés de mise en œuvre des procédés de laboratoire et de leur application en clinique évoquant la complexité de ce concept pluridisciplinaire.

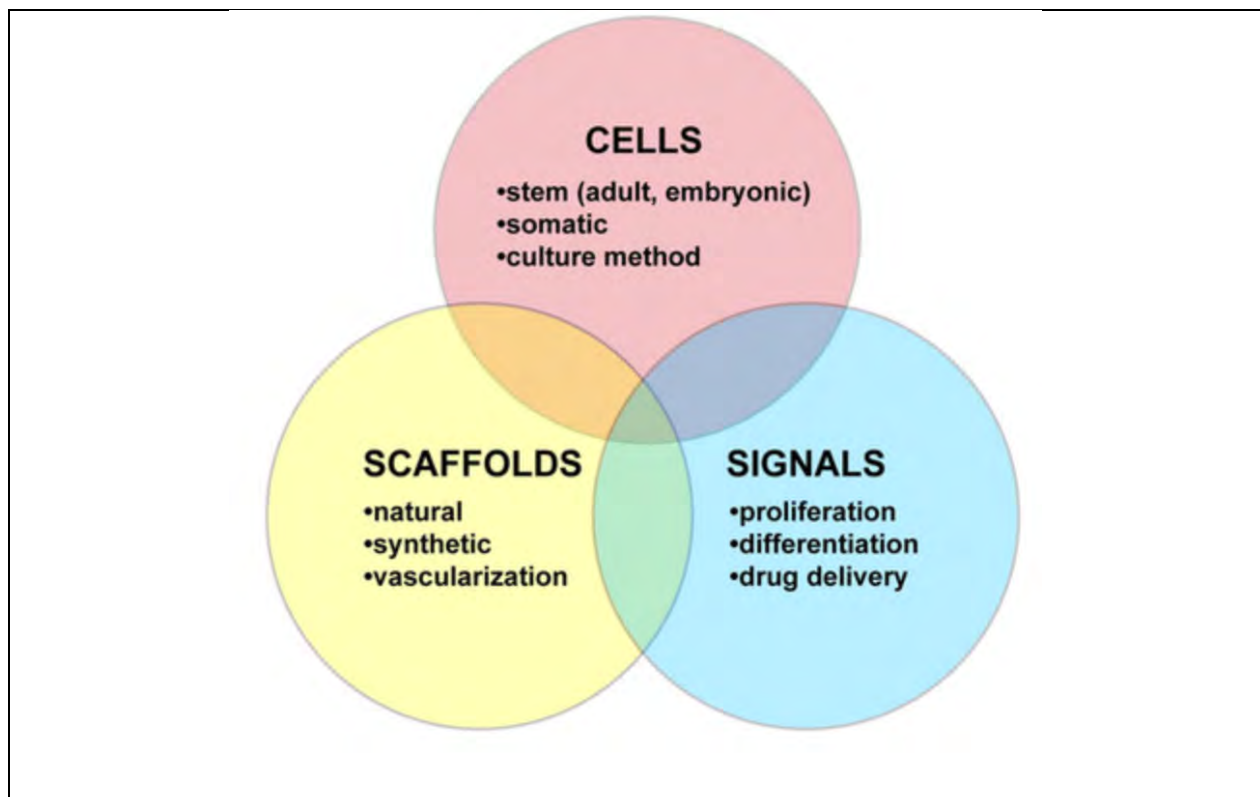


Figure 4 : Principe de base de l'ingénierie tissulaire

D'après (23)

II. PARTIE II : BIOMATERIAUX D'INTERET ET INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

A. Les matrices utilisées en ingénierie tissulaire osseuse :

Les matrices ou échafaudages utilisés en ITO sont des matériaux tridimensionnels poreux ou fibreux. Leur rôle premier est d'assurer une structure tridimensionnelle aux cellules (24). La matrice idéale doit posséder un certain nombre de propriétés qui lui permettra de se comporter comme un véritable tissu osseux (figure 5). Ces caractéristiques sont les suivantes :

- Posséder des propriétés de surface optimisées pour l'attachement, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire adaptée au tissu hôte.
- Biocompatibilité avec l'absence de réponse immunitaire.
- Biodégradabilité (le taux de dégradation devant correspondre au tissu hôte).
- Porosité adéquate permettant la croissance cellulaire, la vascularisation et la diffusion des nutriments (25).
- Propriétés mécaniques en accord avec le tissu hôte.

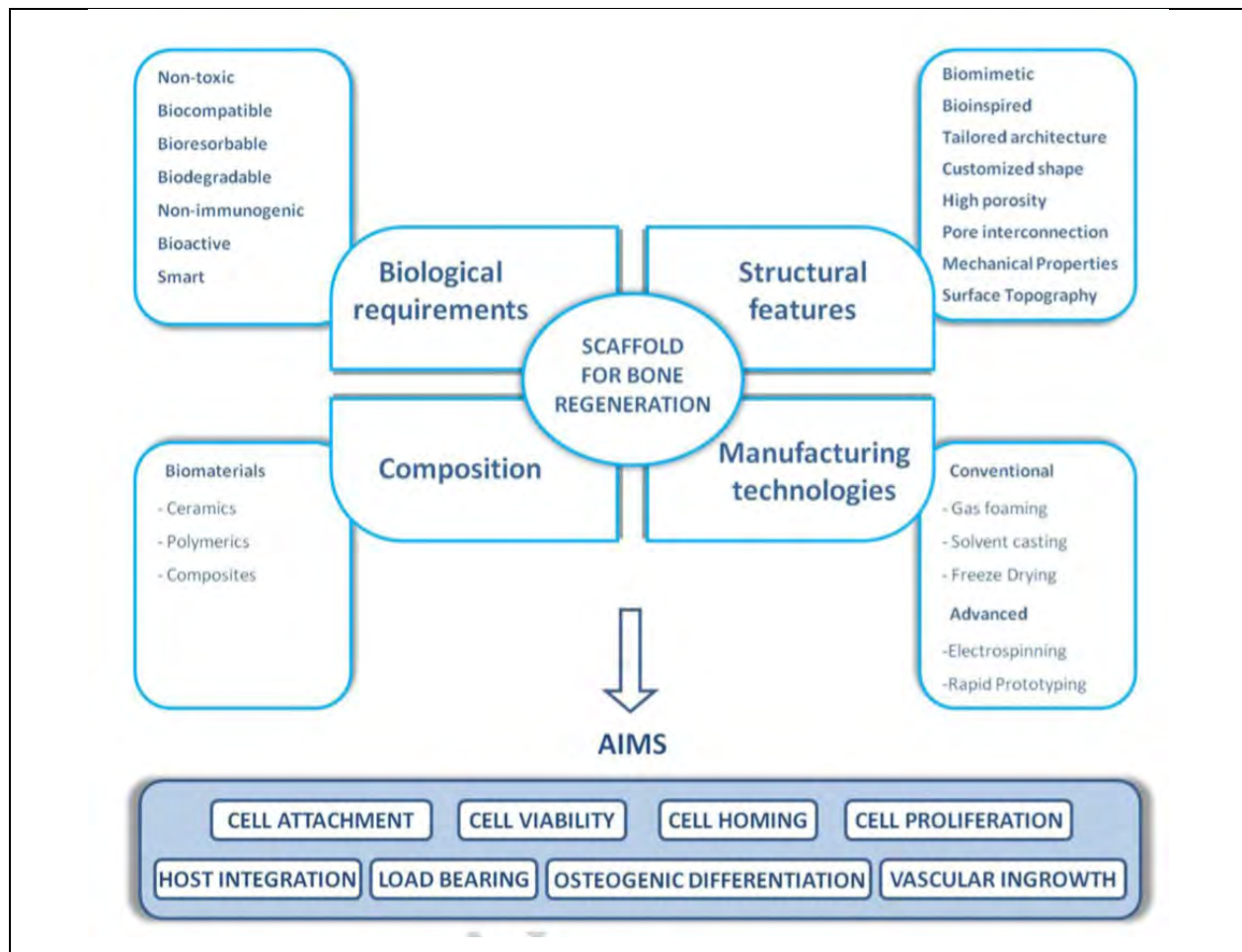


Figure 5 : Propriétés de la matrice idéale pour l'ingénierie tissulaire osseuse

D'après (26)

La sélection du matériau est une des étapes les plus importantes lors de la greffe osseuse. Ses fonctions devront être similaires à la matrice extracellulaire (MEC) et donc le support devra partiellement mimer ses capacités (27). De manière générale, on retrouve trois grandes familles de matériaux utilisés dans la conception des matrices pour l'ITO :

- Les polymères d'origine naturelle,
- Les polymères synthétiques,
- Les céramiques (28) (29).

1. Les polymères d'origine naturelle :

Comme son terme le suggère, ces matériaux dérivent de sources naturelles. Ils sont composés d'un réseau de molécules et peuvent contenir jusqu'à 99% d'eau. Appelés

également hydrogels, leur capacité à retenir les molécules d'eau simule les conditions d'hydratation des tissus vivants (30, 31). Ils possèdent également une structure très similaire à la matrice extracellulaire MEC qui contribue à favoriser des conditions ostéogéniques (29). On retrouve les polypeptides, les polysaccharides, les polyesters et leurs combinaisons (32).

a) Collagène :

Il s'agit d'un des matériaux naturels les plus commun servant de base à la fabrication des matrices pour l'ITO. C'est une protéine fibrillaire composant la base des tissus conjonctifs et leur confèrent leur force et élasticité. Avec l'hydroxyapatite (HA), le collagène est un des composant majeur du tissu osseux. Ainsi, il a pour avantages sa biocompatibilité, ses propriétés adhésives, sa structure fibrillaire et son importante compatibilité avec d'autres matériaux lui permettant d'être utilisé dans la fabrication des matrices pour l'ITO (33-35). Le collagène de type 1 est le plus fréquemment utilisé (33) (36). On peut le retrouver sous forme d'éponges macroporeuses ou de membranes fibreuses (28) (33). En dépit des qualités décrites, le collagène possède malgré tout des inconvénients inhérents à sa nature protéique. Lors de sa dégradation, le collagène est exposé à des enzymes spécifiques (collagénases) ainsi qu'aux macrophages rendant sa vitesse de dégradation importante. Ses propriétés mécaniques sont également un inconvénient pour le développement de matrice nécessitant, dans certaines indications, des propriétés mécaniques natives. Néanmoins ces difficultés peuvent être réduites par réticulation des chaînes le composant à l'aide d'agents chimiques ou ioniques (37).

b) Cellulose :

Parmi les polysaccharides naturels, il s'agit du plus commun, le composé basique de la paroi des cellules végétales. Au même titre que le collagène, ce matériau est hautement biocompatible et hydrophile. Il possède également des propriétés d'adhésion cellulaire (31) (37, 38) et des propriétés mécaniques en tension (39). Le principal inconvénient de la cellulose est son faible taux de dégradation dû à l'absence d'enzymes spécifiques chez l'homme (31) (38) (40). Afin de réduire ce paramètre, des dérivés à chaînes courtes de la cellulose sont utilisés comme le carboxyméthylcellulose (CMC), hydroxyéthyl cellulose (HEC) (41). L'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC) est un matériau de plus en plus

utilisé en ingénierie tissulaire (42, 43). Il est considéré comme un matériau semi-synthétique et est composé d'une méthyl cellulose modifiée par des groupes propylène, éther et glycol (PEG). Dans les années 2000, le Professeur Pierre Weiss a développé un matériau auto-réticulant basé sur une HPMC sur laquelle sont greffés des groupements silanes transformant une solution de polymère en un gel (44). Il est notamment très utilisé en ingénierie du cartilage.

c) La fibronectine

La fibronectine est une protéine clé des espaces intercellulaires. Cette glycoprotéine est sécrétée par de nombreux types cellulaires. Il s'agit de 2 chaînes polypeptidiques identiques et reliées entre elles par un pont disulfure en C terminal. La fibronectine est capable de se lier au collagène, aux protéoglycanes, à l'acide hyaluronique, aux membranes plasmatiques, à l'héparine et par conséquent, aura une fonction importante dans l'organisation de la MEC et dans l'adhésion cellulaires via les intégrines présentes sur la membrane cellulaire. Non toxique, n'entraînant pas de réaction inflammatoire et biodégradable, ce matériau peut être utilisé en ITO (32).

d) Le chitosan

Il s'agit d'un dérivé naturel polysaccharidique constitué de chaînes de D-glucosamine et de N-acetyl-D-glucosamine. Ce matériau est généralement extrait de la chitine retrouvée dans la carapace des crustacés (28) (45). Grâce à ses nombreuses qualités, le chitosan est très largement utilisé en ingénierie tissulaire. La présence d'un pôle cationique lui permet de lui associer diverses molécules bioactives. Biocompatible, il possède également des propriétés antimicrobiennes (46). Le principal inconvénient de ce matériau sont ses faibles propriétés mécaniques qui peuvent être améliorées en le combinant avec d'autres matériaux (28).

e) L'alginate et l'agarose

L'alginate et l'agarose sont des polysaccharides linéaires extraits des algues rouges et brunes. Ces polysaccharides sont généralement utilisés ensemble afin d'améliorer les propriétés mécanique et adhésive. En présence de cations bivalents comme le calcium, la magnésium, le baryum ou le strontium, ces polysaccharides se transforment en gel

ionotrope (47). De plus, ce matériau est hautement biocompatible et possède une porosité adéquate à la migration cellulaire et à la perfusion des nutriments. Néanmoins, la biodégradation de l'alginate et de l'agarose est un processus lent et mal contrôlé.

f) La fibroïne

La fibroïne est une protéine fibrillaire formant la base des fil d'araignées des cocons des insectes, en particulier le ver à soie. Elle possède de nombreuses propriétés qui la rendent attractive pour l'ingénierie tissulaire et régénération du tissu osseux (48). Ces caractéristiques sont les suivantes : biocompatible, biodégradable, rigide et dureté et élasticité. La taille des pores ainsi que les propriétés mécaniques des matrices en fibroïne peuvent être contrôlées en modifiant la concentration en fibroïne et/ou la taille des porogènes. De plus, ce matériau ne nécessite aucun additif pour sa stabilisation. L'inconvénient majeur de ce matériau réside dans son faible taux de dégradation qui l'empêche de laisser la place à l'os néoformé. Ce problème est résolu par l'addition de composés chimiques (49, 50).

2. Les polymères synthétiques :

L'obstacle majeur des polymères d'origine naturelle provient de ses faibles propriétés mécaniques inhérentes. En considérant que le maintien structurel est la fonction première d'une matrice, il s'agit d'un inconvénient majeur dans la stratégie de régénération osseuse. Les polymères synthétiques sont donc une alternative aux polymères naturels. Un large panel de matrices aux propriétés physico-chimiques diverses peut être facilement obtenu (51).

Les polymères synthétiques sont généralement divisés en 2 groupes :

- Les matériaux biodégradables incluant les polylactides, les polyglycoliques et leurs copolymères poly-actoglycolides, polycaprolactone, polycyanoacrylate.
- Les matériaux non biodégradables qui sont les suivants : alcools polyvinyliques, poly-hydroxyethylmethacrylate (51).

a) Les polylactides :

Il s'agit d'un polyester aliphatique, thermoplastique et biodégradable obtenu par polycondensation d'acide lactique et de lactide (dimère de l'acide lactique) (52). Les poly-

lactides possèdent des caractéristiques qui dépendent de leurs formes isomériques. Les L et D-lactides sont hautement cristallisés et possèdent des propriétés physico-chimiques proches alors que la forme L-D est amorphe. Le L-D polylactide possèdera de faibles propriétés mécaniques et aura un taux de dégradation élevé au contraire des L-lactide et D-lactide (53). Un des principaux avantages des poly-lactides est sa biocompatibilité (51). Les inconvénients de ce matériau sont sa faible mouillabilité qui entraînera par la suite une distribution cellulaire irrégulière. De plus ses produits de dégradation sont le CO₂ et l'eau entraînant une acidification locale et une réaction inflammatoire (51) (54).

b) Les polyglycolides :

Les polyglycolides sont les polymères d'acides glycoliques possédant les chaînes linéaires les plus simples des polyesters aliphatiques. Au contraire des poly-lactides, les poly-glycolides sont hautement cristallisés. Pour la régénération tissulaire osseuse, le polylactoglycolide (co-polymère de polylactide et de polyglycolide) est généralement utilisé. Ce co-polymère est intéressant pour l'ITO car il est biocompatible avec la possibilité de moduler son taux de dégradation. Sa biodégradation en monomères d'acides glycoliques et lactiques peut néanmoins entraîner des effets indésirables dus à l'acidification du milieu (48).

De façon plus générale, l'association de différentes combinaisons de stéréo-isomères de poly-lactides, la co-polymérisation de poly-lactides et de poly-glycolides permettent la régulation du taux de dégradation (48).

c) Le polycaprolactone

Le polycaprolactone (PCL) est un polyester aliphatique semi-cristallin et biodégradable (55). Ce matériau possède d'excellentes propriétés mécaniques et de biocompatibilités et sa conception est aisée. Néanmoins sa structure hydrophobique et l'absence de groupes fonctionnels font du PCL un matériau peu favorable à la croissance cellulaire et qui limite son utilisation en ingénierie tissulaire (55, 56). Des chercheurs tentent actuellement d'améliorer les propriétés du PCL notamment en lui greffant des matériaux aux propriétés adhésives.

3. Les céramiques :

Cette catégorie inclue un groupe de matériaux inertes et semi-inertes. Les matériaux comme l'hydroxyapatite (HA), les phosphates tricalciques (TCP), les bioverres sont les plus utilisés en ingénierie tissulaire (51). Leur présence dans la phase minérale de l'os les rend hautement biocompatibles. Leur surface minérale biomimétique favoriserait l'adsorption des molécules biologiques dans le but de promouvoir les événements responsables de la biominéralisation cellulaire.

a) L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HA) est la phase minérale principale du tissu osseux (57). Ce minéral possède d'excellentes propriétés de biocompatibilité et est ostéoinducteur et ostéoconducteur (51) (58-59). Il est très faiblement résorbable et est actuellement largement utilisé en ingénierie tissulaire osseuse afin de promouvoir et d'améliorer les propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction des matrices.

b) Le phosphate tricalcique

Il s'agit d'un phosphate de calcium tertiaire. Ce phosphate est une source riche en ions calcium et phosphore pour les cellules (60). Au contraire de l'HA, le TCP est matériau hautement biodégradable (61). En dehors de cet aspect de biodégradabilité, le TCP possède des propriétés semblables à l'HA.

c) Les phosphates de calcium biphasés

En associant les propriétés de l'HA et du TCP, on obtient un bon candidat à l'ITO. Avec la partie HA on va promouvoir l'ostéoconduction et la phase en TCP qui va favoriser le recrutement et la différenciation cellulaire (62). Ce concept développé par les professeurs LeGeros et Daculsi dans les années 80 a largement été repris et a prouvé son efficacité en régénération tissulaire osseuse et en ITO (63-64).

d) Le bioverre

Composés de SiO_2 , Na_2O , CaO et P_2O_5 , les bioverres possèdent une surface active (65). Une fois implanté en site osseux, une réaction se produit à la surface du matériau

entraînant la formation d'une hydroxyapatite ou d'un phosphate de calcium amorphe favorables à l'ostéogénèse qui va lier à l'os (65). De plus ce matériau va relarguer des ions silicium, calcium, oxygène et sodium permettant d'induire l'ostéogénèse. En modifiant la concentration des différents composants, la dégradation de la matrice peut être modifiée et contrôlée (66). Leurs faibles propriétés mécaniques limitent l'utilisation des bioverres. Le problème étant résolu par optimisation de leur composition et condition de fabrication et de frittage (65).

4. La combinaison des matériaux

Il est important de noter qu'un matériau est rarement utilisé seul pour concevoir une matrice. Le plus souvent, la combinaison de plusieurs matériaux est utilisée afin d'optimiser les paramètres et ainsi obtenir les propriétés désirées. Par exemple, la stabilité de polymères possédant des propriétés mécaniques insuffisantes peut être améliorée en lui greffant des polymères plus rigides. De même, les propriétés ostéogéniques d'un matériau comme les poly-lactides peuvent être augmentées par addition d'une charge en céramique de phosphate de calcium (31).

B. Les différents facteurs impliqués (exogènes et de structure)

1. Modification des biomatériaux pour la culture des cellules souches :

Les modifications chimiques, structurelles et biologiques des matrices vont directement influencer le comportement des cellules souches à leur contact notamment en transformant leurs propriétés de surface et la porosité, les interactions de surface ou encore par adjonction de facteurs bioactifs (figure 6).

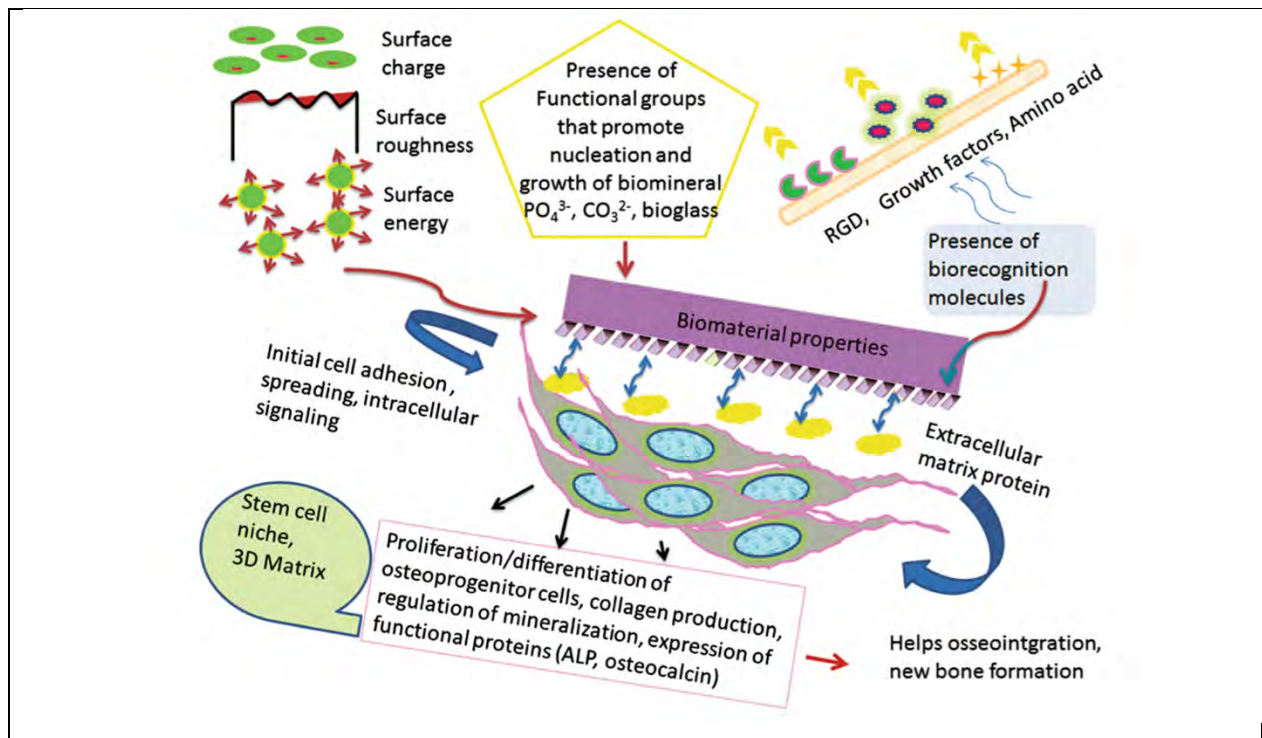


Figure 6 : : Illustration schématique des facteurs impliqués dans les interactions cellules/matériaux (propriétés de surface et bio-fonctionnalisation)

D'après (67)

La surface d'une matrice est la phase critique des premières interactions entre le biomatériau et le tissu hôte. En effet, les performances du matériau en ITO vont dépendre principalement des interactions entre les fluides biologiques et sa surface, médiées, le plus souvent, par les protéines qui y sont adsorbées (68). La macrostructure, la microstructure et les propriétés chimiques du substrat détermineront quelles molécules seront adsorbées créant une interface dynamique avec les cellules et d'autres facteurs (69). Les attachements focaux entre les cellules et leur substrat vont orienter leur aspect qui, via le cytosquelette et les voies de transduction intra cellulaires, permettra l'expression de protéines spécifiques d'un phénotype.

a) Nanostructures

Dans le tissu osseux, les cristaux d'apatite mesurent environ 25 nm par 35 nm et la triple hélice de collagène quant à elle mesure 300 nm par 0,5 nm. Afin de mimer au mieux le tissu osseux, le développement de matériaux nano structurés semble être une stratégie prometteuse en ingénierie tissulaire. En effet, les surfaces possédant des topographies structurées et contrôlées ont un haut pouvoir de captation des acides aminés et des

protéines permettant l'adhésion cellulaire. Par exemple, l'adsorption de fibronectine et de vitronectine (2 protéines connues pour stimuler l'ostéogénèse (70)) peut être significativement augmentée en diminuant la taille des grains à la surface du matériau en dessous de 100 nm. Il a également été montré que ces protéines, une fois adsorbées sur des nanophases, pouvaient se « déplier », permettant l'activation des cellules osseuses (71). En culture *in vitro*, l'adhésion, la prolifération et la différenciation ostéogénique sont améliorées par des nanomatériaux possédant des structures inférieures à 100 nm. Il a également été montré que la nano et la microporosité stimulaient la différenciation ostéogénique (72, 73).

b) Porosité

La porosité est définie par le pourcentage d'espace vide dans un volume solide donné. La porosité des matrices et la taille des pores vont augmenter la surface d'échange disponible pour l'adhésion et la croissance cellulaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ils vont également permettre la pénétration tissulaire comme les éléments vasculaires au sein de ces dernières. En développant une matrice poreuse composée d'hydroxyapatite pour la libération de BMP-2, Kuboki *et al.* (74) ont démontré que la présence des pores était cruciale pour la formation d'un tissu osseux car ils permettent la diffusion, la migration des cellules et la vascularisation au sein du construit(75). Une matrice poreuse permet également une meilleure stabilité mécanique entre le substrat et le tissu osseux néoformé, élément crucial en ITO (76). Augmenter la porosité (taille de pores, interconnexion) influence positivement la repousse osseuse. L'interconnexion entre pores inférieure à 100 micromètres réduit également la pénétration vasculaire (77-79). La microporosité permet quant à elle d'obtenir une surface contribuant à une adsorption des protéines plus importantes ainsi que des échanges ioniques et la formation d'une apatite de substitution par dissolution / précipitation).

c) Apport de molécules bioactives

Ces molécules ont la capacité de promouvoir l'angiogenèse et l'incorporation des construits générés par ITO en améliorant leur intégration et leur survie (80, 81). Les matrices peuvent incorporer des molécules bioactives comme des composés chimiques sous formes ioniques, des médicaments, des séquences peptidiques et/ou des facteurs

de croissance. Ces molécules bioactives peuvent être relarguées des matrices par libération contrôlée, diffusion ou dégradation progressive de la matrice. Elles sont alors capables d'interagir avec les cellules environnantes. Les cellules produisent ensuite à leur tour des facteurs de croissance qui vont stimuler la différenciation ostéogénique (82).

(1) Les protéines de la MEC

Les molécules bioactives peuvent être composées des protéines de la MEC ou bien de courtes séquences peptidiques. Les séquences peptidiques sont préférées aux protéines complètes car elles sont d'avantage stables. La plus utilisée est la séquence RGD (Arg, Gly-Asp) qui est dérivée de la fibronectine (83, 84).

(2) Collagène

Il s'agit du composé principal du tissu osseux et est donc naturellement le matériau idéal pour la conception de matrices 3D pour l'ITO. Il est d'ailleurs un des revêtements les plus fréquemment utilisé. Le collagène de type I possède une séquence spécifique RGD qui régule d'importants événements cellulaires via les liaisons aux intégrines et fibronectine. Cette molécule possède les avantages d'être biocompatible et bioactive car elle permet l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Cultivées sur ce substrat *in vitro*, il a été montré que des CSM exprimaient des marqueurs de la différenciation ostéogénique (minéralisation et activité de la phosphatase alcaline) en conditions normale et ostéogénique (85).

(3) Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire de la MEC cruciale pour l'adhésion et la migration cellulaire. Tout comme le collagène, elle possède par ailleurs la séquence peptidique RGD lui permettant de se lier aux intégrines présentes à la surface des cellules et ainsi promouvoir leur adhésion et l'activation de gènes spécifiques, notamment pour l'ostéogénèse.

(4) Les séquences peptidiques courtes

Par rapport aux protéines décrites ci-dessus, les séquences peptidiques vont avoir l'avantage d'être d'avantage spécifiques car directement disponibles. De plus lors elles

peuvent être produites artificiellement et sans nécessité de procédés complexes de purification.

Le peptide RGD, pour arginine-glycine-asparagine, est un des motifs de liaison ubiquitaire le plus couramment utilisé. Il est retrouvé dans de nombreuses protéines d'adhésion comme la fibronectine, la vitronectine, la laminine et le collagène de type I (86). Le cytosquelette intracellulaire est lié par les intégrines cellulaires à la MEC via la séquence RGD. Les peptides RGD améliorent l'attachement et l'étalement des ostéoblastes des matrices greffées (87) (88) (89) (90) et augmentent la prolifération cellulaire et l'expression des marqueurs ostéogéniques comme l'ALP, RunX, l'ostéocalcine, l'ostéopontine (91) (92) (93) (94) (95). Des études *in vivo* ont évaluées les effets de RGD sur la réparation osseuse. Sur des implants greffés avec des peptides RGD par exemple, on a pu noter une augmentation de la formation osseuse péri implantaire ainsi qu'un contact os/implant plus fort (96) (97).

D'autres séquences peptidiques sont également utilisées. Notamment CBM qui résulte du clivage de l'ostéopontine et qui peut se lier spécifiquement au collagène (98). Cette séquence améliore la migration et la différenciation ostéogénique via la cascade d'évènements $Ca^{2+}/CaMKII/ERK/AP-1$ (99). Dans un modèle de défaut osseux de calvaria de rat, l'injection d'un gel contenant CBM améliore l'adhésion et la différenciation ostéogénique et les marqueurs de la formation osseuse (100).

2. Les facteurs de croissance utilisés en ITO

FACTEURS DE CROISSANCE	ACTIONS
Bone morphogenetic proteins (BMP)	<i>Induction osseuse</i>
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	<i>Angiogenèse</i>
Platelet-derived growth factor (PDGF)	<i>Prolifération/recrutement cellulaire et vascularisation</i>
Fibroblast growth factor (FGF)	<i>Angiogenèse, prolifération et différenciation ostéogénique</i>
Insulin-like growth factor (IGF)	<i>Différenciation ostéogénique</i>
Transforming growth factor beta (TGF-β)	<i>Différenciation ostéogénique et chondrogénique</i>

Tableau 1 : Les facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire osseuse

D'après (101)

La majorité des facteurs de croissance retrouvés dans l'environnement osseux sont l'IGF-1, le FGF-2, le VEGF, le PDGF, le TGF- β et les BMP. Ces facteurs sont présents au sein de la MEC osseuse et sont utilisés afin de réguler le chimiotactisme, la prolifération et la différenciation des CSM. Il s'agit majoritairement de polypeptides qui vont se fixer sur des récepteurs cellulaires spécifiques par un mode autocrine (signaux issus de la même cellule) ou bien paracrine (signaux qui vont agir sur les cellules voisines). Cette liaison va initier une cascade de réactions intracellulaires souvent impliqués dans l'activation spécifique de gènes de transcription. Ces activations cellulaires entraînent des changements dans la prolifération, différenciation et maturation cellulaire ainsi que dans la production d'autres facteurs de croissance et de molécules de la MEC permettant la formation d'un tissu spécifique. Les facteurs de croissance agissent localement et sont sécrétés à faibles concentrations (tableau 1) (102).

3. Les différentes stratégies d'incorporation des molécules bioactives

Un autre paramètre important en ingénierie tissulaire concerne l'inclusion des substances bioactives au sein de la matrice qui vont être relarguées lors de la phase de résorption du matériau.

Idéalement, les substances bioactives ne devraient pas induire que la différenciation ostéogénique mais également promouvoir l'angiogenèse. Nous l'avons vu ci-dessus, ces substances incluent différents facteurs de croissance (TGF- β , incluant les BMP, IGF, FGF, PDGF, VEGF, etc.) (103). L'injection de facteurs de croissance est, la plupart du temps, inefficace et parfois même dangereuse dû à leur courte demi-vie, leur biodistribution non sélective, leur potentiel toxicité et les risques cancéreux qu'ils peuvent générer (103). L'inclusion de substances bioactives dans les construits pour l'ITO doivent alors respecter certains points essentiels :

- Libération contrôlée dans le temps et l'espace
- Concentration libérée idéale
- Maintien de l'activité biologique des molécules contenues dans la matrice

Plusieurs stratégies ont été imaginées afin de satisfaire ces points (figure 7) :

- Piège physique (A) : Les substances actives vont être incorporées au sein même du matériau et seront libérées lors de la dégradation de ce dernier.
- Encapsulation (B) : Les hydrogels peuvent être modifiés afin d'augmenter leur affinité pour lier les molécules actives.
- Adsorption de surface (C) : Les facteurs de croissance sont adsorbés directement à la surface du matériau sans modification spécifique du matériau.
- Biominéralisation (D) : La bio-minéralisation piège les substances bioactives dans les cristaux formés lors de l'incubation des matrices dans des sérum biomimétique et riche en ions Ca^{2+} . Les facteurs de croissance seront relargués lors de la dégradation des cristaux *in vivo*.
- Revêtements multicouches (E) : Les multicouches peuvent faciliter la libération de plusieurs agents de façon contrôlée dans le temps.
- Nano et microparticules (F) : Ces matériaux peuvent libérer les facteurs de croissances aux cellules et peuvent être fonctionnalisées à l'aide de molécules d'adhésion.
- Cellules génétiquement modifiées (G) : Les cellules génétiquement modifiées vont pouvoir libérer les molécules d'intérêt aux cellules proches.

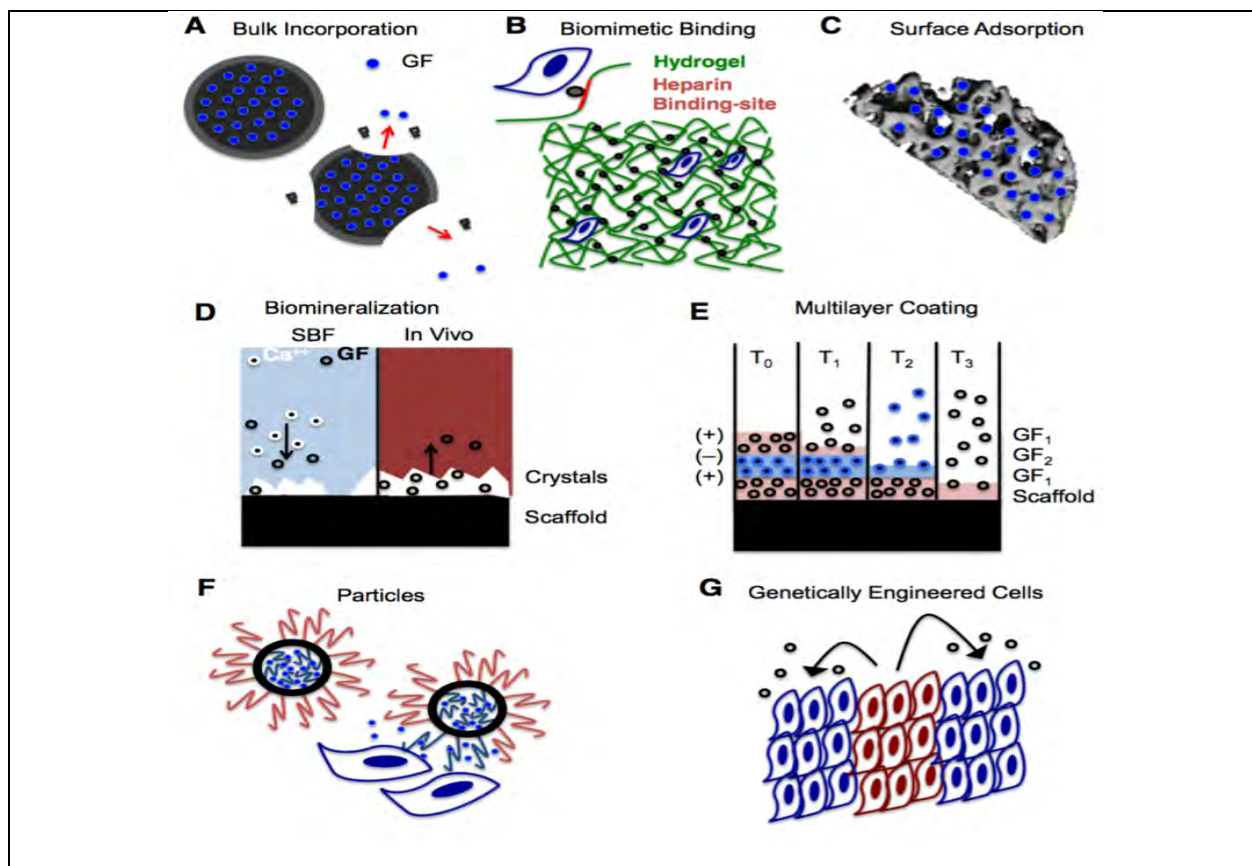


Figure 7 : Les différentes stratégies d'incorporation des facteurs de croissance

D'après (104)

4. Importance de la vascularisation

Une grande variété de matrices et d'approches incluant l'utilisation des cellules souches et des facteurs de croissance pour régénérer les défauts osseux a été proposée et testée. Mais le succès du traitement dépend également beaucoup de l'intégration du construit généré par IT au tissu dans lequel il est implanté. Deux éléments clés vont permettre cette intégration : 1) le recrutement des progéniteurs des ostéoblastes et des cellules endothéliales sur le site du défaut osseux et 2) la présence d'éléments vasculaires à proximité du défaut (105, 106).

L'angiogenèse médiée par le recrutement et la différenciation des progéniteurs des cellules endothéliales est une réponse normale sur un site traumatique et principalement due au facteur de croissance VEGF (107, 108). La néo-vascularisation est un prérequis nécessaire pour l'ostéogénèse et il a été démontré que la régénération osseuse est directement liée au taux de cellules endothéliales circulant (108). Néanmoins, la libération

de ces précurseurs des cellules endothéliales est gênée par une vascularisation souvent absente ou déficiente au niveau des défauts osseux (106). Les matrices peuvent être enrichies à la fois en facteurs de croissance et cellules progénitrices afin de promouvoir la vascularisation. Plusieurs stratégies ont été proposées comme l'intégration directe au sein de la matrice des facteurs de croissance et cytokines qui vont promouvoir la néo-vascularisation, l'incorporation à la fois de cellules capables de sécréter ces mêmes facteurs de croissances et des protéines d'adhésion permettant l'attachement des cellules endothéliales (109). L'importance de la vascularisation pour la réparation osseuse est reconnue (110, 111). Les cellules ostéoprogénitrices s'associent aux cellules endothéliales qui vont fournir l'oxygène et les nutriments mais également les facteurs nécessaires à la différenciation ostéoblastique (112). La néo-vascularisation nécessite une structure poreuse comprise de diamètres compris entre 150 et 500 μm (113).

Plusieurs approches sont proposées (figure 7) :

- 1) La prévascularisation *in vitro* : Des cellules souches et endothéliales sontensemencées sur la matrice et vont permettre la néo-vascularisation par apport de facteurs de croissance exogène contenus dans le milieu de culture. Le construit pré-vascularisé est ensuite implanté dans le défaut osseux pour s'anastomoser au capillaires environnants.
- 2) La prévascularisation ectopique *in vivo* : Les cellules souches sontensemencées sur la matrice qui est ensuite implantées en site ectopique richement vascularisé comme un muscle pour permettre une croissance vasculaire rapide dans le construit. Le construit est ensuite implanté en site orthotopique en connectant chirurgicalement les vaisseaux sanguins générés à ceux du tissu environnant.
- 3) La vascularisation orthotopique *in vivo* : La matrice estensemencée de cellules souches et endothéliales agrégées afin d'améliorer leur survie ainsi que de facteurs de croissance qui seront libérés de manière contrôlée et permettre la néo-vascularisation

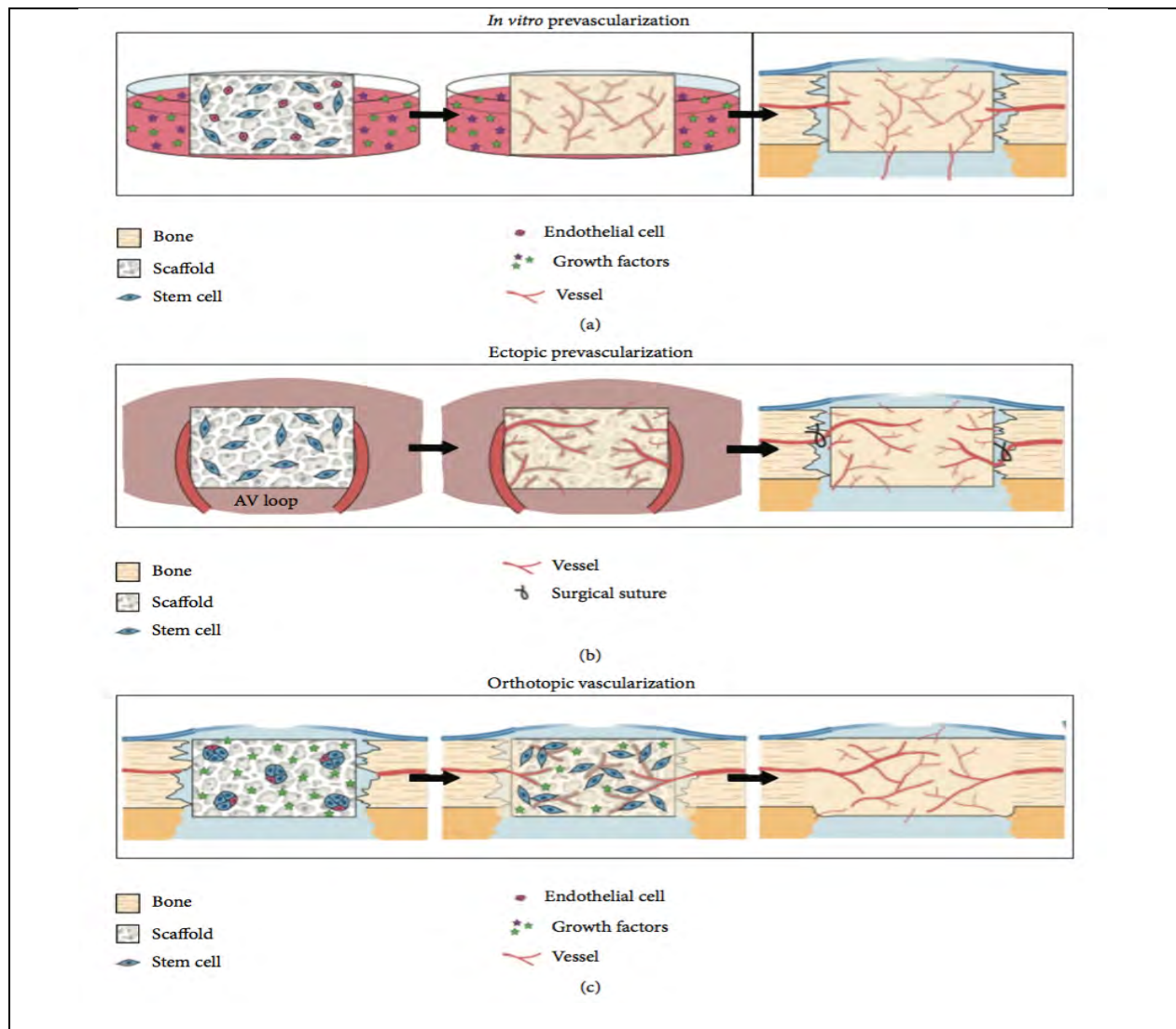


Figure 8 : Les différentes stratégies permettant de vasculariser les construits cellules/matrices en ingénierie tissulaire osseuse

D'après (114)

PARTIE III : LES CELLULES UTILISEES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

Après le développement et le choix de la matrice idéale, l'étape suivante consiste à déterminer une source cellulaire facile à isoler et à multiplier et dans l'idéal, non immunogénique et possédant un profil d'expression semblable au tissu à régénérer.

C. Les cellules

1. *Les ostéoblastes*

Le choix premier et le plus évident consiste à utiliser et isoler des ostéoblastes depuis des biopsies des patients (cellules autologues) suivi d'une phase d'expansion courte. Néanmoins, cette méthodologie est limitée. En effet, peu d'ostéoblastes sont disponibles au moment du prélèvement et leur multiplication est relativement lente, limitant ainsi le nombre de cellules disponibles à ensemercer sur la matrice. Une alternative consiste à utiliser des cellules d'un donneur non humain (cellules xenogénique) qui solutionnerait le problème de la quantité nécessaire en cellules mais pas celui de l'immunogénicité ou encore du risque de transmission de pathogènes (115, 116). C'est dans ce contexte que la biologie des cellules souches semble apparaître comme la solution la plus prometteuse.

2. *Les cellules souches*

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées ayant la capacité de se multiplier rapidement et de s'auto-renouveler. Elles possèdent également la faculté de se différencier en une multitude de types cellulaires (117). Néanmoins, ces cellules ont un potentiel de différenciation qui varie en fonction de leurs origines. Les plus primitives sont issues du zygote. Ces cellules sont totipotentes car elles sont capables de former l'embryon et le trophoblaste du placenta. Quelques jours plus tard, ces cellules commencent se spécialiser et forment le blastocyste contenant les cellules souches embryonnaires (CSE) pluripotentes. Elles peuvent se différencier en la grande majorité des cellules. Enfin, on retrouve les cellules souches multipotentes ou cellules souches adultes (CSA) qui ont la capacité de se différencier en de nombreux tissus. En théorie et

en opposition avec les CSE, ces dernières ne seront capables de se différencier qu'en un nombre limité de tissus en relation avec leur origine et du tissu où elles auront été prélevées.

3. *Les cellules souches embryonnaires (CSE)*

Ces cellules sont originaires la masse cellulaire interne de blastocystes. Elles furent isolées et cultivées la première fois il y a plus de 20 ans (118, 119). Les CSE indifférenciées sont caractérisées par deux propriétés uniques (120) : la capacité de se renouveler quasi indéfiniment et le potentiel de différenciation en différents précurseurs cellulaires. D'autres propriétés sont remarquables comme une activité élevée de la phosphatase alcaline, l'expression de d'antigènes spécifiques de l'état embryonnaire comme SSEA-1 ou l'expression du facteur de transcription Oct-4. On note également une activité importante des télomérases et la régulation de l'auto renouvellement par les cytokines de la famille de l'IL-6. Plusieurs auteurs ont décrit le potentiel de différenciation de ces CSE en cardiomyocytes, cellules hématopoïétiques (121), cellules endothéliales, neurones (122), adipocytes (123) (124), hépatocytes (125). En particulier pour l'ITO, Buttery *et al* (126) ont étudié la différenciation de CSE en ostéoblastes en présence de dexaméthasone. En dépit de l'énorme potentiel biomédical et des applications en ingénierie tissulaire deux problèmes doivent être résolus (120) : 1) s'assurer de l'absence de potentiel tumoral dû à leur capacité de prolifération illimitée, 2) vérifier la compatibilité immunologique entre les cellules du donneur et celles du receveur. Les problématiques éthiques sociales sur l'utilisation des CSE seront cependant les barrières les plus difficiles à franchir.

4. *Les cellules souches adultes (CSA)*

Ces cellules résident au sein des tissus entièrement différenciés ou bien les tissus adultes. Elles participent activement à l'homéostasie et donc à la régénération des tissus d'origine mésenchymateuse de l'organisme. On les retrouve dans la moelle osseuse (127), le périoste (128-129), les muscles (130), la graisse (131), le tissu cérébral (132) (133), le sang du cordon ombilical, le fluide amniotique et la peau (134). Initialement, on pensait ces cellules seulement capables de se différencier en cellules spécialisées du

tissu d'origine mais leurs degrés de différenciation sont en réalité bien plus importants (135). Dans le champ d'application de l'ingénierie tissulaire, les cellules souches issues de la moelle osseuse (MO) et plus connues sous le nom de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont celles qui ont montré le plus d'intérêt. La première fois que l'idée que la MO contenait des précurseurs ostéogéniques a débuté en 1963 lorsque Petrakova *et al* (136) a observé la possibilité d'obtenir un tissu osseux en implantant de la MO sous la capsule rénale. Après cette étude, Friedenstein (137, 138) a mis en évidence, dans une série d'études *in vivo*, la possibilité de l'existence d'ostéoprogéniteurs au sein de la MO. Afin de mieux comprendre la nature et l'origine de ces cellules, il développa une méthode basée sur l'isolement de cellules de MO ayant l'aspect de fibroblastes ainsi que la capacité à adhérer au plastique des boîtes de culture cellulaire (139). Il inventa plus tard, le terme CFU-F pour « colony-forming units fibroblastic » (colonies formant des unités fibroblastiques) pour décrire ces cellules. Environ 20 ans plus tard, Caplan (140) donna à ces mêmes cellules le nom qu'elles ont encore aujourd'hui, à savoir les cellules souches mésenchymateuses (CSM). En 1994, Caplan a décrit que ces CSM pouvaient se différencier en cellules issues du mésenchyme en conditions de culture adéquates et former ensuite du tissu osseux, du cartilage, du tissu adipeux, des muscles, des tendons, de la peau et d'autres tissus originaires du mésenchyme. Un des problèmes initiaux observés concernait l'importante hétérogénéité des cultures de MO. En 1992, Haynesworth *et al* (141) décrit une méthode qui permet de surmonter en partie ces difficultés. Cette méthodologie est basée sur la séparation des CSM par centrifugation sur un gradient de concentration après quoi les cellules sontensemencées sur le plastique de culture. Dans ces conditions, les cellules présentaient les mêmes morphologies fibroblastiques ainsi que les mêmes caractéristiques que les cellules décrites par Friedenstein (141). En plus de ce potentiel de différenciation, les CSM présentent d'autres propriétés importantes. Bruder *et al* (142) a montré qu'elles possédaient la capacité de se multiplier intensément *in vitro*. Pittinger *et al* (127) a également indiqué que les CSM ne se différenciaient pas spontanément en dépit d'un nombre important de passages. De plus, ces cellules possèderaient des propriétés immunosuppressives et qui les rendraient utilisables pour réaliser des transplantations allogéniques ou xénogéniques (143).

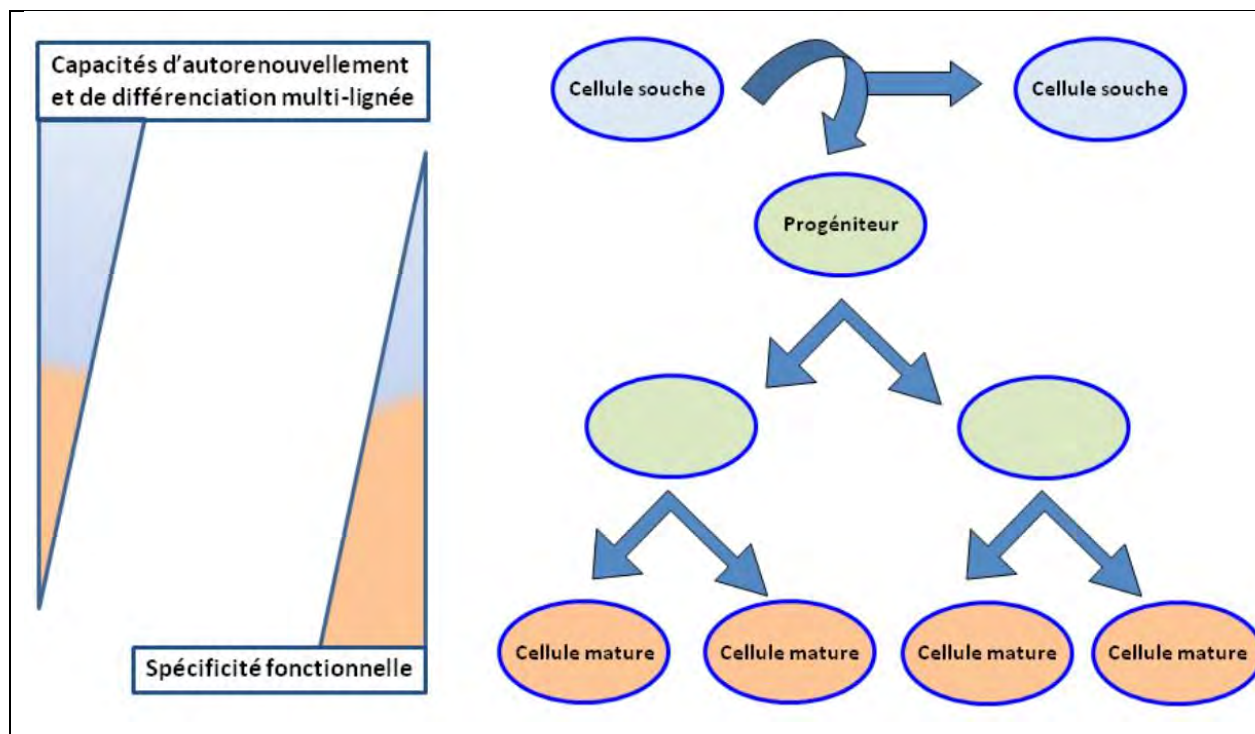


Figure 9 : Les potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire

D'après <http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique15/site/html/2.html>

Les CSM dérivées de la MO (CSM-MO) sont la principale source cellulaire pour l'ITO (144). L'isolement des CSM à partir de MO nécessite cependant une procédure chirurgicale invasive. La MO peut être obtenue à partir de la crête iliaque, le tibia ou le fémur. En général, on retrouve une concentration en CSM de 100 cellules/mL de MO. La découverte de la présence de CSM dans le tissu adipeux a démontré un intérêt croissant. En effet, le prélèvement est aisé et le tissu graisseux est abondant. Les CSM dérivées du tissu adipeux (CSM-TA) ont été identifiées la première fois en 2001 par Zuk *et al* (131). Un des avantages majeurs des CSM-TA consiste en leur relative abondance ainsi que leur prolifération plus rapide que pour les CSM-MO qui leur permet une expansion accrue afin d'obtenir suffisamment de cellules pour une utilisation clinique (145) (146). Les CSM-TA possèdent un potentiel ostéogénique similaire aux CSM-MO avec l'avantage de l'abondance. Des études comparant les CSM-MO et les CSM-TA ont démontré que les CSM-TA ont l'avantage lorsqu'il s'agit des capacités de prolifération, de la sécrétion de certaines protéines (basic fibroblast growth factor b-FGF, interferon- γ et insulin-like growth factor-1 IGF-1) et des effets immuno-modulateurs. Mais les CSM-MO ont l'avantage en potentiel ostéogénique et chondrocytaire et la sécrétion des protéines stem

cell-derived factor-1 SDF-1 et hepatocyte growth factor HGF (147). Ces caractéristiques biologiques doivent être systématiquement prises en considération en fonction de l'indication clinique. Néanmoins, l'utilisation des CSM issues du tissu adipeux associées aux matrices pour l'ITO s'annonce prometteuse comme alternative pour le remplacement ou la restauration du tissu osseux (tableau 2).

Les CSM peuvent également dériver du sang de cordon ombilical de nouveau né. Ces cellules sont similaires aux CSM retrouvées dans la MO et possèdent un potentiel ostéogénique dans des conditions optimum (148). Plusieurs études ont travaillé sur l'utilisation de ces cellules sur différentes matrices en ITO (149).

D'autres cellules souches ont également été isolées des tissus dentaires incluant la pulpe (DPSC), les dents temporaires (SHED), les papilles apicales (SCAP), le ligament parodontal (PDLSC) et les follicules dentaires (DFPC) (150) (151). Les DPSC sont désormais plus faciles à isoler par digestion enzymatique de la pulpe et plusieurs études ont été menées en ITO (152) (153).

Source cellulaire	Avantages	Inconvénients
<i>Cellules souches dérivées de la moelle osseuse</i>	- Haut potentiel ostéogénique - Largement étudiées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse	- Peu abondantes et nécessitant une phase d'expansion d'importante
<i>Cellules souches dérivées de du tissu adipeux</i>	- Caractéristiques ostéogéniques se rapprochant des cellules souches issues de la moelle osseuse - Disponibilité et prélèvement aisé	- D'avantage d'études sont nécessaire pour connaître leur efficacité en ingénierie tissulaire osseuse
<i>Cellules souches embryonnaires</i>	- Pluripotentes - Capacité de se différencier en n'importe quelle cellule du tissu osseux	- Problèmes éthiques - Dégénérescences cancéreuses observées

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de certaines sources de cellules souches utilisées en ingénierie tissulaire osseuse

D'après (154)

D. Différenciation ostéogénique des CSM

1. Critères définissant les CSM selon la société internationale pour la thérapie cellulaire ISCT :

Les perspectives et le potentiel thérapeutique de ces cellules ont généré de nombreux travaux depuis plusieurs décennies. Cela a néanmoins entraîné un manque

d'homogénéisation dans les méthodes d'isolement, des conditions de culture cellulaire et l'identification des cellules souches. La société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT) a donc créé et imposé des critères minimaux qui définissent les CSM d'origine humaine. Basé sur ces critères, les CSM sont identifiées par adhérence au plastique en culture cellulaire, leur expression positif à certains marqueurs de surfaces incluant CD90, CD73, CD105 et négatif à d'autres comme CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 et les protéines de surface HLA. Elles doivent également pouvoir se différencier en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes en conditions *in vitro* (155-157) (tableau 3).

Culture cellulaire	Adhérence au plastique de culture
Potentiel de différenciation	Ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes
≥ 95 % de la population cellulaire exprimant les marqueurs de surface suivants	CD90, CD73, CD105
≤ 2 % de la population cellulaire n'exprimant aucun des marqueurs de surface suivants	CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR

Tableau 3 : Critères minimaux définissant les cellules souches mésenchymateuses humaines

D'après <http://www.celltherapysociety.org>

2. Les marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéogénique

L'ostéogénèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui, après arrêt de la multiplication cellulaire, se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Plusieurs marqueurs sont exprimés de façon séquentielle au cours de la différenciation ostéoblastique :

- **Phase précoce** : les cellules expriment des marqueurs de type facteur de transcription comme RunX2, soit des marqueurs fonctionnels. La phase de prolifération est associée à l'expression de gènes précoces (c-fos, histone H4).
- **Phase de maturation** : cette phase est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques et associés à la production de matrice (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine, transforming growth factor β [TGF- β], fibronectine).

- **Les ostéoblastes différenciés** : ils expriment des marqueurs tardifs de la différenciation (ostéocalcine, sialoprotéine osseuse) au début de la minéralisation de la matrice (figure 11).

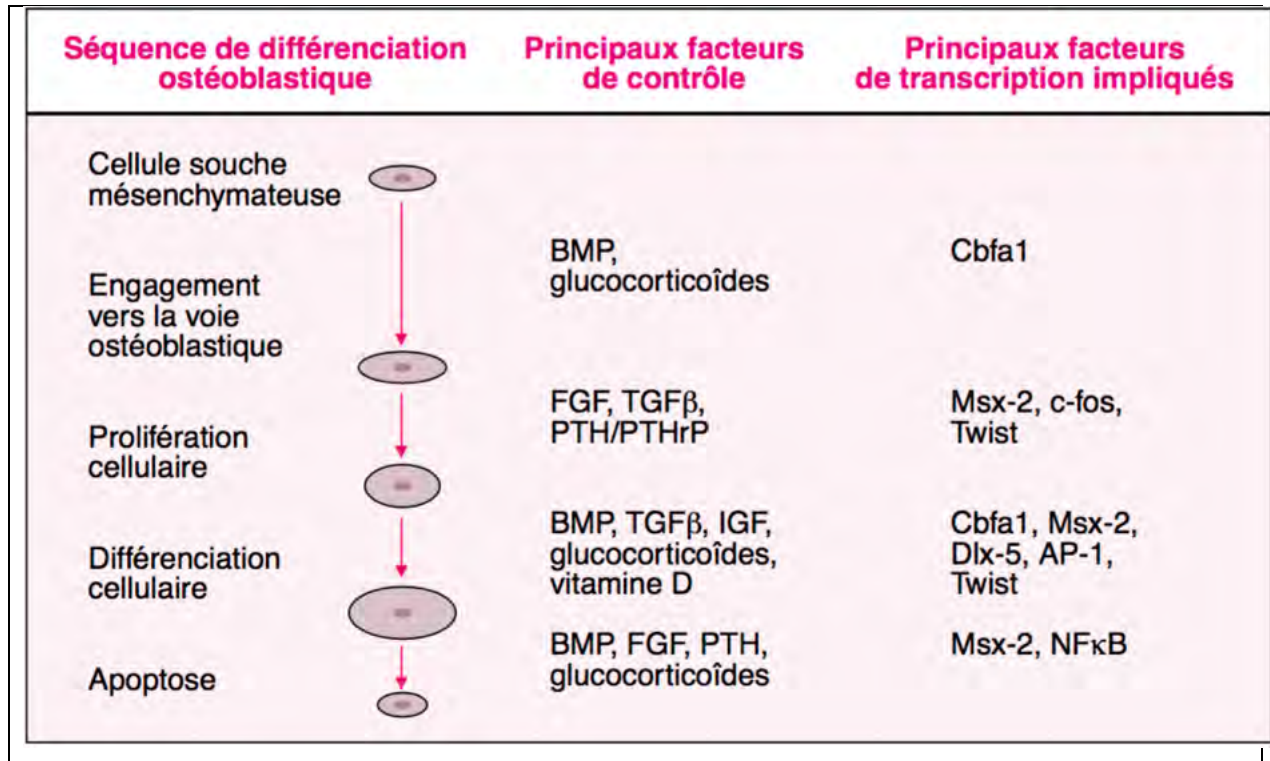


Figure 10 : Facteurs de contrôle et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses

D'après (158)

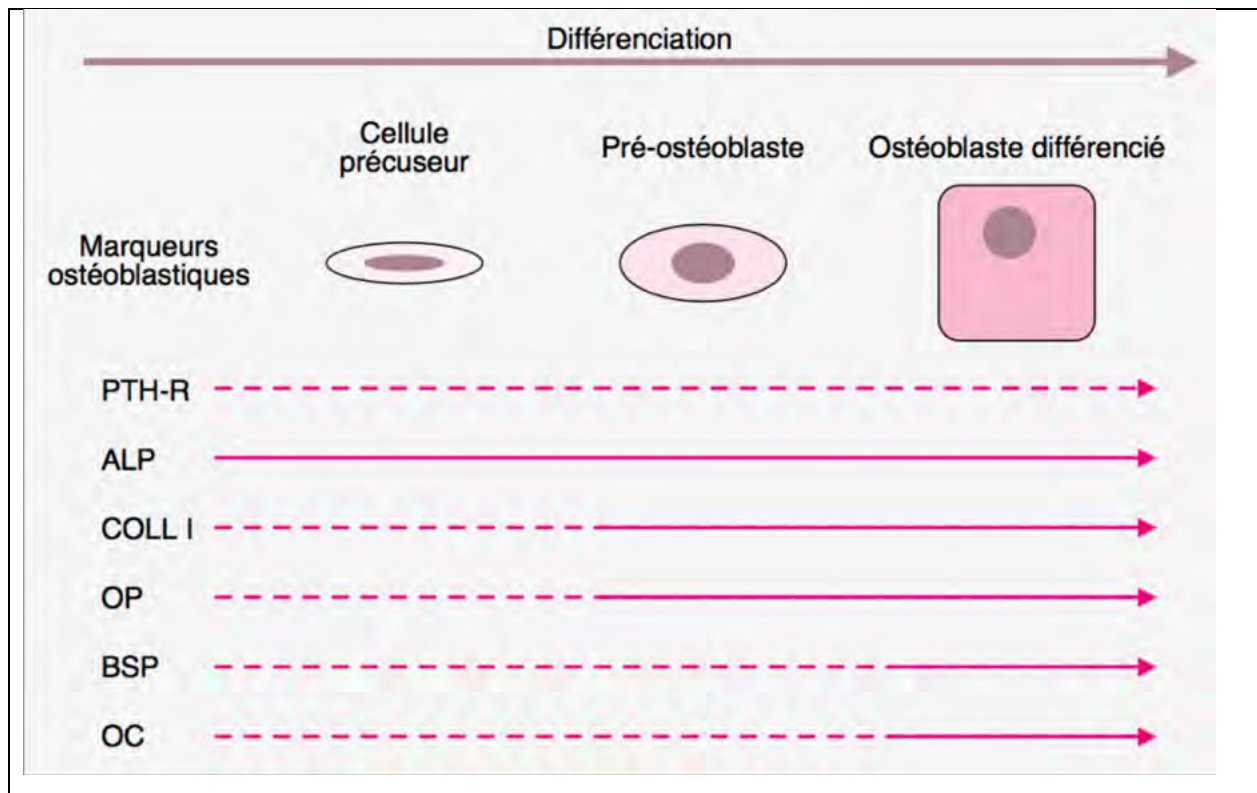


Figure 11 : Les différents marqueurs retrouvés dans la phase de maturation de différenciation ostéogénique

D'après (158)

3. Evaluation de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses cultivées *in vitro*

De manière générale et afin d'évaluer le potentiel ostéogénique des CSM, ces dernières sont cultivées dans un milieu ostéogénique. La différenciation ostéogénique peut être mise en évidence lors des phases précoces et de maturation. Dans un premier temps les cellules vont exprimer des gènes précoces comme le facteur de transcription Runx-2 dont l'expression peut être mesurée. Les cellules vont produire une matrice minéralisée par de l'hydroxyapatite mise en évidence par une coloration au rouge alizarine S et/ou coloration au Von Kossa. Le phénotype ostéoblastique est également analysé en suivant l'expression de certains gènes marqueurs comme l'ostéopontine (OP) ou l'ostéocalcine (OC). L'expression croissante en collagène de type I et l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline peuvent également suivies.

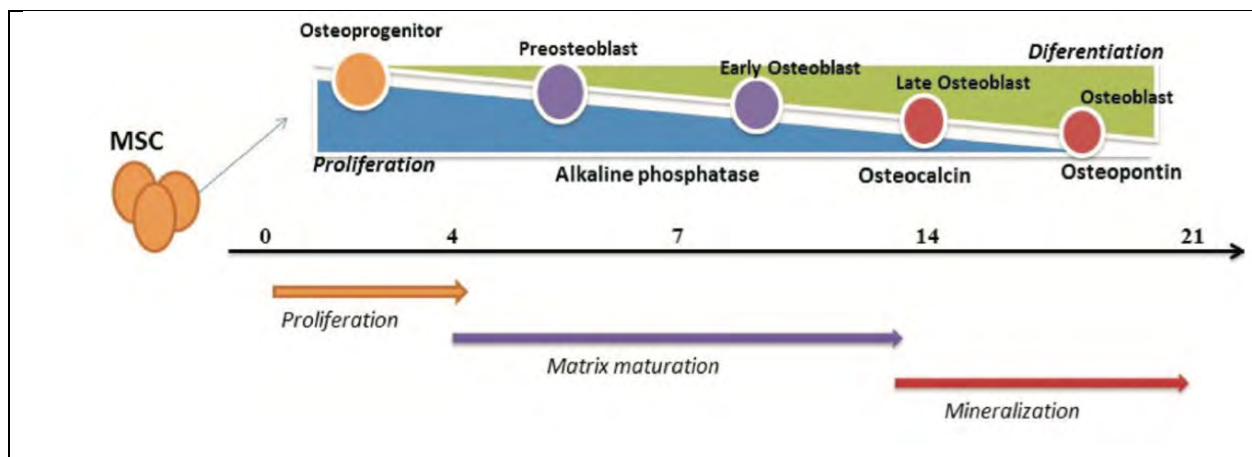


Figure 12 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses à travers 3 étapes pendant 21 jours

D'après (159)

4. Facteurs chimiques de différenciation ostéogénique *in vitro* des CSM :

La technique standard permettant d'initier la différenciation ostéogénique des CSM en culture cellulaire consiste à ajouter des composés qui vont induire cet engagement. La culture des CSM dans des milieux de culture dits ostéogéniques entraîne l'apparition de marqueurs ostéoblastiques. Les substances le plus fréquemment utilisés et qui ont prouvé leur efficacité sur la différenciation ostéoblastiques des CSM sont, le dexaméthasone (Dex), l'acide ascorbique (Asc) et le β -glycérophosphate (β -Gly), dont le mélange est communément appelé DAG. Elles sont couramment utilisées aux concentrations suivantes : Dex 100 nM (160), Asc 0,2 mM et β -Gly 10 mM. Afin d'obtenir une différenciation ostéogénique optimale, au moins 21 jours de traitement semblent nécessaires (161). Les cellules sontensemencées à une densité de $3,1 \times 10^3$ cellules/cm² jusqu'à 70-80% de confluence. A subconfluence, le milieu ostéogénique est ajouté pendant 2,5 à 3 semaines en changeant le milieu 2 fois par semaine (162). La différenciation ostéogénique des CSM *in vitro* est divisée en 3 étapes :

- J1-J4 : phase de prolifération cellulaire,
- J5-J14 : phase de différenciation précoce avec l'expression du collagène de type 1 et de la phosphatase alcaline,
- J14-J28 : phase de différenciation tardive avec l'expression de l'ostéocalcine, l'ostéopontine et le dépôt de calcium et de phosphate (163, 164).

a) Le dexaméthasone

Il s'agit d'un glucocorticoïde de synthèse et puissant anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Sa concentration optimale pour initier la différenciation ostéoblastique semble être 100 nM même si d'autres études avancent la concentration de 10 nM qui correspond à la concentration physiologique des glucocorticoïdes circulants. Cette concentration permet la formation de nodules minéralisés. La dexaméthasone induit la différenciation ostéoblastique en activant la transcription de la protéine FHL-2 permettant à son tour l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dont dépend l'expression de RunX2. L'up-régulation de RunX2 entraîne la surexpression de collagène de type 1 (161) (figure 13).

b) L'acide ascorbique

Il facilite la différenciation ostéogénique en augmentant la sécrétion de collagène de type 1. En effet cette molécule est un co-facteur indispensable aux enzymes responsables de l'hydroxylation de la proline et lysine présentes dans le pro-collagène (165). En l'absence d'acide ascorbique, les chaînes de collagène n'ont plus la capacité de former une structure hélicoïdale (166). Jaiswal *et al* ont déterminé que le meilleur résultat pour la différenciation ostéogénique de CSM humaine était atteint avec des concentrations de 50 μ g, même si les concentrations retrouvées vont de 50 à 500 μ g (164).

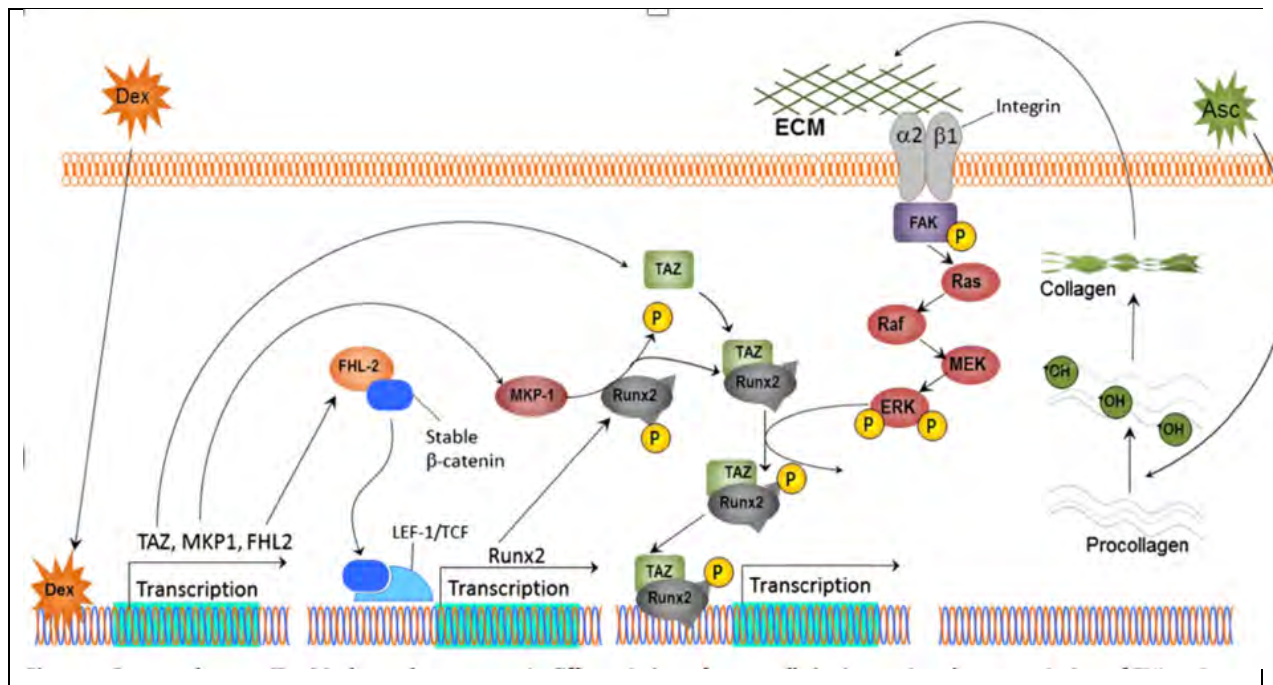


Figure 13 : Mode d'action de la dexaméthasone et de l'acide ascorbique lors de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses

D'après (167)

c) Le β -glycérophosphate

Il s'agit d'un sel qui fournit des groupements phosphates pour la minéralisation de la MEC par production d'hydroxyapatite. Il joue un rôle important dans la différenciation ostéogénique des CSM. Il faut néanmoins être vigilant car il peut générer des faux positifs en produisant des minéralisations non apatitiques détectables par alizarin red S ou Von Kossa (168). De nouvelles études ont montré que le phosphate inorganique agissait également comme une molécule de régulation de l'expression de plusieurs gènes comme l'ostéopontine et la BMP-2 (169, 170). Afin de permettre une différenciation ostéogénique, cet élément est utilisé à des concentrations allant de 5 à 10 mM.

d) La vitamine D3

Des études suggèrent que l'ajout de la forme active de la vitamine (1,25(OH)₂ D3 est un facteur d'induction de l'ostéogénèse (171). Il inhibe la transcription de la chaîne α 1 du collagène de type 1 et stimule l'expression de gènes ostéoblastiques tels que l'ostéopontine et l'ostéocalcine. Des cellules pluripotentes ont été induites en ostéoblastes par l'adjonction de cette molécule.

5. Facteurs de croissance et différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses :

a) Superfamille TGF- β

Les membres de cette superfamille sont les BMP (bone morphogenic proteins) et les TGF- β qui sont impliqués à différents niveaux dans la réparation osseuse (ossification intramembranaire et endochondrale) (172).

b) Le transforming growth factor-beta (TGF- β)

Il s'agit d'un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogénèse. Il existe 5 isoformes du TGF- β . Les formes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 semblent être d'avantage impliqués dans la cicatrisation osseuse et la prolifération des CSM (173). Le TGF- β 3 aurait les effets les plus prononcés sur la prolifération des CSM et des chondrocytes (174). Le TGF- β est produit sous forme latente par les ostéoblastes puis stocké dans la MEC osseuse lié à une protéine la LTBP. L'ensemble est libéré lors de la résorption osseuse. *In vivo* chez le rat, le TGF- β 2 augmente fortement la formation osseuse en stimulant les fonctions des ostéoblastes. Il active les pré-ostéoblastes en favorisant leur prolifération et leur différenciation en ostéoblastes fonctionnels et matures. Le TGF- β inhibe la formation des ostéoclastes ainsi que la résorption osseuse, favorisant ainsi la formation osseuse (175). *In vitro*, il augmente la synthèse des molécules de la MEC comme le collagène de type 1 ou l'ostéopontine (176) et influence l'activité des BMP (177). Le TGF- β 1 est retrouvé à concentration élevée sur les sites de réparation osseuse (178).

c) Les bone morphogenic proteins (BMP)

Il s'agit de glycoprotéines régulatrices, membres de la superfamille des TGF- β . Les premières BMP ont été identifiées par Urist en 1965 qui a observé le potentiel ostéoinducteur de l'os déminéralisé (demineralised bone matrix DBM) implanté en site ectopique chez des rongeurs et contenant des substances qu'il nommera BMP plus tard en 1971 (179). Plus de trente BMP ont été identifiées depuis. Elles sont responsables de l'activation de la cascade d'évènements via la sérine/thréonine kinase qui induit et

impliquée dans la formation osseuse et cartilagineuse, notamment en augmentant l'expression Cbfa1/RunX2 dans les précurseurs ostéoblastiques et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques (phosphatase alcaline, collagène de type 1, ostéocalcine). Lors d'une fracture osseuse, les BMP sont sécrétées par les CSM, ostéoblastes et chondrocytes afin activer les événements intracellulaires qui permettront la croissance, la migration et la différenciation des CSM en stimulant l'angiogenèse, la synthèse des composants de la MEC et en jouant un rôle dans l'homéostasie tissulaire (180). Les différentes BMP vont agir séquentiellement pendant le processus de cicatrisation. Par exemple, l'expression de la BMP-2 est maximale 24 heures après la fracture, suggérant un rôle dans l'initiation de la réparation. D'autres études *in vitro* ont démontré que la BMP-2 contrôlait l'expression de plusieurs autres BMP et que lorsque son activité était bloquée, les CSM issues de la moelle osseuse ne pouvaient plus se différencier en ostéoblastes (181). Les BMP-3, BMP-4, BMP-7 et BMP-8 sont quant à elles exprimées lors de la cicatrisation osseuse à J14 et J21, lorsque la phase de recrutement ostéoblastique est la plus active et que la formation osseuse est en cours. Les BMP-5 et BMP-6 exprimées de J3 à J21 vont réguler l'ossification intra-membranaire et endochondrale. Les BMP-2 à BMP-8 ont un potentiel ostéogénique important, toutefois, les BMP-2, BMP-6 et les BMP-9 vont être les plus puissants inducteurs de la différenciation ostéogénique des CSM (182). Les autres BMP vont quant à eux jouer un rôle dans la maturation des ostéoblastes. La BMP-3 semble inhiber la différenciation des cellules ostéoprogénitrices induite par la BMP-2.

La BMP-2 recombinante humaine est la première BMP produite par génie génétique. Dans plusieurs des études animales, la BMP-2 a montré qu'elle permettait d'induire une formation osseuse ectopique et qu'elle améliorait la maturation et la consolidation de l'os néoformé. Les BMP-2 et BMP-7 recombinants humains sont les premiers facteurs de croissance autorisés pour traiter des patients atteints de pathologies osseuses (182)

d) Les protéines wnt

Il s'agit d'une famille de protéines glycosylées riches en cystéine. Dans les tissus matures, les wnt jouent un rôle dans la régulation de l'ostéogénèse ainsi que dans le renouvellement cellulaire des CSM. Elles sont impliquées dans la formation osseuse, la

migration et l'adhésion cellulaire (183). L'augmentation de l'expression de wnt ou bien l'inhibition des antagonistes de wnt sont associées à l'augmentation de la formation osseuse chez l'homme et la souris (184).

e) Insulin growth factor (IGF)

Il s'agit d'une hormone peptidique ayant une structure chimique proche de la proinsuline. Il en existe 2 formes : IGF-1 et IGF-2. Plusieurs études ont montré que les IGF-1 et IGF-2 sont sécrétés par les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales et la MEC osseuse. On les retrouve dans la phase de recrutement des CSM et des cellules osseuses grâce à la présence de 6 protéines de liaison (IGFBP) qui modulent leur action via la cascade tyrosine/kinase (185). L'IGF-2 est le plus abondant des facteurs de croissance dans la matrice osseuse. Il intervient dans la formation osseuse endochondrale, induit la production de collagène de type I et la prolifération cellulaire. L'expression des messagers des IGF-1 et IGF-2 module lors de la culture *in vitro* de CSM (186). Prisell *et al.* (187) ont montré que l'expression de IGF-1 était augmentée lors du recrutement et la prolifération des CSM. L'IGF-2 apparaît plus tardivement lors de la formation osseuse endochondrale réalisée par les ostéoblastes et les chondrocytes. La production d'IGF n'est pas uniquement soumise à la growth hormon (GH) mais est également régulée par les oestrogènes, la PTH, le cortisol (inhibe la synthèse d'IGF-1) les facteurs de croissances locaux et les cytokines (188).

f) Fibroblast growth factor (FGF)

Le FGF est une glycoprotéine impliqué dans la cicatrisation des tissus. Il est un régulateur important de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes. Il stimule l'angiogenèse et agit sur la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Plusieurs récepteurs au FGF sont exprimés dans différents tissus, l'os inclus. Neuf isoformes du FGF ont été identifiées. Les plus répandus sont le FGF-1 et le FGF-2 (173). Ils sont d'importants régulateurs de la cicatrisation osseuse exprimés par les CSM, les chondrocytes matures et les ostéoblastes. Ils stimulent l'expression du TGF- β par les ostéoblastes (189) et jouent également un rôle dans la balance entre résorption et formation osseuse. Plus spécifiquement, le FGF-2 maintient la prolifération des CSM.

g) Platelet derived growth factor (PDGF)

Il s'agit de puissants mitogènes des CSM au nombre de 4 : PDGF-A et PDGF-C étant exprimés à haute dose et PDGF-B et PDGF-D à des niveaux plus faibles. Il existe 2 récepteurs via lesquels les PDGF se fixent, le PDGFR- α et le PDGFR- β (190). La forme homodimérique du PDGF-B induirait à la fois la prolifération et la migration des CSM. Le récepteur PDGFR- α induit l'ostéogénèse et le PDGFR- β l'inhibe. Ces molécules agissent localement sur les cellules voisines en stimulant la prolifération des CSM et des ostéoblastes présents dans la greffe. Elles initient également l'angiogenèse en induisant la mitose des cellules endothéliales (177).

h) Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Le VEGF est une protéine qui va activer l'angiogenèse par recrutement des cellules endothéliales. Il intervient lors de la cicatrisation osseuse endochondrale ou intramembranaire en stimulant la formation d'un réseau vasculaire essentiel à l'initiation de l'ostéogénèse (191) (192). L'inhibition du VEGF lors de l'ossification endochondrale et intramembranaire a montré *in vivo* qu'elle entraînait une diminution de l'angiogenèse ainsi que de la minéralisation du cal osseux. A l'inverse, l'apport de VEGF exogène accélère la cicatrisation osseuse.

i) Platelet rich plasma (PRP)

Il s'agit d'un cocktail de plusieurs facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , VEGF) et de cytokines obtenu à partir de sang centrifugé pour ne récupérer qu'un plasma sanguin riche en plaquettes qui vont produire ces facteurs de croissance et participer à la cicatrisation osseuse. L'utilisation de PRP pour la régénération des défauts osseux est maintenant bien connu et plusieurs auteurs ont évoqué l'utilisation de ce produit associé au CSM.

6. Facteurs physiques de différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses :

En condition *in vivo*, les CSM ne sont pas isolées mais interagissent directement avec les composants et le micro environnement de la MEC. Des propriétés physiques comme la forme des cellules, les contraintes mécaniques externes, la MEC et les structures géométriques sont autant d'éléments qui vont participer à déterminer le phénotype vers lequel les CSM vont évoluer. Par exemple, les matrices rigides vont promouvoir un phénotype ostéoblastique et d'autres avec des propriétés proches du tissu nerveux, par exemple, vont plus facilement se diriger vers un phénotype neurogénique (193). Les intégrines, récepteurs transmembranaires médiant les interactions cellules/cellules et cellules/matrice, sont des capteurs des contraintes mécaniques exercées sur les cellules et qui vont transmettre l'information via le cytosquelette (194). Des études ont montré que l'application de contraintes mécaniques pouvait faciliter la différenciation ostéogénique (195).

Une structure géométrique à l'échelle nanométrique du substrat va également avoir un effet sur l'orientation ostéogénique des CSM et ce même en l'absence d'inducteurs de la différenciation (196). Récemment, McBeath et Chen ont développé une technique permettant de contrôler les motifs de surface de substrats et de contrôler la forme des CSM. Ils ont montré que les CSM qui « s'épilaient » tendaient à se différencier en ostéoblastes et que les cellules de forme ronde s'orientaient davantage vers un phénotype adipocyte via la voie des RhoA-ROCK qui est activée par la tension transmise par l'actine et la myosine.

La densité d'ensemencement des cellules va déterminer leur morphologie et leur déploiement (197) qui peut expliquer la nécessité de différentes densités que l'on veuille orienter les CSM en ostéoblastes ou bien en adipocytes. Par exemple pour générer une différenciation ostéoblastiques, les CSM vont être cultivées à une densité de $3,1 \times 10^3$ cellules/cm² alors qu'une densité plus faible de $2,1 \times 10^4$ cellules/cm² sera utilisée pour une différenciation en adipocytes (162). De même la différenciation chondrogénique nécessitera une densité initiale de $2,5 \times 10^5$ cellules/cm².

En plus des contacts physiques entre cellules et matériaux, le potentiel de membrane joue également un rôle important dans le contrôle de la différenciation des CSM. En effet,

la dépolarisation supprime la différenciation ostéogénique et adipogénique des CSM et une hyperpolarisation membranaire va promouvoir le phénotype ostéoblastique.

Enfin, une tension mécanique uniaxiale ou une contrainte mécanique induite par les fluides biologiques et entraînant des forces de cisaillement (shear-stress), permet d'augmenter significativement l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que l'expression des gènes ostéogéniques des CSM (198, 199).

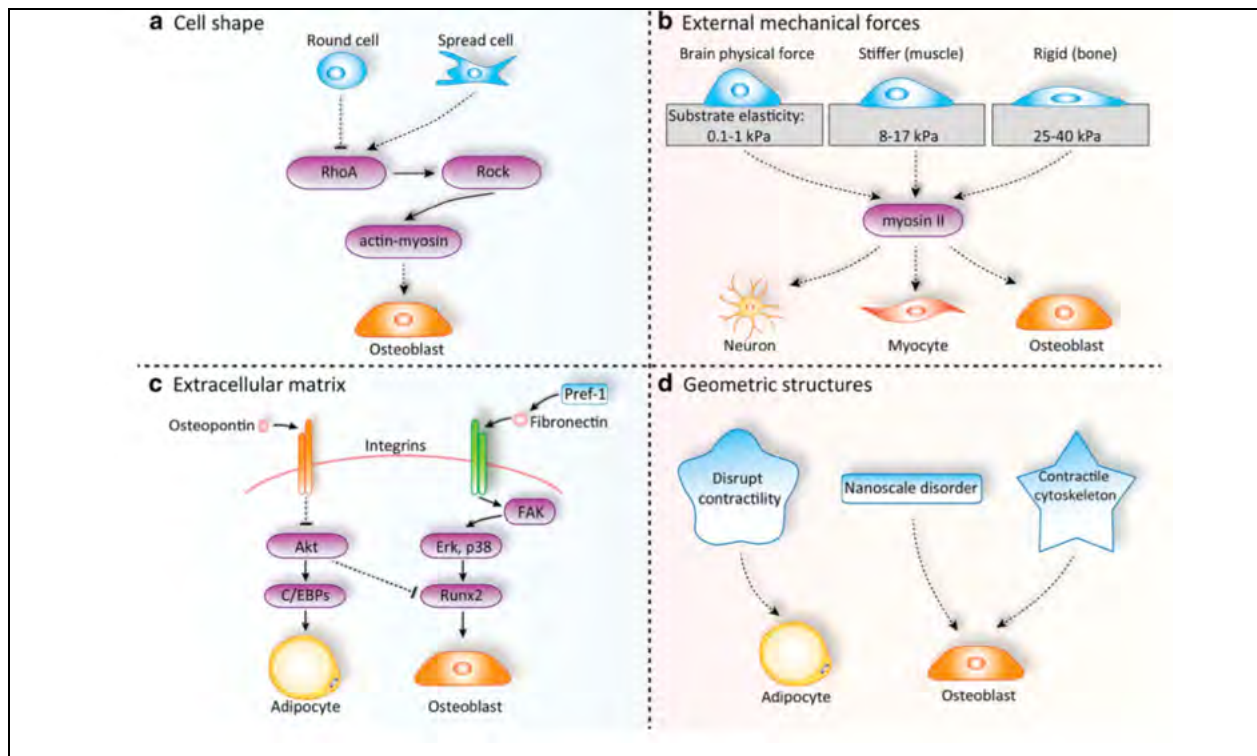


Figure 14 : Les facteurs physiques régulant la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (a : forme cellulaire, b : contraintes mécaniques externes, c : matrice extracellulaire, d : Structures géométriques)

D'après (167)

7. Les bioréacteurs

Les construits pour l'ITO sont obtenus par ensemencement de cellules à potentiel ostéogénique sur des matrices possédant des propriétés diverses (chimique, physique...). Ces derniers sont directement implantés *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel ostéoinducteur ou bien cultivé *in vitro* pour développer un nouveau tissu s'apparentant au tissu osseux avant d'être greffé. La culture statique des CSM sur des matrices poreuses en présence d'un milieu ostéogénique est la méthode la plus simple pour produire ces construits avant de les implanter. Néanmoins, dans ces conditions, les cellules ne sont pas réparties également générant de conditions moins favorables à la différenciation

ostéogénique (200). De plus, les cellules ne peuvent être influencées par les contraintes mécaniques induites par les flux biologiques indispensables à la différenciation ostéogénique tout comme l'apport et de nutriments et l'évacuation des déchets métaboliques. Des systèmes dynamiques, les bioréacteurs, ont donc été développés. Le bioréacteur idéal contrôlerait 5 points essentielles (201) :

- Assurer une croissance cellulaire rapide et contrôlée,
- Permettre une distribution cellulaire uniforme sur la matrice,
- Fournir et maintenir les éléments nécessaires aux cellules (nutriments, oxygène, facteurs de croissance),
- Exposer les cellules à des stimuli physiques,
- Permettre un suivi et une reproductibilité.

Plusieurs formes de stimuli biomécaniques peuvent être appliquées dans ces systèmes : vibrations, tensions et forces de cisaillement (202).

Les bioréacteurs utilisés en ITO permettent donc de contrôler le microenvironnement cellulaire en l'absence de vascularisation (température, pH, concentration en oxygène, apport de nutriments et des métabolites) et d'activer certaines voies de signalisation indispensables au développement des tissus osseux comme la stimulation mécanique (forces de cisaillement par exemple). Différents types de bioréacteurs ont été développés (203, 204), comme les flasques montées sur un support rotatif, les bioréacteurs à perfusion ou encore des systèmes permettant des stimulations mécaniques du construit cellules/matériau (figure 15). Les effets mécaniques sur les précurseurs des cellules osseuses ont déjà été démontrés dans des études antérieures (200) (205) où les CSM se sont orientées vers un phénotype ostéogénique sous l'influence d'un stress mécanique cyclique dans un bioréacteur à perfusion. La différenciation et la production d'une MEC minéralisée *in vitro* par des CSM contraintes ont également été montrées (206, 207). La culture dynamique de cellules préostéoblastiques augmente les niveaux de transcription du facteur de transcription Run-X2 (indispensable à l'orientation ostéogénique des CSM), de l'ostéocalcine et de la phosphatase alcaline (207, 208). L'alternance d'une perfusion courte et intense suivi d'une période plus longue et moins intense sur les cellules, favorise la régulation de la différenciation ostéogénique. Ainsi, l'écoulement du milieu de culture

sur les cellules n'augmente pas uniquement l'adhésion et la vitalité des cellules au sein du biomatériau mais améliore aussi la production de MEC et minéralisation de la construction.

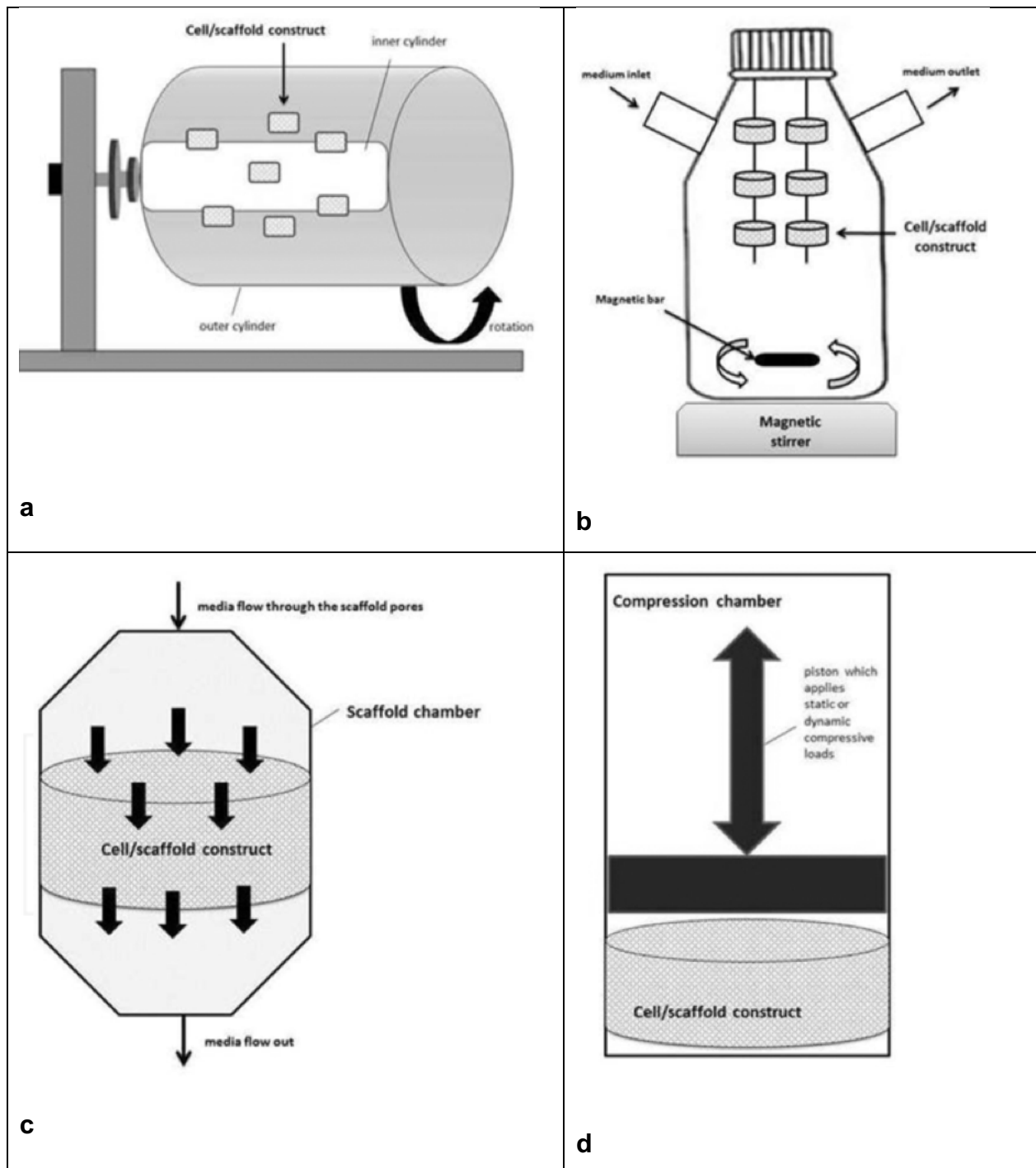


Figure 15 : Illustration de différents systèmes de bioréacteurs pour la culture cellulaire (a :Récipient rotationnel, b : bioréacteur avec agitation magnétique, c : Chambre de perfusion, d : Chambre de compression)

D'après (209)

III. PARTIE IV : ETUDES *IN VIVO* : ANALYSE DE LA LITTERATURE SCIENTIFIQUE

A. Méthodologie de recherche documentaire :

Les critères d'éligibilité

Afin d'obtenir les résultats les plus satisfaisants dans le domaine étudié à savoir les « Cellules souches mésenchymateuses et biomatériaux: intérêt en médecine régénératrice osseuse oro-faciale. Du laboratoire à la clinique », nous avons défini plusieurs critères et méthodologies :

a) Critères d'inclusion

- Etudes en rapport avec la régénération osseuse et l'ingénierie tissulaire osseuse (bone regeneration + bone tissue engineering + stem cells) ;
- Etudes utilisant au moins un des éléments suivants : HA/TCP, β -TCP, BCP, greffe osseuse (bone graft), allogreffe osseuse (allogenic bone graft), xenogreffe osseuse (bone xenograft), matrice osseuse déminéralisée (demineralized bone graft), matrice osseuse déprotéinisée (decellularised bone graft) ;
- Etudes implantant des matrices en site osseux sur animaux ou sur des sujets humains spécifiquement dans la sphère oro-faciale (animals, human, bone, clinical, cleft palat, sinus lift, sinus augmentation, jaw, mandibular, maxillar, alveolar, cranial).

b) Critères d'exclusion

- Etudes sur d'autres tissus que le tissu osseux ;
- Etudes n'incluant pas les matériaux et/ou les données citées précédemment ;
- Etudes uniquement *in vitro*.

2. Bases de données de recherche bibliographique

Une recherche électronique a été réalisée via Pubmed/NCBA, clinicaltrials.com, Cochrane, Google Scholar et Google incluant tout ou partie des mots clés répertoriés dans nos critères d'inclusion.

Au total 28 articles correspondaient à nos critères d'inclusion : 20 concernaient des études animales et 8 concernaient des études humaines.

L'ensemble des résultats ont été rassemblés dans les tableaux ci-joints (tableaux X et Y) et compilés selon qu'il s'agisse d'études précliniques ou cliniques et fonction du type de matériau utilisé (allogreffes osseuses, xenogreffes, substituts osseux synthétiques β -TCP, HA/TCP et matériaux composites). Les données relevées sont :

3. Eléments relevés

- Auteur / année ;
- Modèle d'étude ;
- Caractéristiques des matrices ;
- Origine des cellules souches ;
- Concentrations cellulaires utilisées ;
- Méthode de préparation des constructions cellules/matrice ;
- Utilisation d'un milieu ostéogénique lors de la culture des cellules ou de la construction matrice/cellules ;
- Utilisation de facteurs de croissance ;
- Nombre d'échantillons ;
- Taille du défaut osseux/localisation anatomique ;
- Suivi (en temps) ;
- Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse ;
- Résultats.

Des données, pourtant essentielles, sont souvent mal décrites ou absentes lorsque nous parcourons les publications en rapport avec l'ingénierie tissulaire osseuse. Nous avons essayé ici de répertorier au mieux ces données pour nous permettre de déterminer le ou les éléments clés permettant une régénération osseuse optimale. En effet, nous l'avons

vu dans les chapitres précédents, chaque paramètre peut avoir une influence déterminante dans le potentiel de régénération osseuse. Les matrices utilisées possèdent par exemple des caractéristiques propres très différentes qui vont au delà de leur composition chimique (taille, granulométrie, porosité, méthode de préparation...). D'autres éléments comme les phases de pré-incubations des matrices, l'origine, la préparation cellulaire, les concentrations cellulaires utilisées, les méthodes de préparation des construits matrice/cellules, l'utilisation ou la composition des milieux ostéogéniques, l'adjonction de facteurs de croissance, l'indication/site d'implantation, le modèle animal choisi et même les techniques d'évaluation sont tout autant d'éléments à prendre en considération afin évaluer objectivement l'intérêt des matrices.

B. Résultats

1. *Etudes animales :*

Etudes précliniques													
Allogreffes osseuses													
auteur / année	modèle d'étude	caractéristiques de la matrice	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse	Résultats
Lee I.Y. et al. 2011 ref 199	Lapin	Allogreffe segment diaphyse fémorale de 1,5 cm décellularisée déprotéinisée et congelée + Gel foam (Pfizer) (éponge de collagène)	CS de moelle osseuse (crotte bleue)	2.106 cellules/dispositif	Ensemencement des CS sur la membrane et implantation le même jour. Mise en place du segment de l'allogreffe et recouvrement par l'éponge de collagène avec ou sans CS	Pas de milieu ostogénique	Pas de facteurs de croissance	30	1,5 cm	Fémur (diaphyse)	4, 8 et 12 semaines	Évaluation radiographiques Score établi selon Teira (ref 36) Le score augmente avec la quantité et la qualité de la repousse osseuse	Résultats : - Allogreffe + éponge de collagène + CS : 4 sem: 2,4 ± 1,1 8 sem: 5,4 ± 1,0 12 sem: 14,4 ± 1,1 - Allogreffe + éponge de collagène + solution saline (PBS): 4 sem: 0,8 ± 0,8 8 sem: 3,2 ± 1,5 12 sem: 9,2 ± 1,9
Nather A. et al. 2010 ref 201	Lapin	Allogreffe segment diaphyse fémorale de 1,5 cm flushée et congelée à -80°C + Colle de fibrine Tissel	CS de moelle osseuse (crotte bleue)	3 millions de cellules diluées dans la colle de fibrine (2mL)	Préparation extemporanée d'un gel de fibrine et CS. - Chargement du gel cellulaire ou non dans la partie médullaire et corticale du greffon et mise en place de l'allogreffe.	Pas de milieu ostogénique	Pas de facteurs de croissance	40	1,5 cm	Fémur (diaphyse)	12, 16 et 24 semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques	% os néoformé - Allogreffe + fibrine + CS : 12 sem: 6,99 ± 1,00 % 16 sem: 5,9 ± 1,39 % 24 sem: 6,14 ± 2,07 % - Allogreffe + fibrine + solution saline (PBS): 12 sem: 0,00 ± 0,0 % 16 sem: 0,13 ± 0,26 % 24 sem: 6,14 ± 2,07 %
Lucarelli E. et al. 2005 ref 200	Mouton	Allogreffe segment métatarsaire de 3 cm flushé et congelé -80°C	CS de moelle osseuse	4.106 cellules/dispositif	Préparation extemporanée du mélange PRP/CS Mis en place de l'allogreffe et ensemencement du PRP/CS avant la fin de la chirurgie	Pas de milieu ostogénique	PRP	10	3 cm	Métatarse	4, 8 et 24 semaines	Radiographies Histomorphométrie sur coupes	Radiographies: - Allogreffe + PRP + CS : 12 sem: 5/6 Cicatrisation complète - Allogreffe seule: 12 sem: 1/4 cicatrisation distale, 0/4 cicatrisation proximale % os néoformé: - Allogreffe + PRP + CS : 12 sem: 42,8 ± 54,1% - Allogreffe seule: 12 sem: 26,7 ± 43 %
Xenogreffe													
auteur / année	modèle d'étude	caractéristiques des matrices	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse	Résultats
Yu B.H. et al. 2014 ref 205	Chien (beagle)	Bio Oss 0,5-1 mm	CS issues de moelle osseuse chien CS issues du ligament parodontal chien	2.106 cellules/mL	Préincubation du BioOss dans du milieu de culture pendant 24h et séchage à température ambiante Incubation du construit cellules/BioOss 4h et centrifugation	Prédifférenciation des cellules seules dans un milieu ostogénique (den 1 µM), ac. asc (10 µM), L-glut (2 mM)	Pas de facteurs de croissance	12	-	Sinus maxillaire	12 semaines	Évaluation histologique (marquage tétracycline) (histomorphométrie)	% os néoformé: BioOss: 26,5 % BioOss + CS MO: 28,5 % BioOss + CS ligament: 30 %
Khorsand A. et al. 2013 ref 206	chien	BioOss (pores interconnectés de 300-1500 µm)	CS issues de la pulpe dentaire	2.107 cellules/3-4 granules	Ensemencement des CS sur le BioOss 2h avant implantation	Pas de milieu ostogénique	Pas de facteurs de croissance	10	Modèle de parodontite sur les PM 5mm	Parodontale	8 semaines	Analyse histomorphométrique sur coupes histologiques	Os néoformé: BioOss: 3,1 ± 60,82 mm BioOss + CS: 3,6 ± 61,06 mm
Jafarian M. et al. 2008 ref 202	chien	BioOss spongieux 1-2 mm Granules HA/TCP (60/40) cube de 3 mm (Kasios), porosité 300-500 µm)	CS issues de la MO d'humérus	5105 cellules / matériaux	Préimprégnation des granules (BioOss ou Kasios) dans une solution de collagène de type 1 (vitrogon) pendant 24h. Incubation des construits cellules/matériau 2h avant	Pas de milieu ostogénique	Pas de facteurs de croissance	4	Mandibule, cylindre de 10 mm Ø	Mandibule	6 semaines	Analyse histomorphométrique sur coupes histologiques	% d'os néoformé: BioOss: 36,84 ± 6,73 % BioOss + CS: 50,31 ± 6,97 % HA/TCP: 44,9 ± 13,45 % HA/TCP + CS: 65,78 ± 4,94 %
Yu B.H. et al. 2014 ref 208	rat	Bio Oss 0,5-1 mm	CS issues de moelle osseuse rat CS issues du ligament parodontal rat	2.106 cellules/mL	Préincubation du BioOss dans du milieu de culture pendant 24h et séchage à température ambiante Incubation du construit cellules/BioOss 4h et centrifugation	Prédifférenciation des cellules seules dans un milieu ostogénique (den 1 µM), ac. asc (10 µM), L-glut (2 mM)	Pas de facteurs de croissance	24	-	Calvaria Ø 4 mm, 1,8 mm	8 semaines	µCT (histomorphométrie)	% os néoformé: BioOss: 22,6 % BioOss + CS MO: 26,9 % BioOss + CS ligament: 28 %
Raposo Amaral C.E. et al. 2014 ref 204	rat	BioOss alphaTCP (ciment en CaP)	CS issues du muscle orbiculaire	1.106 cellules/mL	Ensemencement des CS sur le BioOss 24h avant implantation	Pas de milieu ostogénique	Pas de facteurs de croissance	5	Défaut de taille critique alvéolaire de 5 mm	Alvéolaire	8 semaines	Analyse radiographique µCT histomorphométrie	Analyse radiographique: 1 cicatrisation partielle 2 cicatrisations hétérogènes 3 cicatrisations complètes Analyse radiographique: Os autogène: 7 ± 0 BioOss: 3,4 ± 0,52 BioOss + CS: 1,5 ± 0,53 Alpha-TCP: 1,6 ± 0,52 Alpha-TCP + CS: 1,8 ± 0,42 % d'os néoformé: Os autogène: 60,27 ± 16,13 % BioOss: 23,02 ± 8,6 % BioOss + CS: 38,35 ± 19,39 % Alpha-TCP: 13,48 ± 11,7 % Alpha-TCP + CS: 61,8 ± 11,7 %
Khojasteh A. et al. 2008 ref 203	rat	BioOss (pores interconnectés de 300-1500 µm, taille des cristaux 10-60 µm) Beta-TCP 150-500 µm (Kasios)	CS issues de la MO de tibia de rat	5.105 cellules / 150-500 µL de granules	Préimprégnation des granules (BioOss ou beta-TCP) dans une solution de collagène (pures coll) (25 µL de collagène / 150-500 granules) 24h d'incubation des	Pas de milieu ostogénique	PRP	22	Calvaria défaut de taille critique de 5 mm	Calvaria	6 semaines	Analyse histomorphométrique sur coupes histologiques	Os néoformé: BioOss + PRP: 1,27 mm BioOss + CS: 1,44 mm ß-TCP + PRP: 1,21 mm ß-TCP + CS: 2,53 mm

B-TCP												
auteur / année	modèle d'étude	caractéristiques des matrices	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse Résultats
Feng W. et al ref 209	rat	B-TCP Granules macroporeux 1 mm	CS issues du tissu adipeux	5.106cellules/cm2	Incubation des CS sur les granules de B-TCP dans un milieu ostogénique (des 10 nM, ac asc (0,2 mM), β -glyP (2nM)) pendant 3 semaines - Après implantation, injection quotidienne de vit D en intrapéritonéal	10 n M dexaméthasone 0.2 mM acide ascorbique, and 10 mM β -glycerophosphate Vit D en injections intrapéritonéales	Pas de facteurs de croissance	36	Fémur 3*5*5 mm	Fémur	4 semaines	Histomorphométrie sur coupe histologique Immunohistochimie sur runX-2, ALP Activité ALP B-TCP + solution saline < B-TCP + CS + solution saline Activité RunX-2 B-TCP + solution saline < B-TCP + CS + solution saline % d'os réformé: B-TCP + solution saline: 34,29 ± 1,35 % B-TCP + CS + solution saline: 49,24 ± 3,54 % B-TCP + vit D: 56,13 ± 2,28 %
Khojasteh A. et al ref 233	lapin	B-TCP (Granules macroporeux 1 mm) + Cement CPC à microbilles d'alginate chargé en cellules souches	CS issues de moelle osseuse (origine Cyagen Biosciences Inc.)	1.106cellules/ml d'alginate	Les CS sont microencapsulées dans des microbilles d'alginate de 200 μ m puis l'ensemble est cultivé 7 jours puis 3 jours dans un milieu ostogénique Mélange 1/1 B-TCP/CPC (Institute of Nuclear and New Energy Technology of Tsinghua University) + microbilles d'alginate chargées	Oui	Pas de facteurs de croissance	18	Fémur condyle, défaut diamètre 4 mm, profondeur 5 mm	Fémur	8, 16 et 24 semaines	CBCT, évaluation histologique qualitative (Hématoxyline éosine) Néoformations osseuse et moelle osseuse supérieures dans le matériau contenant les CS encapsulées que dans le contrôle sans CS
Zhou J. et al. 2010 ref 210	lapin	B-TCP (Olympus Terumo Biomaterials Corp, Japan) blocs de 3,5*2*15 mm and sterilized. Porosité interconnectée supérieure à 75 %. Taille moyenne des pores: 450 ± 50 μ m	CS issues de moelle osseuse Cellules endothéliales (CE) dérivées des CS de MO	1.106cellules/matériau 0,5.106 CS + 0,5.106 CE	Ensemencement des cellules sur le matériau et application d'un vide de 100 mmHg pendant 300 s. Incubation pendant 2 semaines avec milieu ostogénique	0,25 mM acide ascorbique 10 mM β -glycerophosphate 10 nM dexaméthasone 50 nM tacrolimus (immunosuppresseur)	Pas de facteurs de croissance	32	Ulna distale, longueur 1,5 cm	Ulna	4, 8, 12 et 16 semaines	Rayon X et single photon emission computed tomography (SPECT) Score de Lane-Sandhu: Néoformation osseuse Aucune 0, < 25 % 1, 25%-50% 2, 50%-75% 3, > 75 % 4. B-TCP : 4 semaines: 0 8 semaines: 1,38 ± 0,18 12 semaines: 1,85 ± 0,26 16 semaines: 2,28 ± 0,28 B-TCP + CS: 4 semaines: 1,45 ± 0,21 8 semaines: 2,37 ± 0,27 12 semaines: 2,87 ± 0,28 16 semaines: 3,39 ± 0,31 B-TCP + CS + CE: 4 semaines: 1,89 ± 0,22 8 semaines: 2,82 ± 0,29 12 semaines: 3,45 ± 0,34 16 semaines: 3,95 ± 0,34
HA/TCP												
auteur / année	modèle d'étude	caractéristiques des matrices	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse Résultats
Vahabi S. et al. 2011 ref 212	Chien	HA/TCP (60/40) Kasios blocs de 3*3*3 mm avec une porosité de 300-500 μ m	CS issues de la MO de la crête iliaque	5.105 cellules/0,2 mL/matrice	Immersion des blocs de céramique avec du collagène de type I pendant 24h avant ensemencement des cellules Incubation cellules/matrice 2h avant	Non	Non	5	10*10*10 mm	Mandibule	6 semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques Néoformation osseuse: HA/TCP + CS: 47,5 ± 20,5 % HA/TCP: 31,3 ± 13,6 % BioOx: 31,3 ± 14,6 % Défaut vide: 36,7 ± 15,1 %
Kim S.H. et al. 2009 ref 213	Chien	HA/TCP (70/30) Osteon Mise en place d'une membrane de Biogide	CS issues de la MO CS issues du ligament périodontal	1.106 cellules/0,2 mL/50 mg HA/TCP	Association extemporanée des 0,2 mL de la suspension cellulaire (CS MO ou CS LP) avec 50 mg de granules de HA/TCP	Non	Non	4	rectangle de 5*10 mm 3 mois post extraction sur site d'extraction	Mandibule (PM et M)	8 (site droit) et 16 (site gauche) semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques Néoformation osseuse: HA/TCP + CS MO: 8 semaines: 34,99 % 16 semaines: 40,17 % HA/TCP + CS LP(ligament parodontal): 8 semaines: 31,90 % Néoformation osseuse: HA/TCP: 44,9 ± 13,45 % HA/TCP + CS: 65,78 ± 4,94 % BioOx: 36,84 ± 8,73 %
Jafarian M. et al. 2008 ref 202	Chien	HA/TCP (60/40) Kasios blocs de 3*3*3 mm avec une porosité de 300-500 μ m BioOx 1-2 mm avec une porosité de 300-1500 μ m	CS issues de la MO	5.105 cellules/0,2 mL/matrice	Immersion des blocs de céramique avec du collagène de type I (Vitrogen, Chohesion, Sweden) pendant 24h avant ensemencement des cellules Incubation cellules/matrice 2h avant	Non	Non	4	3 blocs/site	Mandibule	6 semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques Néoformation osseuse: HA/TCP: 44,9 ± 13,45 % HA/TCP + CS: 65,78 ± 4,94 % BioOx: 36,84 ± 8,73 %

Composites													
auteur / année	modèle d'étude	caractéristiques des matrices	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellulaires/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse	Résultats
Konaginski S. et al. Ref 217	Cochon	8-TCP/PCL (50/50), impression 3D blocs de 20*20*7 mm (canaux de 1 mm) micropores 5-40 µm macropores 70-300 µm	CS issues de la MO	1.106 cellules/ml	Prédifférenciation des CS en ostéoblastes pendant 3 jours en milieu ostogénique Ensemencement des ostéoblastes avec la matrice et culture in vitro du construit pendant 14 jours en	100 nM dexaméthasone 50 µg/ml, acide ascorbique 10 mM β-glycérophosphate	Non	12	12*12 mm mandibulaire	Mandibule	8 semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques	% néoformation osseuse au centre du construit : PCL/TCP : 22,11 ± 22,45 % PCL/TCP + ostéoblastes : 1,87 ± 3,66 %
Liao H. T. et al. 2014 Ref 214	Cochon	Tribloc de polymère PEG-PCL-PEG vs Tribloc de polymère PEG-PCL-PEG/poudre HA (100 µm) (50/50) Blocs de 20*20*10 mm réalisés par impression 3D, porosité 80% (350 µm)	CS issues de la MO de la crête iliaque	1.108 cellules/matrice	Ensemencement des CS sur le biomatériau en extemporané	Non	Non	2	20*20 mm Tempe	Os temporal	6 mois	CBCT valeur de Hu (densité: air -1000, eau 0 et os compact 1000)	Valeurs Hu : PEG-PCL-PEG + CS : 22% PEG-PCL-PEG/HA + CS : 64%
Proszcka E. et al. 2015 Ref 218	Lapin	poudre de HA (350 nm) 0,5 % + collagène de type I 50 % + nanofibres de PCL (60 mg)	CS issues de la MO	2.106 cellules/cm2	Préincubation de la matrice seule 14 jours avant ensemencement des CS dans un milieu ostogénique 1 jours avant implantation incubation des matrices dans une solution enrichie en thrombocytes + ensemencement des cellules sur la matrice avec le même milieu ostogénique et centrifugation 7G	100 nM dexaméthasone 40 µg/ml, acide ascorbique 10 nM β-glycérophosphate	Facteurs de croissance issus de la solution enrichie en thrombocytes (TRS) (1,35.106 thrombocytes /µL)	30	8*10 mm fémur	Condyle fémoral	12 semaines	Histomorphométrie sur coupes histologiques	Néoformation osseuse: Matrice + CS : 2155 Matrice + CS + TRS: 3768 Matrice + TRS: 2606 Vide: 610
Pang L. et al. 2013 Ref 215	Lapin	Matrices de PLGA (70%)/TCP (30%) (15*15*3 mm) incubées dans une solution de collagène bovin pendant 72h et incubées dans du simulateur de fluide (SBF) pendant 16 jours permettant la formation d'une couche d'apatite	CS issues de la MO des os long de WNZ lapin	7.107 cellules/ml/matrice	Prédifférenciation des CS pendant 3 semaines Ensemencement des CS prédifférenciés 24h avant l'implantation	100 nM dexaméthasone 50 mg/ml, acide ascorbique 10 mM β-glycérophosphate	Non	46	15 mm radial	radius	12, 24 et 36 semaines	Radiographies Histomorphométrie sur coupes histologiques	Radiographies à 36 semaines: PLGA-TCP-HA/CS: Formation osseuse complète PLGA-TCP/CS: Pseudarthrose PLGA-TCP-HA: aucune réparation PLGA-TCP: aucune réparation Néoformation osseuse sur construits PLGA-TCP-HA/CS: 12 semaines: 48,56 ± 5,12 % 24 semaines: 78,74 ± 2,85 % 36 semaines: 97,27 ± 2,65
James A.W. et al. 2010 Ref 216	Souris	PLGA/HA (85/15) Porosité de 92%	CS issues du tissu adipeux d'origine humaine	6.106 cellules/ml	Ensemencement des CS sur la matrice 24h avant implantation	Non	NON	5	Ø 4 mm Calvaria	Calvaria	4 semaines	µCT	Néoformation osseuse: PLGA-HA: 25% PLGA-HA/CS: 80% Défaut osseux vide: 5%

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études précliniques utilisant des cellules souches et des matériaux dans la reconstruction osseuse

a) Allogreffe :

Trois études correspondent à nos recherches (210-212), 2 chez le lapin et une chez le mouton. Les matériaux employés sont des sections d'os longs (fémur et métatarse) décellularisés et cryoconservés. Les cellules souches utilisées proviennent de moelle osseuse sans prédifférenciation et sont associées à l'allogreffe par différents moyens (membrane de collagène, colle de fibrine et plasma riche en plaquettes) et méthodes (périphérique à l'allogreffe, intramédullaire) à différentes concentrations (3 millions de cellules, 2 et $4 \cdot 10^6$ cellules par dispositif). Les moyens d'analyse employés sont l'évaluation radiographique et la mesure de l'os néoformé par histomorphométrie sur coupes histologiques.

→ Les 3 études montrent que l'ajout de cellules souches améliore la quantité d'os néoformé en comparaison du même matériau sans cellules souches.

b) Xénogreffe :

Six études répondent à nos critères de recherche (213-219), 3 chez le chien et 3 chez le rat. Le BioOss (substitut osseux d'origine bovine) est le matériau employé dans toutes les études. Les cellules souches utilisées proviennent de moelle osseuse, du ligament parodontal, de la pulpe dentaire ou de muscle orbiculaire. Une étude utilise un milieu de différenciation ostéogénique DAG avant ensemencement sur sa matrice. Certains matériaux sont pré-incubés dans une solution de collagène de type I et d'autres dans du milieu de culture. Les constructions sont cultivées entre 2 et 24 heures avant implantation et subissent une centrifugation dans une étude. L'apport de facteurs de croissance est décrit dans une étude. Aucun autre matériau n'est ajouté au BioOss. Les cellules sontensemencées à des concentrations variant de $5 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^7$ cellules par mL ou par matrice. Les moyens d'analyse employés sont l'évaluation radiographique et l'histomorphométrie sur coupes histologiques ou μ -CT.

→ Les 6 études montrent que l'ajout de cellules souches améliore la quantité d'os néoformé en comparaison au même matériau sans cellules souches. Les résultats ne sont pas toujours statistiquement significatifs.

c) β -TCP :

Trois études correspondent à nos recherches (220-222), 1 chez le rat et 2 chez le lapin. Des granules ou des blocs macroporeux de petites tailles de β -TCP sont le matériau employé. Dans une étude, le matériau est associé avec un ciment en phosphate de calcium (CPC) et des micro-billes d'alginate permettant d'encapsuler les CS. Les cellules souches utilisées proviennent soit de moelle osseuse, soit du tissu adipeux. On retrouve également l'emploi de cellules endothéliales différenciées à partir de moelle osseuse qui sont associées aux CS. Les 3 études utilisent un milieu de différenciation ostéogénique de type DAG après ensemencement des cellules sur leurs matrices et l'une d'entre elles poursuit l'adjonction de vitamine D par injections dans le périoste. Les constructions sont cultivées entre 3 jours et 3 semaines avant implantation. Les cellules sontensemencées à des concentrations variant de 1.10^6 et 5.10^6 cellules par mL ou par cm^2 . Le moyen d'analyse employé est l'histomorphométrie sur coupes histologiques ou μ -CT.

→ Les 3 études montrent que l'ajout de cellules souches améliore la quantité et la qualité de l'os néoformé en comparaison au même matériau sans cellules souches. L'association de cellules endothéliales ou l'injection de vitamine D semblent être également un élément permettant d'améliorer la repousse osseuse.

d) HA/TCP :

Trois études chez le chien correspondent à nos recherches (213) (223, 224). Deux utilisent des granules macroporeux avec un ratio HA/TCP de 60/40 et l'autre avec un ratio de 70/30. Dans 2 cas, les granules sont pré-incubés dans une solution de collagène de type I 24h avant mise en contact avec les cellules. Les cellules souches utilisées proviennent soit de moelle osseuse, soit du ligament parodontal et sont ensemencées sur leur substrat à des densités allant de 5.10^5 à 1.10^6 cellules/matériau. Les constructions sont réalisées sans milieu de différenciation ni facteurs de croissance en extemporané ou bien 2h avant leur implantation. Le moyen d'analyse employé est l'histomorphométrie sur coupes histologiques.

→ Les meilleurs résultats sur la néoformation osseuse sont obtenus en associant les matériaux avec les cellules souches. Les cellules souches prélevées dans la moelle

osseuse semblent améliorer la repousse osseuse d'avantage que les cellules souches issues du ligament parodontal.

e) Matériaux composites :

Cinq études correspondent à nos recherches (225-229), 2 chez le cochon, 2 chez le lapin et 1 chez la souris. Les matériaux se présentent sous forme de blocs de petites dimensions et sont composés soit de polyéthylène glycol (PEG), de polycaprolactone (PCL), d'acide polylactique/glycolique et contiennent tous une charge minérale en céramique de phosphate de calcium (HA ou TCP). Les cellules souches proviennent toutes de moelle osseuse excepté pour une étude où ces dernières sont issues du tissu adipeux. Trois études sur 5 utilisent un milieu ostéogénique composé de DAG dont une complète la préparation des matrices par l'adjonction d'une solution riche en thrombocytes (TRS) contenant des facteurs de croissance. Les cellules sont soit différenciées en amont de leur ensemencement sur les matrices ou bien 24h avant l'implantation des construits. Une étude utilise la culture des cellules sur le matériau composite pour une durée de 14 jours en bioréacteur. Les densités d'ensemencement sont variables et vont de 1.10^6 à 1.10^8 cellules par mL, par matrice ou par cm^2 . Les moyens d'analyse employés sont, l'histomorphométrie sur coupes histologiques et les mesures des niveaux de gris sur coupes CBCT, μ -CT et radiographies.

→ Les résultats montrent que l'apport de cellules souches améliore la régénération osseuse. Certaines de ces études se sont même focalisées sur la contribution d'une charge de phosphate de calcium et de facteurs de croissance sur la qualité de repousse osseuse et ont montré que ces derniers amélioreraient d'avantage la cicatrisation des tissus osseux.

2. Etudes chez l'homme : Sphère oro-faciale :

Sur les 8 études répertoriées sur l'homme, 7 sont des suivis de cas (230-236) et 1, une étude clinique (237).

Etudes cliniques												
Greffes osseuses												
auteur / année	caractéristiques de la matrice	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse	Résultats
Behnia H. et al. 2009 réf 219	Osteoset DBM + Sulfate de calcium macroporeux (47 %) + matrice osseuse déminéralisée (DBM) (53 %) = Granulés de Ø 3 mm	CS de moelle osseuse (criste iliaque)	5.105 cellules/dispositif	Ensemencement des CS sur le dispositif Osteoset DBM 1 jour avant implantation	Non	BMP contenus dans le DBM	2 (filles 14 ans, garçons 10 ans)	?	Fente palatine	8 et 16 semaines	Radiographies panoramiques Histomorphométrie à partir de coupes conebeam	Radiographies: - 8 sem: intégrité du plancher nasal - 16 sem: patient 1: 25,6 % patient 2: 34,5 %
Rickett D. et al. 2011 réf 222	BioOss 0,25-1 mm + Moelle osseuse concentrée + thrombine + BioGide (membrane de collagène)	CS contenues dans la MOCA (criste iliaque)	-	Mélange extemporané des granulés (2g), MOCA (1mL), thrombine (1mL)	Non	BMP contenus dans la MOCA	12 patients âge moyen 60,8 ± 5,9 ans Compris entre 48 et 69 ans	?	Sinus maxillaire	15 semaines	Analyses histomorphométrique des biopsies des sites implantés	% os néoformé: BioOss + os autologue: 12,0 ± 6,6 % BioOss + MOCA + thrombine: 17,7 %
Yamada Y. et al. 2008 réf 226	PRP autologue/thrombine	CS issues de la MO des crêtes iliaques	5.106 cellules/mL	Préparation du PRP 1 jour avant implantation Mélange PRP-CS/thrombine Injection sur le site d'implantation de 1,8 à 5,4 g du construit	100mM dexaméthasone 10 mM β-glycérophosphate 80mg/mL d'acide ascorbique	BMP contenus dans le PRP	16 sites 12 patients âge moyen 54 ans Compris entre 44 et 60 ans	Hauteur résiduelle du plancher sinus: 6 mm	Sinus maxillaire	3, 6, 12 et 24 mois 3,5 et 4,5 ans (en moyenne)	Panoramique CBCT Histologie sur biopsies	% os néoformé: 3 mois: 3,9 ± 1,8 % 6 mois: 7,4 ± 1,8 % 12 mois: 8,9 ± 1,6 % 24 mois: 8,8 ± 1,6 % 3,5 ans: stabilité des implants, aucun effet adhésif 4,5 ans: stabilité implantaire et formation d'un nouvel os autour des implants chez tous les patients
B-TCP												
Thesleff T. et al. 2017 réf 223	Chronos 1 (Synthesis). Granules B-TCP 1,4-2,8 mm + ostéosynthèse en titane ou résorbable	CS autologues issues du TA	15.106 cellules/60 mL de granulés de B-TCP	Association cellules/matériau 48h avant implantation	Non	Non	5 âge compris entre 54 et 75 ans (traité pour hémangiome ou méningiome)	8*6 cm en moyenne	Cranioplastie	Suivi de 6,1 à 7,4 ans moyenne de 6,6 ans	CBCT valeur de Hu (densité: air -1000, eau 0 et os compact 1000), suivi clinique	Valeur Hu: - 1 à 1: 91,5 - 12 semaines: 102,5 - 1 an: 1031 - 6,6 ans: infection tardive (1) perte de la greffe (2) récurrence du méningiome (1) résorption et ostéointégration Conclusion: cranioplastie = procédure compliquée sans amélioration apportée par les CS
Ueda M. et al. 2005 réf 224	B-TCP	CS autologues issues de la MO	?	?	?	Facteurs de croissance issus du PRP	6	3*5 mm	Sinus lift et mise en charge immédiate	1 an	Évaluation radiographique	1 an: Augmentation des tissus minéralisés de 7,3 ± 4,6 mm (comparé en préopératoire) Stabilité implantaire Régénération osseuse à 36 semaines - TCP seul: 31 ± 57 % - TCP/CS: 36 ± 65 %
Kaiger D. 2015 réf 225	B-TCP (cerasorb) + bone cell repair (BRC) Solution de 10 mL	CS autologues issues de la MO de la crête iliaque	?	Association cellules/matériau en extemporané	Non	Non	30	?	Sinus lift	16 semaines	µCT Histomorphométrie	
HA/TCP												
auteur / année	caractéristiques des matrices	origine des cellules souches	Concentration cellulaire	Préparation des construits cellules/matrice	Utilisation d'un milieu ostogénique lors de la culture des cellules ou du construit matrice/cellules	Utilisation de facteurs de croissance	Nombre d'échantillons Témoin + contrôle	taille du défaut osseux	localisation	Suivi	Moyens d'analyse de la qualité/quantité de la repousse osseuse	Résultats
Behnia H. et al. 2012 réf 220	HA/TCP (60/40) (Reprobone, Ceramysis) Cylindres de 3 mm Porosité de 300-500 µm Mise en place d'une membrane de Biogide pour refermer le site	CS issues de la MO	5.105 cellules/matrice (pas de quantité décrite)	Association CS/matériau 24h avant implantation (En péropératoire, association des CS/matériau avec PDGF et PRP (caillot de fibrine)	Non	Facteurs de croissance issus du PRP PDGF	3 patients d'environ 10 ans avec un total de 4 sites alvéolaires	?	Fente palatine antérieure	12 semaines	CBCT	% de volume osseux en post opératoire: 51,3 %
Shayesteh Y.S. et al. 2008 réf 221	HA/TCP (60/40) (Kasios) Cube de 3 mm Porosité de 300-500 µm	CS issues de la MO (criste iliaque de donneurs sains)	5.105 cellules/0,2 mL de DMEM/matrice	Association CS/matériau 24h avant implantation	Non	Non	7	?	Sinus lift	1 an	Histomorphométrie sur coupe biopsie avant mis en place des implants, CBCT	% néoformation osseuse: 41,34 % Hauteur osseuse: J0: 2,25 mm 1 an: 10,83 mm Stabilité des implants à 1 an: 93 %

Tableau 5 : tableau récapitulatif des études humaines en ingénierie tissulaire osseuse

a) Greffe osseuse biologiques (autogreffe, allogreffe et xenogreffe) :

Trois études ont été référencées (230) (233) dont un essai clinique de Yamada *et al.* (237). La première a comme indication le comblement de fentes palatines et les 2 autres l'augmentation de la hauteur du plancher sinusien avant pose d'implants. Les matériaux utilisés comme support des cellules souches sont des granulés composés d'un mélange de sulfate de calcium/DBM, des granules de BioOss ou un gel de PRP/thrombine. Les cellules souches proviennent toutes de moelle osseuse prélevée au niveau de la crête iliaque des patients. Certaines sont utilisées directement via le concentré de moelle, les autres sont purifiées et une étude utilise un milieu de différenciation ostéogénique. Les concentrations en cellules souches sont de 5.10^5 cellules/matrice, 5.10^6 cellules/mL et indéterminée dans la troisième étude utilisant les cellules souches présentes dans la MOCA. Le suivi des patients s'étale de 8 semaines à 4,5 ans. Les moyens de quantification de l'os néoformé sont l'évaluation radiographique, les mesures de niveau de gris sur coupes CBCT et l'histomorphométrie sur cone beam et sur coupes histologiques. Sur le plus long terme, la stabilité des implants est également mesurée.

→ L'ensemble des études utilisant les greffes osseuses associées à des cellules souches montrent l'innocuité des constructions cellules souches/matrices dans les indications de rehaussement de crête osseuse et de comblement de chirurgie correctrice lors de fermeture de fentes palato-labiale. Aucun effet délétère n'a été déclaré et les matrices additionnées de cellules souches possèdent un pouvoir de régénération osseuse suffisant. Seule une étude de cas concernant le rétablissement de la hauteur de crête osseuse avant pose d'implant, permet d'établir que le BioOss mélangé à de la moelle osseuse totale/thrombine s'impose comme un meilleur candidat que le BioOss associé à de l'os autologue.

b) β -TCP

Trois études correspondent à nos recherches (234-236). Les indications sont les suivantes : cranioplastie (traitement d'un hémangiome) et rehaussement sinusien en pré-implantaire. Les matériaux utilisés comme support des cellules souches sont composés de granules de β -TCP de chez Synthès®, de Cerasorb®, et le troisième est non décrit. Les cellules souches proviennent de moelle osseuse de crête iliaque et de tissu adipeux

des patients. Elles ont été utilisées à des concentrations 15.10^6 cellules pour 60 mL de granules pour une étude, à des concentrations non décrites pour les 2 autres études. Du PRP a été additionné à la construction cellules souches/matériau au sein d'un de ses 3 suivis clinique. Les patients sont suivis de 16 semaines jusqu'à 6,6 années. La repousse osseuse est mesurée par radiographie, mesures de niveau de gris sur coupes μ -CT et l'histomorphométrie sur coupes histologiques.

→ Deux études sur 3 démontrent l'innocuité de la construction cellules souches/matériau, sans effets délétères. Une étude compare le matériau utilisé seul ou avec cellules souches et conclut que l'apport de ces dernières améliore la repousse osseuse. Une seconde démontre l'efficacité du matériau sans le comparer au même matériau sans cellules. La dernière observation dans l'indication de cranioplastie conclut que cette procédure est difficile et que l'apport de CS n'améliore pas la repousse osseuse avec des échecs et des reprises chirurgicales plusieurs années après la première intervention.

c) HA/TCP

Deux études ont été référencées (231, 232). Une dans l'indication d'un sinus lift et l'autre dans le comblement de fente labio-palatine. Les matériaux utilisés comme support des cellules souches sont composés de granules de 3 mm de diamètre de chez Ceramysis® et de chez Kasios® en HA/TCP avec un ratio 60/40. Les cellules souches proviennent de moelle osseuse de crête iliaque et utilisées à des concentrations de 5.10^5 /matrice implantée. Aucun milieu ostéogénique n'a été utilisé et des facteurs de croissance issus du PRP ont servi dans une étude. Les patients ont été suivis de 12 semaines à 1 an. La repousse osseuse a été mesurées par CBCT et histomorphométrie sur coupes histologiques.

→ Le suivi clinique des fentes labio-palatine montre une augmentation du volume osseux de 51,3 % à 12 semaines. L'étude sur les sinus lift montre un gain de plus de 8 mm de hauteur osseuse à 1 an avec une stabilité implantaire. Aucun effet délétère n'a pu être relevé démontrant l'innocuité de l'association des cellules souches à ces matériaux.

Les résultats de ces études animales et humaines permettent d'établir plusieurs éléments de réponse quant aux critères nécessaires à la régénération osseuse dans le cadre de

l'ingénierie tissulaire osseuse. D'une manière générale, l'apport de cellules souches semble être un élément favorable à la repousse osseuse comparé à des matériaux seuls. Aucun effet délétère n'a pu être noté démontrant l'innocuité des constructions cellules souches/matrice. Les cellules souches issues de moelle osseuse permettraient de potentialiser d'avantage la cicatrisation osseuse que des cellules souches d'autres origines, notamment celles du ligament parodontal. L'association de cellules endothéliales aux CS ainsi que l'injection de vitamine D améliorerait également la repousse osseuse. De même concernant l'apport de facteurs de croissance. Parmi les matériaux utilisés, ceux possédant une phase collagénique et/ou minérale en phosphate de calcium répondraient mieux aux indications. Les résultats chez l'homme sont plus flous. Outre l'innocuité des matériaux cellularisés implantés en site osseux, l'apport de CS ne paraît pas toujours judicieux. A noter que chez l'homme, les sites implantés n'avaient pas toujours le même potentiel ostéogénique qu'avec les modèles animaux « sains ».

C. Discussion :

Il est difficile de comparer toutes ces études qui sont hétérogènes. On ne peut en conclure que des tendances et des étapes indispensables permettant de se rapprocher du protocole opératoire idéal. En effet, la combinaison de nombreux et différents types de supports, cellules souches et facteurs exogènes est utilisée en ITO. Ces associations diverses entraînent un certain nombre de confusions. Ce travail, tente d'apporter des éléments de réponse afin d'aider les chirurgiens à déterminer la combinaison ainsi que les protocoles de préparation les plus adaptés et les plus efficaces pour régénérer le tissu osseux.

1. *Etudes précliniques*

a) Selon le modèle animal :

Les modèles animaux permettent de réaliser le transitionnel entre les travaux *in vitro* et les études cliniques (238). Afin de déterminer la qualité et la quantité de repousse osseuse, différents modèles peuvent être utilisés. Ils incluent le porc, la chèvre, le chien, le lapin, la souris ou encore le rat. Chaque modèle a ses avantages par rapport aux autres

et la sélection du meilleur modèle dépendra des objectifs visés par l'étude et liés à d'autres facteurs. On peut noter leur coût, leur disponibilité, leur durée de vie, la taille des animaux, et les similarités physiologiques et/ou pathologiques avec l'homme (239). Le chien, la chèvre et le porc vont, par exemple, être d'avantage semblables à l'homme (239). Dans notre travail de recherche, les animaux les plus utilisés sont le lapin et le chien avec 6 études répertoriées pour chaque espèce. Viennent ensuite le rat (4 études), le porc (2 études) et la souris (1 étude). Les facteurs comme le site anatomique et la taille du défaut osseux vont avoir un impact important quant sur la régénération tissulaire osseuse. Ici les défauts osseux ont été répertoriés au niveau de la mandibule (6 études), du fémur (4 études) et de la calvaria (3 études) principalement. On retrouve également des sites comme l'ulna, le métatarse, l'os temporal, le sinus maxillaire. Les défauts osseux réalisés sont de tailles variables en fonction des études ou bien des espèces animales étudiées. Des carottages (diamètres de 5 mm) et des sections d'os longs sont le plus couramment réalisées (1,5 à 3 cm). Les délais pour évaluer la repousse osseuse sont également très variables. Les cinétiques de repousses osseuses sont différentes en fonction des espèces animales utilisées. Plus ceux-ci sont imposants, plus les délais sont importants. Le délai le plus souvent répertorié est de 8 semaines, toutes espèces confondus. On peut également noter que seules 7 études ont réalisé une cinétique de repousse osseuse.

b) Du point de vue des méthodes de préparation des construits cellules/matrices

Quelque soit les matrices utilisées, certaines vont subir des étapes de pré-incubations dans diverses solutions afin d'adsorber des protéines ou des molécules ostéogénitrices en surface et permettre une meilleure adhésion ou différenciation des cellules à leur contact. Ainsi Yu *et al* (219) (216) vont disposer leurs matrices dans du milieu de culture pendant 24h, les faire ensuite sécher et les mettre ensuite en contact des cellules. D'autres vont incuber les matériaux dans un milieu ostéogénique de type DAG pendant 24h ou 14 jours ou bien dans une solution de collagène de type I pendant 24h (213, 214). Les cellules vont êtreensemencées à différentes concentrations selon les auteurs. Ce paramètre est important car il permet de préserver un potentiel de survie cellulaire. Les densités relevées sont assez hétérogènes. Certaines études décrivent des concentrations

cellulaires par cm^2 , mL, g ou encore par matrice. La densité relevée le plus couramment est de 1.10^6 cellules/mL déposée sur la totalité de la matrice. Ces dernières étant souvent sous différentes formes galéniques, il est difficile d'évaluer de manière précise la densité cellulaire à la surface et/ou à l'intérieur de la matrice.

Afin d'améliorer la pénétration des cellules dans le construit certains auteurs (219) (221) vont appliquer une force de centrifugation de 1000 rpm pendant 1 minute et un autre un vide de 100 mm de mercure pendant 100 secondes.

Un autre paramètre important consiste au temps d'association cellules/matrice avant leur implantation en site osseux. Le délai le plus couramment retrouvé est de 24h (5 études), suivi de 2h (4 études), 4h (2 études), extemporané, 2 semaines et 7 jours.

Huit études au total utilisent un milieu de différenciation de type DAG. La majorité l'utilise afin de différencier les cellules souches avant leur mise en contact avec la matrice (216) (220, 221) (226) (229). La composition de ce milieu de différenciation peut varier d'une étude à l'autre. On retrouve essentiellement les mélanges aux concentrations suivantes : 1 μM de dexaméthasone (D) / 10 μM d'acide ascorbique (A) / 2 mM de β -glycérophosphate (G) et 100 nM D / 50 $\mu\text{g/mL}$ (A) / 10 nM (G). D'autres mélanges et de concentrations différentes sont utilisés : 10 mM D / 0,2 mM (A) / 10 mM (G) et 10 nM D / 40 $\mu\text{g/mL}$ (A) / 10 nM (G). Un auteur (221) ajoute du tacrolimus, un immunosuppresseur puissant dans son mélange à une concentration de 50 nM.

Nous l'avons vu, les facteurs de croissance sont nombreux en ITO : TGF- β , FGF, IGF, VEGF, VEGF ou BMP (232). Leur intérêt est grand puisque 2 géants de l'orthopédie ont reçu l'autorisation de mise sur le marché américain de 2 BMP recombinées humaines, la BMP-2rh (Medtronic Infuse®) et la BMP-7rh (Stryker OP-1®) pour les indications de pseudarthrose des os longs et la fusion des corps vertébraux. Dans les études répertoriées ici, le PRP est la source de facteurs de croissance la plus couramment retrouvée. (214) (211). Ce dernier contient plusieurs facteurs de croissance comme le TGF- β 1, FGF, VEGF et PDGF, mais également des molécules d'adhésion comme la fibrine, la fibronectine ou la vitronectine (240). L'utilisation du PRP est d'ailleurs bien connue dans le domaine de la réparation osseuse.

c) Selon les méthodes analytiques

Les méthodes analytiques permettant d'estimer et de quantifier la repousse osseuse sont nombreuses et parfois opérateur dépendant. On retrouve principalement de l'histomorphométrie réalisée sur des coupes histologiques. Cette technique éprouvée possède des biais quant au nombre de coupes utilisées ainsi qu'aux zones de différenciation du matériau et de l'os néoformé. Elle demeure cependant la plus précise. D'autres mesures histomorphométriques sont également réalisées sur des coupes issues d'acquisition sur CBCT ou μ CT (définition plus fine). La radiographie conventionnelle est également utilisée mais demeure moins précise dans la quantification de la repousse osseuse. On retrouve également la technique du marquage à la tétracycline permettant de quantifier la repousse osseuse à plusieurs délais en fonction des temps d'injection du marqueur qui va s'incorporer au front de minéralisation osseuse.

d) Du point de vue des matériaux

Les greffes osseuses allogéniques sont très utilisées pour la reconstruction osseuse grâce à leurs propriétés mécaniques et ostéoconductives (241). Malgré tout, des échecs dus à des infection ou fractures ont été relevés (242, 243). Les allogreffes sont également souvent utilisées en ITO et en association avec des cellules souches (212) (230) (244). L'addition de facteurs comme le PRP, la colle de fibrine ou encore du collagène de type I a montré son efficacité dans l'augmentation de la quantité d'os néoformé dans les études animales répertoriées dans cette revue (211) (244).

Les xélogreffes osseuses comme le BioOss®, matrice bovine déprotéinisée, sont des matériaux désormais bien établis dans le domaine de la chirurgie reconstructive. Ce matériau est biocompatible et ostéoconducteur. Des cellules souches de diverses origines lui ont été associés et l'ensemble a prouvé son efficacité dans la régénération osseuse. Néanmoins en site alvéolaire (215), celle-ci semble supérieure au site de calvaria chez le rat (216).

Les céramiques en phosphate de calcium (TCP, HA ou BCP) sont bioactives et hautement biocompatibles (245). Les travaux répertoriés les utilisent seules ou bien en association avec d'autres types de matériaux comme le PCL ou les acides polylactique/polyglycoliques (226), d'autres phosphates de calcium ou bien du collagène

(246), mais il est difficile de connaître quelle combinaison est la plus efficace. Par exemple, associés à de l'acide polyglycolique/polylactique dans des proportions 30/70 (226) ou à du collagène (246) et sur des délais similaires, les taux de repousse osseuses sont équivalents mais l'origine cellulaire est également différente. D'autres études utilisant des céramiques biphasées (BCP) chez le chien (213) (223, 224) ont montré que les construits CS/BCP répondaient mieux à des constructions formées de cellules souches/BioOss. Les construits en BCP et BioOss® avec cellules souches vont promouvoir davantage de cicatrisation osseuse que ces mêmes construits seuls. Les résultats sont également meilleurs lorsque des cellules issues de moelle osseuse sont utilisées en comparaison à des cellules issues du ligament parodontal.

Idéalement, la structure des matériaux doit se rapprocher de la structure osseuse aux échelles nano-métriques, micro-métriques et macro-métriques, d'un point de vue structurel et de composition. Dans les études relevées, les matériaux sont le plus souvent sous forme de granules micro et macroporeux. Cette configuration est idéale pour une meilleure répartition et pénétration cellulaire. Toutes les matrices répertoriées possèdent une fraction minérale en phosphate de calcium, qu'elle soit naturelle ou bien synthétique, essentiel pour une réponse favorable des cellules osseuses. Certains matériaux sont même imprégnés de collagène de type I pour augmenter ce mimétisme.

e) Selon les résultats

Lorsque nous analysons les résultats de l'ensemble de ces études, nous ne pouvons qu'être prudents. Les paramètres d'étude ne s'arrêtent pas à la propriété chimique du matériau, sa forme galénique et son association avec une source de cellules souches. Nous l'avons vu, ces éléments sont très variables. Aussi, nous ne pouvons pas comparer les études entre elles tant elles sont différentes. Mais nous pouvons établir une tendance. En effet, l'association des matériaux avec des cellules souches serait favorable à la régénération tissulaire osseuse. Les matériaux possédant une fraction en phosphate de calcium répondraient également mieux (matériaux composites) lorsqu'ils sont implantés. L'ajout de cellules endothéliales en co-culture des cellules souches améliorerait également la cicatrisation osseuse en stimulant la vascularisation osseuse indispensable

à cette dernière. Et pour terminer, l'apport de facteurs de croissance est un plus indéniable notamment via le PRP.

2. *Etudes chez l'homme*

Parmi les 8 études sélectionnées chez l'Homme, 7 sont des suivis de cas et 1 une étude clinique.

Les indications chirurgicales sont principalement l'élévation du plancher sinusien (5 études (232-237) avant mise en place d'implants dentaires. Deux suivis de cas concernent des reconstructions de fentes palatines (230, 231) et un suivi étudie la cicatrisation osseuse sur des cranioplasties (234). Les matériaux utilisés sont des greffes osseuses (DBM, BioOss® et PRP/thrombine) ou des substituts osseux synthétiques en phosphate de calcium (β -TCP et HA/TCP en ratio 60/40). L'ensemble de ces matériaux a une autorisation de mise sur le marché pour le comblement osseux. Les cellules souches utilisés sont toutes issues de moelle osseuse autologue et de moelle osseuse allogénique dans une étude (232). La densité cellulaire utilisée varie de 5.10^5 à 25.10^6 cellules par mL ou par matériau. Certaines études ne décrivent pas cette densité. Les associations cellules/matériau sont réalisées entre 24h et en per-opératoire avant implantation. Une seule études (237) utilise un milieu de différenciation ostéogénique sur les cellules avant implantation. Les facteurs de croissance sont issus du PRP, de la DBM ou de la moelle osseuse concentrée (230, 231) (233) (235) (237). L'âge des patients est très variable au sein de mêmes études et entre chaque étude. Le suivi de cas concernant les cranioplasties est à modifier puisque l'indication de greffe pouvait faire suite à une pathologie infectieuse dans 4 cas sur 5 (234). Enfin, les suivis sont également différents puisque seules 3 études vont au-delà de 12 mois de suivi (et jusqu'à 6,6 ans), rendant difficilement comparable ces études. Les méthodes d'évaluation de la repousse osseuse sont basées sur les rayons X, panoramique, rétro alvéolaire, CBCT et histomorphométrie sur biopsies (carottes osseuses prélevées avant mise en place des implants dentaires). Ces méthodes n'ont pas la même précision et certaines, comme le panoramique dentaire, vont ne donner qu'une évaluation qualitative.

Les résultats des suivis de cas ne donnent qu'une idée de la capacité des matériaux associés à des cellules souches à améliorer la qualité de la repousse osseuse et son

innocuité lorsqu'il est implanté chez l'homme. Seule l'étude clinique (236) compare l'utilisation du TCP (cerasorb®) seul ou associé à des cellules souches (BRC bone cell repair). Cette étude conclut que les cellules souches vont potentialiser la repousse osseuse en comparaison au matériau seul.

D. Conclusion

L'ITO est une discipline toujours en plein essor. Plusieurs stratégies de traitements sont testées et envisagées et déjà même utilisées chez l'Homme. Ce travail a pour objectif d'établir une liste des éléments à prendre en considérations sur l'ensemble des paramètres utilisés en ITO. Plus que des éléments, certaines tendances prouvent l'efficacité de certaines combinaisons entre variables comme suit : matériaux macro et micro-poreux possédant une fraction en phosphate de calcium, cellules souches originaires de la moelle osseuse et des facteurs de croissance contenu par exemple dans le PRP. Néanmoins, il existe encore certaines limitations dans l'utilisation des cellules souches et notamment des problèmes éthiques et biologiques comme le développement de cellules cancéreuses.

E. Bibliographie

1. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003 May;423(6937):349–55.
2. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev*. 1998 Feb;71(1–2):65–76.
3. Assal M, Stern R. Realignment and extended fusion with use of a medial column screw for midfoot deformities secondary to diabetic neuropathy. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Apr;91(4):812–20.
4. Chantelau EA, Grützner G. Is the Eichenholtz classification still valid for the diabetic Charcot foot? *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13948.
5. Dennis SC, Berkland CJ, Bonewald LF, Detamore MS. Endochondral ossification for enhancing bone regeneration: converging native extracellular matrix biomaterials and developmental engineering in vivo. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Jun;21(3):247–66.
6. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2015 Oct; 31 (15).
7. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res*. 2009 Feb;24(2):274–82.
8. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen K-S, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):46–62.
9. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4473–5.
10. Harris D. Advanced surgical procedures: bone augmentation. *Dent Update*. 1997 Oct;24(8):332–7.
11. Cho-Lee G-Y, García-Díez E-M, Nunes R-A, Martí-Pagès C, Sieira-Gil R, Rivera-Baró A. Review of secondary alveolar cleft repair. *Ann Maxillofac Surg*. 2013 Jan;3(1):46.
12. Bauer TW, Togawa D. Bone graft substitutes: towards a more perfect union. *Orthopedics*. 2003 Sep;26(9):925–6.
13. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 2000 Jul;31(3):389–98.

14. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop*. 1999 Mar;(360):71–86.
15. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999 Oct;30(4):571–81.
16. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941–53.
17. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920–6.
18. Carulli C, Matassi F, Civinini R, Innocenti M. Tissue engineering applications in the management of bone loss. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013;10(1):22–5.
19. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 1999;1:19–46.
20. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*. 2004 Jan;32(1):160–5.
21. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641–50.
22. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 (Suppl 1):36–42.
23. Ohba S, Yano F, Chung U. Tissue engineering of bone and cartilage. *IBMS BoneKEy*. 2009 Nov;6(11):405–19.
24. Stella JA, D'Amore A, Wagner WR, Sacks MS. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues. *Acta Biomater*. 2010 Jul;6(7):2365–81.
25. Chen G, Sato T, Ushida T, Ochiai N, Tateishi T. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng*. 2004 Apr;10(3–4):323–30.
26. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Sep 1;78:1246–62.
27. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. 2008 Dec;17 (Suppl 4):467–79.
28. Tabesh H, Amoabediny G, Nik NS, Heydari M, Yosefifard M, Siadat SOR, et al. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochem Int*. 2009 Feb;54(2):73–83.
29. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May 30;59(4–5):325–38.

30. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:41–75.
31. Ko H-F, Sfeir C, Kumta PN. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2010 Apr 28;368(1917):1981–97.
32. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2005 Jun;203(3):465–70.
33. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2008 May;89(5):338–44.
34. Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. II. A retrospective review of seventy-two tested and treated patients. *J Am Acad Dermatol.* 1984 Apr;10(4):647–51.
35. DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA, McPherson JM. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res.* 1986 Jan;20(1):109–20.
36. Yang C, Hillas PJ, Báez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* 2004;18(2):103–19.
37. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput.* 2000 Mar;38(2):211–8.
38. Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Jul;6(7):2540–7.
39. Müller FA, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2006 Jul;27(21):3955–63.
40. Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):2141–9.
41. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Feb;76(2):431–8.
42. Struillou X, Boutigny H, Badran Z, Fellah BH, Gauthier O, Sourice S, et al. Treatment of periodontal defects in dogs using an injectable composite hydrogel/biphasic calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2011 Jul;22(7):1707–17.

43. Struillou X, Rakic M, Badran Z, Macquigneau L, Colombeix C, Pilet P, et al. The association of hydrogel and biphasic calcium phosphate in the treatment of dehiscence-type peri-implant defects: an experimental study in dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Dec;24(12):2749–60.
44. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6643–51.
45. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2339–49.
46. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Oct;17(5):331–47.
47. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface*. 2007 Dec 22;4(17):999–1030.
48. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27050/>
49. Kim HJ, Kim U-J, Kim HS, Li C, Wada M, Leisk GG, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. *Bone*. 2008 Jun;42(6):1226–34.
50. Mandal BB, Grinberg A, Gil ES, Panilaitis B, Kaplan DL. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May;109(20):7699–704.
51. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2012;29(1):1–63.
52. Mei N, Chen G, Zhou P, Chen X, Shao Z-Z, Pan L-F, et al. Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. *J Biomater Appl*. 2005 Apr;19(4):323–39.
53. Kallela I, Tulamo RM, Hietanen J, Pohjonen T, Suuronen R, Lindqvist C. Fixation of mandibular body osteotomies using biodegradable amorphous self-reinforced (70L:30DL) polylactide or metal lag screws: an experimental study in sheep. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 1999 Apr;27(2):124–33.
54. Lyons F, Partap S, O'Brien FJ. Part 1: scaffolds and surfaces. *Technol Health Care*. 2008;16(4):305–17.

55. Gloria A, Causa F, Russo T, Battista E, Della Moglie R, Zeppetelli S, et al. Three-dimensional poly(ϵ -caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties. *Biomacromolecules*. 2012 Nov;13(11):3510–21.
56. Zhu Y, Gao C, Shen J. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials*. 2002 Dec;23(24):4889–95.
57. Leukers B, Güllkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M, et al. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Dec;16(12):1121–4.
58. Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999 Dec 5;47(3):324–35.
59. Zhao H, Wang G, Hu S, Cui J, Ren N, Liu D, et al. In vitro biomimetic construction of hydroxyapatite-porcine acellular dermal matrix composite scaffold for MC3T3-E1 preosteoblast culture. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar;17(5–6):765–76.
60. Sulaiman SB, Keong TK, Cheng CH, Saim AB, Idrus RBH. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J Med Res*. 2013 Jun;137(6):1093–101.
61. Tarafder S, Balla VK, Davies NM, Bandyopadhyay A, Bose S. Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Aug;7(8):631–41.
62. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757–74.
63. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Mar;14(3):195–200.
64. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Mar;14(3):201–9.
65. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2011 Oct 10;31(7):1245–56.
66. Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2005 May;2(3):303–17.

67. Sailaja GS, Ramesh P, Vellappally S, Anil S, Varma HK. Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration. *J Biomed Sci*. 2016 Nov 5;23(1):77.
68. Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2010 Dec;224(12):1471–86.
69. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):137–46.
70. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):475–83.
71. Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng*. 2001 Jun;7(3):291–301.
72. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*. 2011 Jan;32(3):665–71.
73. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*. 2011 Jan;32(3):665–71.
74. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998 Feb;39(2):190–9.
75. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998 Feb;39(2):190–9.
76. Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Dec;13(6):749–57.
77. Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med*. 2007 Aug;11(4):654–69.
78. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2529–43.

79. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970 Sep;4(3):433–56.
80. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):763–76.
81. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004 Mar 19;279(12):11384–91.
82. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1014–7.
83. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(24):4385–415.
84. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697–715.
85. Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts. *Tissue Eng Part A.* 2013 Jun;19(11–12):1416–23.
86. Principles of Tissue Engineering - 3rd Edition [Internet]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/principles-of-tissue-engineering/lanza/978-0-12-370615-7>
87. Grafting RGD Containing Peptides Onto Hydroxyapatite to Promote Osteoblastic Cells Adhesion [Internet]. PubMed Journals. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/15446238/>
88. Huang H, Zhao Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang H, Fu T, et al. Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *J Oral Implantol.* 2003;29(2):73–9.
89. Gilbert M, Shaw WJ, Long JR, Nelson K, Drobny GP, Giachelli CM, et al. Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. *J Biol Chem.* 2000 May;275(21):16213–8.
90. Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, et al. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 2000 Aug 18;1(2):107–14.

91. Cavalcanti-Adam EA, Shapiro IM, Composto RJ, Macarak EJ, Adams CS. RGD peptides immobilized on a mechanically deformable surface promote osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2002 Dec;17(12):2130–40.
92. Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23–24):2323–31.
93. Rezanian A, Thomas CH, Branger AB, Waters CM, Healy KE. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *J Biomed Mater Res*. 1997 Oct;37(1):9–19.
94. Shin H, Temenoff JS, Bowden GC, Zygorakis K, Farach-Carson MC, Yaszemski MJ, et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and beta-glycerol phosphate. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3645–54.
95. Martino MM, Briquez PS, Güç E, Tortelli F, Kilarski WW, Metzger S, et al. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science*. 2014 Feb;343(6173):885–8.
96. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(32):5561–71.
97. Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Nov 1;75(2):249–55.
98. Lee J-Y, Choo J-E, Park H-J, Park J-B, Lee S-C, Jo I, et al. Injectable gel with synthetic collagen-binding peptide for enhanced osteogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May;357(1):68–74.
99. Shin MK, Kim M-K, Bae Y-S, Jo I, Lee S-J, Chung C-P, et al. A novel collagen-binding peptide promotes osteogenic differentiation via Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II/ERK/AP-1 signaling pathway in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Signal*. 2008 Apr;20(4):613–24.
100. Lee J-Y, Choo J-E, Choi Y-S, Park J-B, Min D-S, Lee S-J, et al. Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(29):4257–67.
101. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater*. 2012 Apr;8(4):1401–21.
102. Andrades JA, Narváez-Ledesma L, Cerón-Torres L, Cruz-Amaya AP, López-Guillén D, Mesa-Almagro ML, et al. Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials.

2013; Available from: <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/bone-engineering-a-matter-of-cells-growth-factors-and-biomaterials>

103. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 Sep;58(2):197–208.
104. Nyberg E, Holmes C, Witham T, Grayson WL. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res.* 2016 Apr;6(2):184–94.
105. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, et al. Biomaterials for craniofacial bone engineering. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1187–95.
106. He X, Dziak R, Yuan X, Mao K, Genco R, Swihart M, et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects. *PloS One.* 2013;8(4):e60473.
107. Zaidi N, Nixon AJ. Stem cell therapy in bone repair and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1117:62–72.
108. Wang XX, Allen RJ, Tutela JP, Sailon A, Allori AC, Davidson EH, et al. Progenitor cell mobilization enhances bone healing by means of improved neovascularization and osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Aug;128(2):395–405.
109. Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant.* 2012;21(8):1667–77.
110. 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 Lond Engl.* 2004 Sep;364(9436):766–70.
111. McDowell F. Plastic surgery in the twentieth century. *Ann Plast Surg.* 1978 Mar;1(2):217–24.
112. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature.* 2014 Mar;507(7492):323–8.
113. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jul;86–A(7):1541–58.
114. Yousefi A-M, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem Cells Int [Internet].* 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4736569/>

115. Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*. 2002 Dec;23(23):4437–47.
116. Platt JL. The immunological barriers to xenotransplantation. *Crit Rev Immunol*. 1996;16(4):331–58.
117. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001 Jun;105(7):829–41.
118. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul;292(5819):154–6.
119. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634–8.
120. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*. 2001 Jun;22(3):149–64.
121. Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Dev Camb Engl*. 1991 Feb;111(2):259–67.
122. Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res*. 2001 Aug;305(2):171–6.
123. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci*. 1997 Jun;110 (Pt 11):1279–85.
124. Dani C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs*. 1999;165(3–4):173–80.
125. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett*. 2001 May;497(1):15–9.
126. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2001 Feb;7(1):89–99.
127. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr;284(5411):143–7.
128. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):463–77.

129. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*. 2000 Jun;21(11):1145–53.
130. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. 1999 Jan;65(1):22–6.
131. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
132. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000 Feb;287(5457):1433–8.
133. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997 Apr;276(5309):66–71.
134. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):778–84.
135. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*. 2002 Sep;69(6):880–93.
136. Polak J, Mantalaris S, Harding SE. *Advances in Tissue Engineering*. World Scientific; 2008. 947 p.
137. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381–90.
138. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230–47.
139. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393–403.
140. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641–50.
141. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13(1):81–8.
142. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):278–94.
143. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994 Jul;21(3):429–35.

144. Habibovic P, Valk CM van der, Blitterswijk CA van, Groot K de, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr ;15(4):373–80.
145. Ripamonti U, Klar RM, Renton LF, Ferretti C. Synergistic induction of bone formation by hOP-1, hTGF-beta3 and inhibition by zoledronate in macroporous coral-derived hydroxyapatites. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(25):6400–10.
146. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res*. 2001 May;58(3):270–6.
147. Khan YM, Katti DS, Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun 15;69(4):728–37.
148. Barbieri D, Renard AJS, de Bruijn JD, Yuan H. Heterotopic bone formation by nano-apatite containing poly(D,L-lactide) composites. *Eur Cell Mater*. 2010 Jun 5;19:252–61.
149. Khan YM, Katti DS, Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun 15;69(4):728–37.
150. Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: Part I. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(2):619–30.
151. El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2005 Jan;2(1):87–101.
152. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 (Suppl 3):S20-27.
153. Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Dec;9(12):723–6.
154. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
155. 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.
156. Fathi E, Farahzadi R. Enhancement of osteogenic differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by zinc sulphate under electromagnetic field via the PKA, ERK1/2 and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *PloS One*. 2017;12(3):e0173877.

157. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6):641–8.
158. Inserm "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste". [Internet]. Available from: http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/1863/MS_2001_12_1252.pdf
159. Panek M, Marijanović I, Ivković A. Stem cells in bone regeneration. *Period Biol*. 2015 Mar ;117(1):177–84.
160. Tenenbaum HC, Heersche JN. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*. 1985 Nov;117(5):2211–7.
161. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):117.
162. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006 May;24(5):1294–301.
163. Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER, Leavitt T, Flacco JS, Hu MS, et al. Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Rev*. 2016 Oct;12(5):524–9.
164. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):463–77.
165. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):463–77.
166. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1992 Feb;7(2):235–46.
167. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):117.
168. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, et al. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int*. 2003 May;72(5):537–47.

169. Rodrigues TL, Nagatomo KJ, Foster BL, Nociti FH, Somerman MJ. Modulation of phosphate/pyrophosphate metabolism to regenerate the periodontium: a novel in vivo approach. *J Periodontol*. 2011 Dec;82(12):1757–66.
170. Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*. 2011 Jun;48(6):1409–16.
171. KATO RB, ROY B, DE OLIVEIRA FS, FERRAZ EP, DE OLIVEIRA PT, KEMPER AG, et al. Nanotopography Directs Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast Lineage through Regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 Circuit. *J Cell Physiol*. 2014 Nov;229(11):1690–6.
172. Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res*. 2003;44 (Suppl 1):85–91.
173. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Jun;84–A(6):1032–44.
174. Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C, Rederstorff E, Masson M, Lesoeur J, et al. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2012 Mar;30(3):471–80.
175. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop*. 1991 Feb;(263):30–48.
176. Marx RE, Ehler WJ, Peleg M. “Mandibular and facial reconstruction” rehabilitation of the head and neck cancer patient. *Bone*. 1996 Jul;19(1 Suppl):59S–82S.
177. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004 Aug 9;4(8):743–65.
178. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing. *Injury*. 2011 Aug;42(8):833–7.
179. Urist MR, Strates BS. The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 2009 Dec;467(12):3051–62.
180. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83–A (Suppl 1, (Pt 1)):S1-6.
181. Edgar CM, Chakravarthy V, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone*. 2007 May;40(5):1389–98.

182. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Aug;85-A(8):1544–52.
183. Arnsdorf EJ, Tummala P, Jacobs CR. Non-canonical wnt signaling and N-Cadherin related β -Catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 Apr 29;4(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2670536/>
184. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJJ, Löwik CWGM, van Bezooijen RL. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 (Suppl 1):31–5.
185. Swolin D, Brantsing C, Matejka G, Ohlsson C. Cortisol decreases IGF-I mRNA levels in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol*. 1996 Jun;149(3):397–403.
186. Birnbaum RS, Bowsher RR, Wiren KM. Changes in IGF-I and -II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J Endocrinol*. 1995 Feb;144(2):251–9.
187. Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB, Levinovitz A, Norstedt G. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int*. 1993 Sep;53(3):201–5.
188. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev*. 1998 Feb;19(1):55–79.
189. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1992 Jun;200(2):165–70.
190. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, et al. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res*. 2008 Sep;23(9):1519–28.
191. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Dev Camb Engl*. 1999 Mar;126(6):1149–59.
192. Zelzer E, Olsen BR. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol*. 2005;65:169–87.
193. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006 Aug;126(4):677–89.
194. Müller P, Langenbach A, Kaminski A, Rychly J. Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PloS One*. 2013;8(7):e71283.

195. Song F, Jiang D, Wang T, Wang Y, Lou Y, Zhang Y, et al. Mechanical Stress Regulates Osteogenesis and Adipogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells through PI3K/Akt/GSK-3 β / β -Catenin Signaling Pathway. *BioMed Res Int* [Internet]. 2017;2017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5329655/>
196. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater*. 2007 Dec;6(12):997–1003.
197. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):483–95.
198. Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, Reilly GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2010 Sep;5(5):713–24.
199. Chen JC, Jacobs CR. Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Sep;4(5):107.
200. Wang Y, Van Manh N, Wang H, Zhong X, Zhang X, Li C. Synergistic intrafibrillar/extrafibrillar mineralization of collagen scaffolds based on a biomimetic strategy to promote the regeneration of bone defects. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2053–67.
201. Rauh J, Milan F, Günther K-P, Stiehler M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Aug;17(4):263–80.
202. Polini A, Pisignano D, Parodi M, Quarto R, Scaglione S. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PloS One*. 2011;6(10):e26211.
203. Rodríguez-Lozano F-J, Insausti C-L, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M-C, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov;17(6):e1062–7.
204. Chuenjitkuntaworn B, Osathanon T, Nowwarote N, Supaphol P, Pavasant P. The efficacy of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Jan;104(1):264–71.
205. Sanz AR, Carrión FS, Chaparro AP. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering. *Periodontol 2000*. 2015 Feb;67(1):251–67.
206. Grayson WL, Fröhlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb;107(8):3299–304.

207. Grayson WL, Bhumiratana S, Grace Chao PH, Hung CT, Vunjak-Novakovic G. Spatial regulation of human mesenchymal stem cell differentiation in engineered osteochondral constructs: effects of pre-differentiation, soluble factors and medium perfusion. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 May;18(5):714–23.
208. Jaasma MJ, O'Brien FJ. Mechanical stimulation of osteoblasts using steady and dynamic fluid flow. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jul;14(7):1213–23.
209. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
210. Lee J-Y, Choi M-H, Shin E-Y, Kang Y-K. Autologous mesenchymal stem cells loaded in Gelfoam(®) for structural bone allograft healing in rabbits. *Cell Tissue Bank*. 2011 Nov;12(4):299–309.
211. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop*. 2005 Jun;(435):62–8.
212. Nather A, David V, Teng JWH, Lee CW, Pereira BP. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med Singapore*. 2010 Aug;39(8):599–606.
213. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 May;105(5):e14-24.
214. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Sep;106(3):356–362; discussion 363.
215. Raposo-Amaral CE, Bueno DF, Almeida AB, Jorgetti V, Costa CC, Gouveia CH, et al. Is bone transplantation the gold standard for repair of alveolar bone defects? *J Tissue Eng*. 2014;5:2041731413519352.
216. Yu B-H, Zhou Q, Wang Z-L. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat. *J Biomater Appl*. 2014 Aug;29(2):243–53.
217. Khorsand A, Eslaminejad MB, Arabsolghar M, Paknejad M, Ghaedi B, Rokn AR, et al. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J Oral Implantol*. 2013 Aug;39(4):433–43.
218. Park J-C, Oh S-Y, Lee J-S, Park S-Y, Choi E-Y, Cho K-S, et al. In vivo bone formation by human alveolar-bone-derived mesenchymal stem cells obtained during implant

- osteotomy using biphasic calcium phosphate ceramics or Bio-Oss as carriers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Apr;104(3):515–24.
219. Yu B-H, Zhou Q, Wang Z-L. Comparison of tissue-engineered bone from different stem cell sources for maxillary sinus floor augmentation: a study in a canine model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jun;72(6):1084–92.
 220. Feng W, Lv S, Cui J, Han X, Du J, Sun J, et al. Histochemical examination of adipose derived stem cells combined with β -TCP for bone defects restoration under systemic administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Sep;54:133–41.
 221. Zhou J, Lin H, Fang T, Li X, Dai W, Uemura T, et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1171–9.
 222. Qiao P, Wang J, Xie Q, Li F, Dong L, Xu T. Injectable calcium phosphate-alginate-chitosan microencapsulated MC3T3-E1 cell paste for bone tissue engineering in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Dec 1;33(8):4633–9.
 223. Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, et al. A comparison between the efficacy of Bio-Oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J*. 2012 Feb;35(1):28–37.
 224. Kim S-H, Kim K-H, Seo B-M, Koo K-T, Kim T-I, Seol Y-J, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1815–23.
 225. Liao H-T, Chen Y-Y, Lai Y-T, Hsieh M-F, Jiang C-P. The osteogenesis of bone marrow stem cells on mPEG-PCL-mPEG/hydroxyapatite composite scaffold via solid freeform fabrication. *BioMed Res Int*. 2014;2014:321549.
 226. Pang L, Hao W, Jiang M, Huang J, Yan Y, Hu Y. Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic-co-glycolic acid/ β -tricalciumphosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells. *Indian J Orthop*. 2013 Jul;47(4):388–94.
 227. James AW, Levi B, Nelson ER, Peng M, Commons GW, Lee M, et al. Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*. 2011 Mar;20(3):427–39.
 228. Konopnicki S, Sharaf B, Cory Resnick, Patenaude A, Pogal-Sussman T, Hwang K-G, et al. Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed β -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: an in vivo pilot study in a porcine mandible model. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2015 May;73(5):1016.e1-1016.e11.

229. Prosecká E, Rampichová M, Litvinec A, Tonar Z, Králíčková M, Vojtová L, et al. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Feb;103(2):671–82.
230. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, et al. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Aug;108(2):e1-6.
231. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 2012 Jan;40(1):2–7.
232. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Aug;106(2):203–9.
233. Rickert D, Sauerbier S, Nagursky H, Menne D, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Mar;22(3):251–8.
234. Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, et al. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery*. 2011 Jun;68(6):1535–40.
235. Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, Okazaki Y. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodont Rest Dent*. 2005 Apr;25(2):129–37.
236. Kaigler D, Avila-Ortiz G, Travan S, Taut AD, Padial-Molina M, Rudek I, et al. Bone engineering of maxillary sinus bone deficiencies using enriched CD90+ Stem cell therapy: a randomized clinical trial. *J Bone Miner Res*. 2015 Jul;30(7):1206–16.
237. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, et al. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue Eng Part A*. 2008 Oct;14(10):1699–707.
238. Tare RS, Kanczler J, Aarvold A, Jones AMH, Dunlop DG, Oreffo ROC. Skeletal stem cells and bone regeneration: translational strategies from bench to clinic. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2010 Dec;224(12):1455–70.
239. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar;13:1–10.

240. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-Maxillo-fac Surg.* 2002 Apr;30(2):97–102.
241. Guo MZ, Xia ZS, Lin LB. The mechanical and biological properties of demineralised cortical bone allografts in animals. *J Bone Joint Surg Br.* 1991 Sep;73(5):791–4.
242. Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1991 Sep;73(8):1123–42.
243. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Apr;76(4):1828–32.
244. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H, Morad G, Dashti SG, Behnia H, et al. Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: a preliminary study in rabbit. *J Oral Implantol.* 2013 Feb;39(1):3–13.
245. Suzuki O, Imaizumi H, Kamakura S, Katagiri T. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Curr Med Chem.* 2008;15(3):305–13.
246. Hao W, Pang L, Jiang M, Lv R, Xiong Z, Hu Y-Y. Skeletal repair in rabbits using a novel biomimetic composite based on adipose-derived stem cells encapsulated in collagen I gel with PLGA-beta-TCP scaffold. *J Orthop Res.* 2010 Feb;28(2):252–7.

F. Table des abréviations

CSM : Cellules souches mésenchymateuses
ITO : ingénierie tissulaire osseuse
MO : moelle osseuse
MOT : moelle osseuse totale
MOCA : moelle osseuse concentrée autologue
PRP : plasma rich platelet
TNF- α : tumor necrosis factor
TGF- β : transforming growth factor beta
PDGF : platelet derived growth factor
VEGF : vascular endothelial growth factor
FGF : fibroblast growth factor
IGF : insulin growth factor
IL : interleukine
BMP : bone morphogenetic protein
CaP : calcium phosphate
HA : hydroxyapatite
 β -TCP : β -tricalcium phosphate
BCP : biphasic calcium phosphate
PCL : polycaprolactone
PLA : acide polylactide
PGA : acide polyglycolique
CBCT : cone beam computed tomography

G. Tables des illustrations

Figure 1 : Représentation des différentes phases de la réparation d'une fracture osseuse	5
Figure 2 : Illustration d'un comblement osseux d'une fente palatine à l'aide d'un biomatériau	9
Figure 3 : Illustration d'une résorption osseuse suite à une extraction dentaire et son comblement permettant la mise en place d'un implant dentaire	10
Figure 4 : Principe de base de l'ingénierie tissulaire	13
Figure 5 : Propriétés de la matrice idéale pour l'ingénierie tissulaire osseuse	15
Figure 6 : : Illustration schématique des facteurs impliqués dans les interactions cellules/matériaux (propriétés de surface et bio-fonctionnalisation)	22
Figure 7 : Les différentes stratégies d'incorporation des facteurs de croissance	28
Figure 8 : Les différentes stratégies permettant de vasculariser les construits cellules/matrices en ingénierie tissulaire osseuse.....	30
Figure 9 : Les potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire.....	34
Figure 10 : Facteurs de contrôle et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses.....	37
Figure 11 : Les différents marqueurs retrouvés dans la phase de maturation de différenciation ostéogénique.....	38
Figure 12 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses à travers 3 étapes pendant 21 jours.....	39
Figure 13 : Mode d'action de la dexaméthasone et de l'acide ascorbique lors de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses	41
Figure 14 : Les facteurs physiques régulant la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (a : forme cellulaire, b : contraintes mécaniques externes, c : matrice extracellulaire, d : Structures géométriques	47
Figure 15 : Illustration de différents systèmes de bioréacteurs pour la culture cellulaire (a :Récipient rotationnel, b : bioréacteur avec agitation magnétique, c : Chambre de perfusion, d : Chambre de compression)	49

H. Liste des tableaux

Tableau 1 : Les facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire osseuse	25
Tableau 2 : Avantages et inconvénients de certaines sources de cellules souches utilisées en'ingénierie tissulaire osseuse	35
Tableau 3 : Critères minimaux définissant les cellules souches mésenchymateuses humaines...	36
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études précliniques utilisant des cellules souches et des matériaux dans la reconstruction osseuse.....	55
Tableau 5 : tableau récapitulatif des études humaines en ingénierie tissulaire osseuse	59

BAROTH (Serge). Cellules souches mésenchymateuses et biomatériaux : intérêt en médecine régénératrice osseuse oro-faciale. Du laboratoire à la clinique. 90 f. ; tabl. ; 246 ref. ; 30 cm (Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2017)

RESUME

Suite à des pertes de substance osseuse et dont le comblement ne peut intervenir spontanément du fait des seules capacités physiologiques du patient, plusieurs stratégies sont envisagées. L'une des plus prometteuses, l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO), propose de régénérer un nouveau tissu fonctionnel à partir de cellules souches mésenchymateuses, de matrices et signaux chimiques et/ou biologiques. Ce travail, basé sur la revue de la littérature, résume les études animales et humaines les plus pertinentes en ITO et plus particulièrement celles en relation avec la sphère oro-faciale. L'objectif principal est d'évaluer et quantifier les paramètres favorables à la repousse osseuse.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Ingénierie tissulaire

MOTS CLES MESH

Ingénierie tissulaire Tissue engineering
Cellules souches Stem cells
Matériau biocompatible Biocompatible material
Etudes cliniques Clinical studies

JURY

Président : M. le Professeur Weiss P.
Directeur : M. le Professeur Lesclous P.
Assesseur : M. le Docteur Badran Z.
Assesseur : M. le Docteur Struillou X.
Invité : M. le Docteur Daculsi G.

ADRESSE DE L'AUTEUR

20 boulevard des anglais 44100 Nantes
sergebaroth@gmail.com