



HAL
open science

Cellules médullaires et biomatériaux implantables en site osseux

Aline Dumas

► **To cite this version:**

Aline Dumas. Cellules médullaires et biomatériaux implantables en site osseux. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00433829

HAL Id: tel-00433829

<https://theses.hal.science/tel-00433829>

Submitted on 20 Nov 2009

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

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

Cellules médullaires et biomatériaux implantables en site osseux

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 19 février 2008

à : Angers

par : Aline DUMAS

Devant le jury ci-dessous :

Romain GHERARDI, rapporteur, Professeur des Universités, Paris XII

Eric AGUADO, rapporteur, Maître de Conférence Universitaire, Nantes

Philippe MASSIN, examinateur, Professeur des Universités, Angers

Daniel CHAPPARD, examinateur, Professeur des Universités, Angers

Directeur : **Marie-Françoise MOREAU**, Maître de Conférence Universitaire, Angers

INSERM, U922 « Remodelage osseux et Biomatériaux »

Laboratoire d'Histologie-Embryologie, UFR Médecine

1, rue Haute de Reculée - 49045 Angers

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire INSERM, U922 « Remodelage osseux et biomatériaux » de la faculté de Médecine d'Angers.

Au moment où il s'achève, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux qui, par leur aide directe ou indirecte, ont rendu sa réalisation possible.

A Mademoiselle Marie-Françoise MOREAU

Je vous remercie d'avoir été ma directrice de thèse. Merci pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre accompagnement de tous les jours. Votre bonne humeur générale et votre jovialité ont été très appréciables.

A Monsieur le Pr Daniel CHAPPARD

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de votre laboratoire. Je vous remercie particulièrement pour avoir toujours répondu à mes questions et corrigé mon travail. Vos conseils et votre compétence scientifique m'ont été d'une aide précieuse. Soyez assuré de toute ma reconnaissance d'avoir accepté de faire parti de ce jury de thèse.

A Messieurs les Professeurs Romain GHERARDI et Eric AGUADO

Qu'il me soit permis de vous témoigner ma profonde gratitude d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je vous remercie du temps que vous m'avez consacré et de vos questions et remarques qui ont amélioré mon manuscrit et affuté ma réflexion.

Professeur Ghérardi, veuillez recevoir mes sincères remerciements pour nous avoir aimablement donné la lignée de « souris vertes » et les conseils relatifs. La collaboration avec l'équipe de l'EMI 0011 fut fructueuse, emplie de partage de connaissances.

A Monsieur le Pr Philippe MASSIN

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Pr Michel-Félix BASLÉ

Je vous remercie de tout l'intérêt que vous avez porté à mes recherches et mes projets professionnels. Recevez toute ma gratitude.

A Monsieur le Pr Alain MOREL et Madame le Pr Claudia MONTERO-MENEI

Vous m'avez guidée, accompagnée et soutenue durant ces trois années de monitorat. Les enseignements que vous m'avez confiés et les conseils que vous m'avez prodigués m'ont permis de commencer avec confiance mon expérience professionnelle dans l'enseignement. Je vous remercie et vous suis profondément reconnaissante.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire U922 qui m'ont chaleureusement accueilli et soutenu tout au long de cette thèse :

A Christine, qui m'a tant appris à mon arrivée ! Ta compétence, ta disponibilité et ta gentillesse m'ont permis de surmonter bien des étapes. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et d'avoir travaillé avec toi.

A Florence, pour son incontestable compétence technique. Merci pour les services rendus. Je n'oublierai pas les moments passés au Raman.

A Robert, pour son aide et son soutien. Merci pour tous tes précieux conseils et les longues conversations à la pause-café.

A Laurence, pour son professionnalisme, son dynamisme et sa bonne humeur. Merci pour ton aide et tes conseils.

A Johanne et Hervé, de m'avoir accompagnée pendant la dernière année de ma thèse qui n'est pas la plus facile. Merci pour votre bonne humeur. Je vous souhaite bonne chance pour la suite. Que vos projets professionnels se concrétisent.

A Hélène, pour m'avoir fait part de ton expérience. Je te souhaite bonne chance pour l'avenir et tes concours.

A Sonia et Romain, je suis heureuse de vous avoir connus. Merci pour votre participation à la bonne humeur du laboratoire. Bonne continuation.

Je tiens également à remercier les autres personnes qui ont rendu ce travail possible :

A Yves Gallois pour m'avoir apportée son aide technique en biochimie. J'ai beaucoup appréciée votre accessibilité et votre gentillesse. Merci pour vos encouragements.

A Nadine et Guénaëlle pour leur précieuse aide pour l'acquisition des résultats de microtomographie-X.

A Pierre, Jérôme et Dominique pour leur accueil et leurs conseils à l'animalerie.

Laurent, personne n'a oublié ta participation à la vie du laboratoire. Merci d'avoir toujours pris de mes nouvelles. Bon courage pour tes nouvelles fonctions.

A ceux qui sont déjà partis :

Guillaume et Stéphane, qui m'ont ouvert la voie pour cette fin de thèse. Vous m'avez été d'une aide précieuse dans tous les tracas du quotidien d'un thésard. Que vos projets professionnels et autres se concrétisent.

Fanny, Ludivine et Nicolas. Bonne continuation.

A ma famille :

A ma mère, qui m'a toujours soutenue et encouragée tout le long de mes années d'étude. Tu as toujours su m'exprimer ta fierté.

A mon frère qui ne dit rien mais est là. Je sens que tu es toujours près de moi. Merci.

En ce jour, je partage avec vous les pensées et l'amour envers cet être qui nous manque.

A toi **Eric**, pour ton Amour et ton soutien de tous les jours. Je te remercie de me soutenir dans mes projets professionnels. Je crois en nos projets, que notre bonheur continu.

A tous, ceux qui de près ou de loin, ont eu une pensée pour moi lors de la rédaction de ce travail.

A ma fille Norah,

Tu m'as comprise, je t'en remercie

A toutes celles et ceux qui me sont chers

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	8

INTRODUCTION **10**

I. CELLULES ET MICROENVIRONNEMENT OSSEUX **14**

1. LES CELLULES OSSEUSES	14
2. LES CELLULES SOUCHES DE LA MËLLE OSSEUSE	17
2.1. Définitions	17
2.2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)	18
2.2.1. <i>Caractérisation</i>	18
2.2.2. <i>Auto-renouvellement et différenciation : notion de niche biologique des CSH</i>	19
2.2.4. <i>Utilisations thérapeutiques</i>	21
2.3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	21
2.3.1. <i>Généralités</i>	21
2.3.2. <i>Hétérogénéité des CSM</i>	22
2.3.3. <i>Phénotype</i>	23
2.3.4. <i>CSM et microenvironnement</i>	23
2.3.4. <i>Potentiels de différenciation</i>	24
2.3.3. <i>Utilisations thérapeutiques</i>	24
2.4. Les Multipotent Adult progenitor cells (MAPCs)	26
2.5. Les précurseurs endothéliaux	26
2.6. Précurseurs des péricytes et péricytes	27
2.7. Les autres (MIAMI, TCSC, RS-1)	28

II. THERAPIES CELLULAIRES POUR LA REPARATION DU TISSU OSSEUX **31**

1. LA REPARATION DU TISSU OSSEUX	31
1.1. La régénération spontanée	31
1.2. Les greffes osseuses et autres substituts	33

1.2.1. <i>Les greffes osseuses</i>	33
1.2.2. <i>Les autres substituts osseux</i>	35
▪ Les matériaux naturels	35
▪ Les métaux	36
▪ Les céramiques	36
▪ Les polymères	37
1.3. Problèmes cliniques	38
2. TRANSLANTATION DE MÛELLE OSSEUSE	38
2.1. Généralités	38
2.2. Nouvelles applications thérapeutiques de la transplantation de moelle osseuse : traitement des maladies des CSM	39
2.3. Le conditionnement : l'irradiation corporelle totale	40
2.3.1. <i>Principes</i>	41
2.3.2. <i>Les effets de la radiothérapie sur le tissu osseux</i>	41
3. INGENIERIE TISSULAIRE	44
3.1. Définitions	44
3.2. Applications thérapeutiques	46
3.3. Les biomatériaux	47
3.4. Les cellules ostéogéniques	48
3.4.1. <i>Les autres sources de cellules ostéogéniques</i>	48
▪ Les cellules adhérentes du sang	49
▪ Les CSM du muscle	49
▪ Les CSM du tissu adipeux	49
3.4.2. <i>Différenciation ostéogénique</i>	50
3.5. Les facteurs de croissance	51
3.6. Méthodes	52
III. MODELES D'ETUDES PRECLINIQUES	55
1. MODELES ANIMAUX DE DEFICIT OSSEUX	55
1.1. Le crâne	55
1.2. Les os longs	56
2. MARQUEURS DES CELLULES GREFFEES (TRANSPLANTEES)	57
2.1. Les chromosomes X et Y – hybridation <i>in situ</i>	57
2.2. La β -galactosidase (β -gal)	58
2.3. Colorants vitaux	59

TRAVAUX PERSONNELS **62**

ARTICLE 1.....63

ARTICLE 2.....73

ARTICLE 3.....112

ARTICLE 4.....136

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **170**

REFERENCES **175**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 :* Rôle des cellules stromales/ostéoblastes dans l'ostéoclastogénèse.
- Figure 2 :* Mécanismes de régulation du remodelage osseux.
- Figure 3 :* Schématisation du contrôle des CSH par les ostéoblastes au sein de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse.
- Figure 4 :* Culture primaire de cellules de moelle osseuse de souris observées au microscope à contraste de phase.
- Figure 5 :* Schématisation du principe de l'ingénierie tissulaire.
- Figure 6 :* Illustration de la formation osseuse au niveau d'un biomatériau implanté avec des cellules ostéogéniques d'après Muschler *et coll*, 2004.
- Figure 7 :* Mise en évidence des chromosomes X (rouge) et Y (vert) par FISH après implantation de cellules de moelle osseuse dans un défaut au niveau du crâne de souris.
- Figure 8 :* Détection immunologique de la β -galactosidase sur coupe histologique de fémur de souris irradiée et transplantée avec de la moelle osseuse de souris Rosa26.
- Figure 9 :* Diverses applications de l'utilisation de la GFP comme traceur de cellules.
- Table 1 :* Principales cellules souches présentes dans la moelle osseuse : différentes conditions d'isolement et de culture.

ARTICLE 1 :

- Figure 10 :* Etapes de préparation des allogreffes avant leur purification selon les différents procédés.
- Figure 11 :* Schéma synoptique des différentes étapes des procédés de purification étudiés. Six groupes d'étude ont été constitués.
- Figure 12 :* Analyses de la qualité des allogreffes osseuses humaines issues d'un même patient après purification au NaHCO_3 et aux H_2O_2 et NaOH combinés.
- Figure 13 :* Analyses morphologiques et structurales de la surface des allogreffes osseuses humaines issues d'un même patient, après purification au NaHCO_3 et aux H_2O_2 et NaOH combinés.
- Figure 14 :* Test de quantification de cellules vivantes au MTT

ARTICLE 2 :

- Figure 15:* Protocole d'élaboration *in vitro* des constructions matrice/cellules pour la réparation de lacunes au niveau du crâne de souris.
- Figure 16 :* Photographie du dispositif expérimental pour la création du défaut de taille critique au niveau du crâne de la souris.
- Figure 17 :* Photographie du défaut osseux réalisé au niveau du crâne de la souris.
- Figure 18 :* Analyses histologiques des greffons 8 semaines après leur implantation.
- Figure 19 :* Méthode d'analyse histomorphométrique pour la mesure des volumes osseux greffés et néoformés.
- Figure 20 :* Quantification de la régénération osseuse par histomorphométrie.

ARTICLE 3 :

Figure 21 : Photo et principe du FACS.

Figure 22 : Histogramme représentant l'ensemble des cellules adhérentes de la moelle osseuse de souris analysées par FACS selon le marquage du CD11b.

Figure 23 : Coloration cytoenzymologique de l'AlkP des cellules adhérentes de moelle osseuse de souris transgéniques pour la GFP, non triées (totales) ou après sélection des cellules CD11b⁻, observées en lumière transmise (A) ou en fluorescence (B).

ARTICLE 4 :

Figure 24 : Schéma du protocole expérimental de transplantation de moelle osseuse chez la souris.

Figure 25 : Masses osseuses et paramètres tridimensionnels du réseau trabéculaire mesurés par microtomographie à rayons X.

Figure 26 : Caractéristiques de l'os cortical des diaphyses fémorales mesurées par microtomographie à rayons X.

Figure 27 : Photographies de microscopie à fluorescence montrant la localisation des cellules GFP⁺ au niveau des fémurs des souris T^{GFP}B6.

LISTE DES ABBREVIATIONS

β -gal	β -galactosidase
β -GP	β -glycérophosphate
AlkP	Phosphatase Alcaline
B.Dm	Bone diameter
B6	Lignée de souris C57Bl/6
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
BMT	Bone Marrow Transplantation
BV/TV	Trabecular bone volume
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM	Cellules Souches Méenchymateuses
CSMI	Cross Sectional Moment of Inertia
Ct.Ar	Cortical Area
Ct.Th	Cortical Thickness
Dex	déxaméthasone
FACS	Fluorescent Activating Cell Sorting
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA	Hydroxypapatite
HLA	Human Leukocyte Antigen
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukines
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cell
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor

MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MIAMI cells	Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible cells
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Chlorure de sodium (9%: sérum physiologique)
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
PCE	Précurseurs des cellules endothéliales
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
RANK	Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
RANKL	Ligand for Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
RS cells	Recycling Stem cells
SMI	Structure Model Index
Tb.N	Trabecular number
Tb.P _f	Trabecular pattern factor
Tb.Sp	Trabecular separation
Tb.Th	Trabecular thickness
TBI	Total Body Irradiation
TCSC	Tissue Committed Stem Cells
TGF	Transforming Growth Factor
TMO	Transplantation de Moëlle Osseuse
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRAcP	Phosphatase Acide Tartrate Résistante
VEGF	Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Le tissu osseux a un rôle essentiel pour l'organisme. Il assure une fonction mécanique, supportant le poids du corps et les diverses contraintes mécaniques engendrées à chaque mouvement. Sa constitution biochimique et son organisation architecturale lui confèrent ses propriétés d'élasticité et de résistance mécanique. Le tissu osseux possède une fonction métabolique : 99% du calcium et 90% du phosphore se trouvent au niveau du squelette. Par son remodelage permanent, il libère ou stock des sels minéraux, participant ainsi au contrôle du métabolisme phosphocalcique. Le tissu osseux abrite la moëlle osseuse. Celle-ci est localisée au niveau des diaphyses des os longs et dans les espaces médullaires délimités par les travées du tissu osseux trabéculaire des épiphyses ainsi que dans les os plats. La moëlle osseuse est le siège de l'hématopoïèse : elle contient les précurseurs des cellules sanguines (cellules souches hématopoïétiques, CSH) soutenues par un tissu stromal composé de nombreuses cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, fibres musculaires lisses, adipocytes). Le stroma médullaire contient également les cellules souches mésenchymateuses (CSM) à l'origine des principales cellules stromales. Les cellules hématopoïétiques, stromales, et osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) sont étroitement liées et influent les unes sur les autres. Les interactions se font par contact cellule/cellule ou cellule/matrice ou par l'intermédiaire de facteurs locaux (facteurs de croissance et cytokines) et hormonaux. L'ensemble cellules/facteurs/matrice constitue le microenvironnement osseux, responsable de l'activité concertée et synchrone des ostéoblastes et ostéoclastes, permettant le remodelage du tissu osseux.

Le remodelage osseux consiste en la résorption d'os ancien par les ostéoclastes suivi de son remplacement par une nouvelle unité de structure faite d'une matrice calcifiée formée par les ostéoblastes. Ce processus est le résultat d'un équilibre entre résorption et formation et permet le renouvellement du tissu osseux. Toutes modifications du microenvironnement osseux peuvent amener à une rupture de l'équilibre résorption/formation, à l'origine de nombreuses ostéopathies. Elles peuvent être d'origine métabolique, hormonale ou génétique. Les ostéopathies métaboliques proviennent d'une perturbation des facteurs hormonaux ou d'altérations du microenvironnement osseux induisant le plus fréquemment une hyper-résorption, responsable d'une perte de masse osseuse : c'est le cas de l'ostéoporose. Dans les ostéopathies génétiques, certaines cellules du microenvironnement osseux du patient sont anormales : c'est le cas notamment de l'ostéogenèse imparfaite où il existe une

mutation au niveau du gène codant pour le collagène produit par les ostéoblastes ou de l'ostéopétrose, altération d'un gène induisant une diminution de l'activité des ostéoclastes. Dans ces deux cas, la greffe de moëlle osseuse est une stratégie thérapeutique faisant l'objet d'études cliniques (Horwitz *et coll.* 2001; Tolar *et coll.* 2006).

Le tissu osseux a la remarquable capacité à se régénérer et réparer spontanément une lésion osseuse, comme lors d'une fracture. Cependant, on observe dans 5 à 10% des cas un retard ou une absence de consolidation. Dans certaines pathologies tumorales, infectieuses ou traumatiques, il est nécessaire de réséquer des segments osseux de taille trop importante pour permettre une réparation spontanée. La reconstruction d'un os fonctionnel dans les grandes pertes de substance osseuse demeure problématique. La thérapeutique de choix pourrait être la transplantation, au niveau de la lésion, de cellules ayant un potentiel de différenciation osseuse et préalablement mises en place dans un biomatériau servant de support : il s'agit d'ingénierie tissulaire (Niklason 2000). De nombreuses études précliniques chez l'animal sont encore nécessaires afin d'optimiser le tissu osseux de substitution élaboré, selon la source de cellules, le biomatériau et d'éventuels facteurs bioactifs utilisés, et de démontrer son efficacité dans des modèles mimant au mieux certaines applications cliniques.

Le travail présenté dans cette thèse concerne l'étude préclinique de l'utilisation de cellules médullaires pour la réparation du tissu osseux. Ce domaine regroupe la thérapie des pertes osseuses par hyper-remodelage mais également les déficits de taille importante à réparation non spontanée.

Une première partie sera consacrée à synthétiser les connaissances actuelles sur les cellules de la moëlle osseuse et leur microenvironnement. Nous décrirons les thérapies cellulaires qui peuvent être envisagée pour la réparation du tissu osseux et notamment nous détaillerons les perspectives apportées récemment par l'ingénierie tissulaire. Les modèles animaux et cellulaires utilisés pour les études précliniques seront abordés. La deuxième partie sera consacrée à la présentation, sous forme d'articles, des résultats obtenus. Nous avons évalué la cytocompatibilité d'allogreffes osseuses humaines suite à différents procédés de purification. Un tissu osseux de remplacement a été élaboré par combinaison d'un greffon osseux xénogénique et des cellules stromales médullaires

allogéniques pour la réparation d'un déficit de taille critique au niveau du crâne de souris. L'utilisation d'un modèle de souris transgéniques pour la Green Fluorescent Protein (GFP) nous a permis d'étudier le devenir des cellules de moelle osseuse après implantation en site osseux ou transplantation dans la circulation générale. Les modifications de la masse et de la microarchitecture osseuse de souris irradiées et transplantées seront présentées, Nous vous décrirons la méthode mise au point afin d'isoler les précurseurs ostéoblastiques de la fraction adhérente de la moelle osseuse de souris. Enfin, la troisième partie exposera les conclusions et perspectives de ce travail.

I. CELLULES ET MICROENVIRONNEMENT OSSEUX

1. LES CELLULES OSSEUSES

Les cellules osseuses sont : les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse et les cellules qui en dérivent : les ostéocytes, ostéoblastes emmurés dans la matrice calcifiée et les cellules bordantes, pouvant devenir des ostéoblastes actifs à la suite d'un stimulus et qui recouvrent les surfaces osseuses qui ne sont pas en cours de remodelage.

Les ostéoclastes sont des cellules plurinucléées de 50 à 100 μm de diamètre, localisées sur les surfaces osseuses. Ils ont une origine hématopoïétique, provenant de la prolifération, différenciation et fusion de précurseurs de la lignée monocyte/macrophage. L'ostéoclastogénèse nécessite des interactions étroites entre les précurseurs et les cellules stromales/ostéoblastes (Figure 1). Des co-cultures de cellules stromales et de cellules hématopoïétiques ont permis de montrer qu'un contact cellule/cellule est indispensable à l'induction de l'ostéoclastogénèse (Katagiri et Takahashi 2002). Les trois facteurs clés contrôlant ce processus sont : le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), le ligand RANKL (du récepteur RANK) se trouvant à la surface des cellules stromales et des ostéoblastes et un récepteur soluble, l'ostéoprotégérine (OPG). C'est le rapport OPG/RANKL qui détermine le nombre d'ostéoclastes formés le long des surfaces osseuses, ainsi que leur activité (Simonet *et coll.* 1997). Les marqueurs caractéristiques des ostéoclastes sont, la phosphatase acide tartrate résistante (TRAcP), le récepteur à la calcitonine et la cathepsine K (protéase) (Boyle *et coll.* 2003).

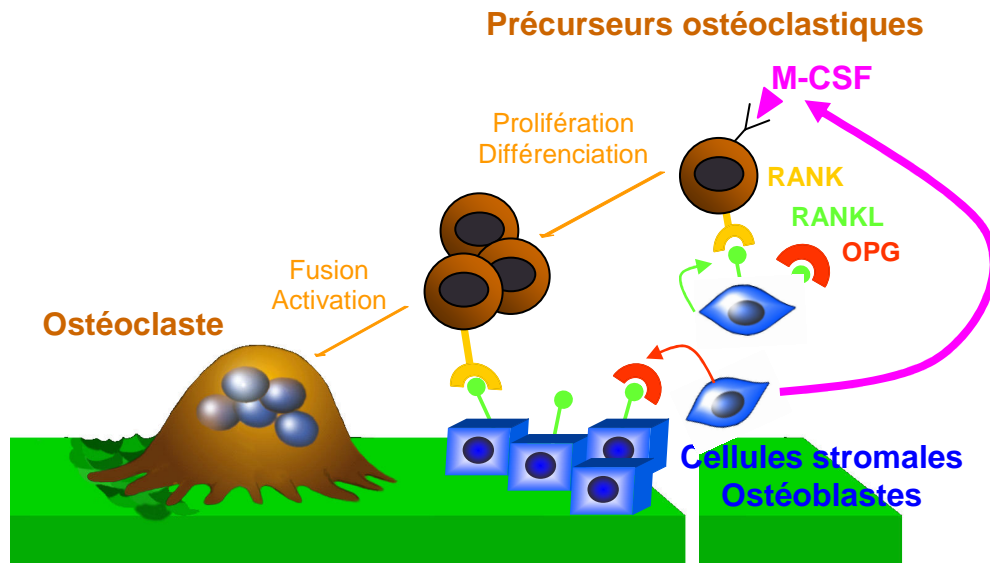


Figure 1 : Rôle des cellules stromales/ostéoblastes dans l'ostéoclastogénèse

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes mononucléées, disposées en couches monocellulaires sur les surfaces osseuses. Ils secrètent et déposent le collagène de type I, protéine majoritaire du tissu osseux mais également les protéines non collagéniques (ostéopontine, ostéocalcine, ostéonectine, sialoprotéine osseuse) et des protéoglycanes (Robey *et coll.* 1993). Les ostéoblastes régulent la formation des cristaux d'hydroxyapatite pour la minéralisation du tissu nouvellement formé (tissu osteoïde) par la sécrétion de la phosphatase alcaline (Alp). Les ostéoblastes sont caractérisés par l'expression de protéines de la matrice extracellulaire osseuse et une forte activité de Alp. La formation du tissu osseux peut se faire par ossification membranaire (au niveau des os du crâne) ou endochondrale (pour les os longs). Dans le cas de l'ossification membranaire, les ostéoblastes proviennent directement de la différenciation de cellules mésenchymateuses (stromales) au niveau d'une condensation du tissu mésenchymateux. Dans l'ossification endochondrale, les cellules mésenchymateuses se différencient dans un premier temps en chondrocytes et forment une pièce cartilagineuse. Les ostéoblastes sont ensuite formés à partir de cellules mésenchymateuses environnantes (Chung *et coll.* 1998). La différenciation des cellules progénitrices en cellules spécifiques d'un tissu est régulée par l'expression de facteurs de transcription tissu-spécifiques. L'expression de Cbfa1/Runx 2, d'ostérix et de β -catenin (voie de signalisation Wnt) est nécessaire pour la différenciation ostéoblastique, suivie par l'expression de nombreux facteurs de transcription régulateurs comme AP-1,

Dlx-5, Msx-2, etc (Marie 2001; Komori 2006). Le contrôle de la formation osseuse fait intervenir des facteurs systémiques (PTH, hormones sexuelles, glucocorticoïdes et vitamine D) et des facteurs locaux (IGF, BMP, TGF- β , FGF), produits par les ostéoblastes eux-mêmes, incorporés dans la matrice nouvellement formée et libérés lors de la résorption, permettant le recrutement, la prolifération et la différenciation des précurseurs (Figure 2).

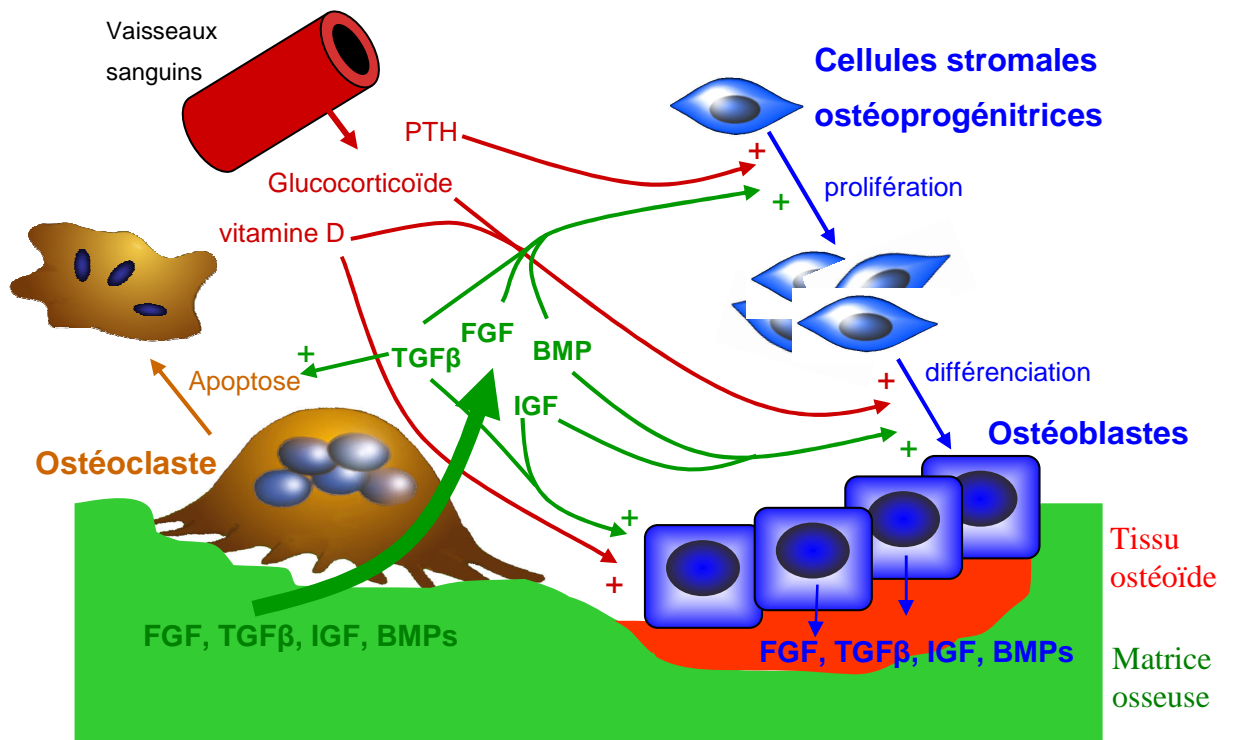


Figure 2 : Mécanismes de régulation du remodelage osseux.

Les ostéocytes sont des cellules emmurées au sein de la matrice osseuse dans de petites logettes (les ostéoplastes) ; ils dérivent des ostéoblastes. Ils sont reliés les uns aux autres, et communiquent avec les cellules bordantes de la surface osseuse, par un système de prolongements cellulaires cheminant dans des canalicules ménagés au sein de la matrice osseuse. Jouant un rôle de mécanorécepteurs, ces cellules exercent une influence importante sur la vitalité des autres cellules osseuses. Il est possible que ce soit l'apoptose des ostéocytes qui constitue le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes sur les surfaces osseuses et la mise en place de la résorption (Knothe Tate *et coll.* 2004).

2. LES CELLULES SOUCHES DE LA MÔELLE OSSEUSE

2.1. Définitions

Le renouvellement permanent de tissus tels la peau, l'intestin et le tissu hématopoïétique laisse présager l'existence de cellules à capacité d'autorenouvellement, dites cellules souches. Leur existence a été démontrée expérimentalement par leur fonction, faute de critères de reconnaissance spécifiques. Les cellules souches sont capables (1) de proliférer, (2) de s'autorenouveler, (3) de créer chez l'embryon ou pérenniser chez l'adulte, la diversité des compartiments fonctionnels d'un tissu, en produisant un large spectre de cellules différenciées (Potten et Loeffler 1990). Ce n'est que depuis une dizaine d'années qu'il a été démontré qu'une cellule souche adulte, nichée dans un tissu donné, pouvait engendrer des cellules différenciées d'un autre tissu ou d'un autre feuillet embryonnaire. Ce sont des expériences de transplantation de cellules purifiées ou à l'état clonal, par voie intraveineuse, à un receveur généralement irradié, qui ont permis de décrire de surprenants « changements de voies » comme : cellules nerveuses → cellules sanguines (Bjornson *et coll.* 1999), cellules de moëlle osseuse → cellules hépatiques (Petersen *et coll.* 1999). Ces observations ont été attribuées à la « plasticité » des cellules souches (Lakshmiathy et Verfaillie 2005), mais ce terme est très controversé car plusieurs mécanismes, comme la fusion cellulaire (Ying *et coll.* 2002) ou l'hétérogénéité des populations cellulaires utilisées, peuvent expliquer les trans-différenciations observées.

Les cellules souches (CS) adultes sont rares et n'expriment aucun marqueur de surface spécifique. Elles partagent certains antigènes (CD34, Thy-1, CD133, Flk-1, Sca-1, c-Kit) qui ne leur sont pas spécifiques. Une des propriétés permettant de distinguer certaines d'entre elles de cellules plus matures, est leur capacité d'exclusion du colorant vital Hoechst 33342 qui se fixe sur les molécules d'ADN, permettant de définir cette population comme une SP (side population) (Goodell *et coll.* 1996; Zhou *et coll.* 2001). Ces cellules SP expulsent le colorant grâce à l'expression de transporteurs de la famille ABC (ATP-binding cassette transporter).

Des CS adultes sont présentes principalement au niveau du cerveau (CS neuronales), de l'intestin, de l'épiderme (CS épithéliales) et de la moëlle osseuse. Les principales CS de la moëlle osseuse sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH) donnant naissance

aux différentes cellules sanguines et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). D'autres CS sont présentes en plus faible quantité dans la moelle osseuse dont certaines n'ont été décrites que très récemment (MAPCs, MIAMI cells, RS-1 cells..).

2.2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

2.2.1. Caractérisation

Les CSH sont les cellules souches adultes les plus étudiées et les plus utilisées en clinique. Leur isolement et caractérisation ont été développés grâce à la technique de FACS (Fluorescence Activated Cell sorting) qui permet la reconnaissance, quantification et séparation de sous-populations cellulaires selon leurs caractéristiques morphologiques ou phénotypiques. Les CSH murines correspondent à la fraction cellulaire négative pour tous les marqueurs spécifiques de la lignée hématopoïétique soit CD11b pour les macrophages et granulocytes, CD3 pour les cellules T, B220 pour les cellules B et Ter-119 pour les globules rouges. La population CD11b⁻, CD3⁻, B220⁻, Ter-119⁻, dite Lin⁻ peut encore être purifiée en CSH par l'expression du stem cell antigen Sca-1, de c-kit et une faible expression de Thy-1. Une seule cellule de cette population c-kit⁺Sca-1⁺lin⁻Thy-1[±] (cellules KSL), injectée à une souris irradiée, peut produire l'ensemble des lymphocytes et des cellules myéloïdes différenciées nécessaires à la restauration définitive d'un statut hématologique normal, mais également des cellules souches capables à leur tour de restaurer le système hématopoïétique d'un receveur secondaire irradié (Osawa *et coll.* 1996). Chez l'homme, la population lin⁻ est enrichie en CSH en sélectionnant la sous-population CD34⁺CD38⁻. La population SP (exclusion de Hoechst) de la moelle osseuse est très enrichie en CSH à potentiel de repopulation à long-terme chez la souris (Goodell *et coll.* 1996) mais constitue chez l'homme une population cellulaire plus hétérogène phénotypiquement et fonctionnellement (Naylor *et coll.* 2005). Des CSH sont également présentes dans le sang circulant (Jansen *et coll.* 2005) et dans le sang du cordon ombilical (Rocha et Gluckman 2006).

2.2.2. Auto-renouvellement et différenciation : notion de niche biologique des CSH

L'auto-renouvellement est la propriété de produire des cellules filles à chaque génération capables des mêmes propriétés de régénération que la cellule mère. Ce potentiel est bien décrit pour les CSH puisque une seule CSH injectée chez un receveur irradié permet une restauration permanente du statut hématologique. L'expansion des CSH *in vitro* est un véritable défi (Sauvageau *et coll.* 2004). Une co-culture avec des cellules stromales ou divers cytokines comme le stem cell factor, la thrombopoïétine, et les interleukines 1, 3, 6 ou 11 n'ont permis qu'un auto-renouvellement limité (Reya 2003). Il est actuellement démontré que les différents potentiels des CSH et des autres CS adultes sont conditionnés par la niche biologique dans laquelle est située la CS *in vivo* (Moore et Lemischka 2006). La niche biologique des CSH est formée par le microenvironnement matriciel et des cellules mésenchymateuses au niveau de la surface endostéale des os longs (Askenasy *et coll.* 2002) (Figure 3). Les ostéoblastes sont directement impliqués dans la niche des CSH par un contact direct cellule/cellule impliquant des molécules d'adhésion (N-cadherine) (Zhang *et coll.* 2003) et le système Notch/Jagged (Calvi *et coll.* 2003) ou par sécrétion de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Arai *et coll.* 2004) et de Wnt (Reya *et coll.* 2003), ligands respectifs du récepteur à la tyrosine kinase-2 (Tie-2) et du récepteur Frizzled. Les protéines matricielles ont également un rôle important dans la niche hématopoïétique comme l'ostéopontine, sécrétée par les ostéoblastes, qui contribue à la migration des CSH dans la région endostéale et inhibe leur prolifération (Nilsson *et coll.* 2005; Stier *et coll.* 2005). De nombreux signaux et événements moléculaires orchestrent la balance quiescence/auto-renouvellement/différenciation des CSH, mais la description de leurs participations respectives nécessite encore de nombreuses investigations.

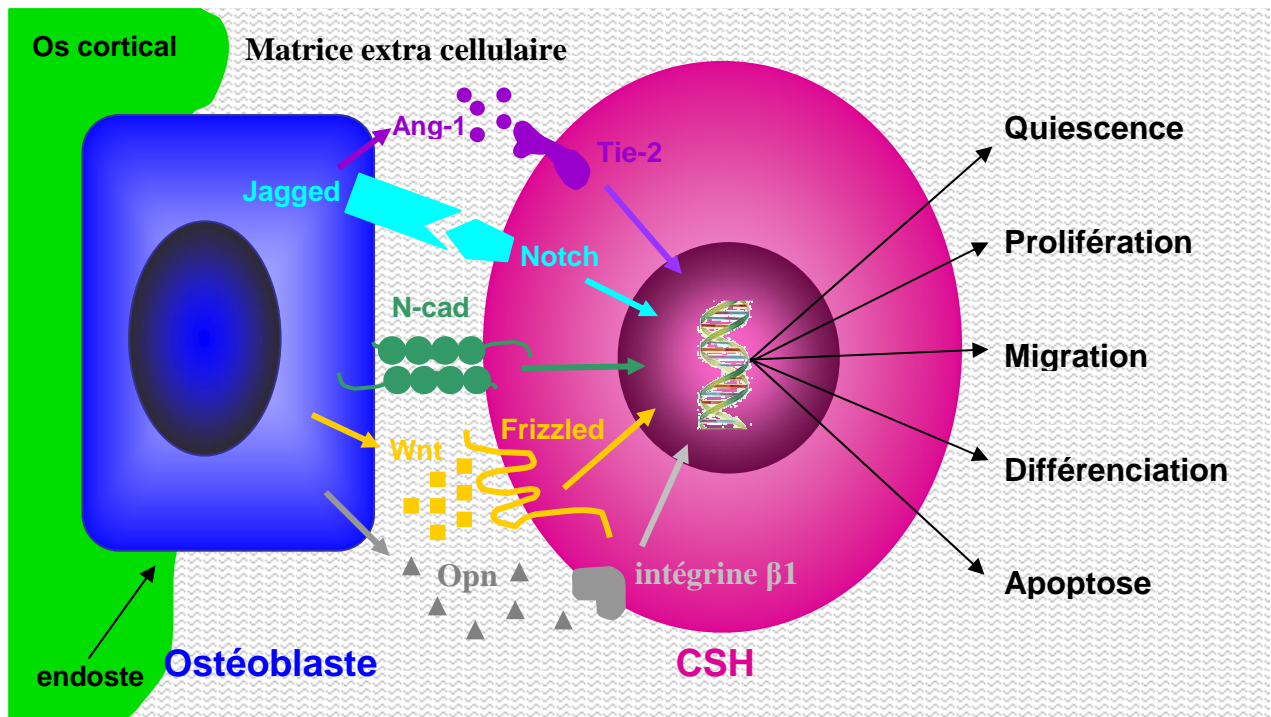


Figure 3 : Schématisation du contrôle des CSH par les ostéoblastes au sein de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse.

Ang-1 : Angiopoïétine-1 ; Tie-2 : Récepteur à la tyrosine kinase 2 ; N-cad : N-cadhérine ; Opn : Ostéopontine.

Il est estimé que 1.5×10^6 cellules sanguines doivent être produites chaque seconde chez l'adulte (Bryder *et coll.* 2006). Ce fort taux de renouvellement nécessite de rigoureux mécanismes de contrôle de l'homéostasie dont le premier niveau réside dans les CSH. Les CSH vont tout d'abord se différencier en progéniteurs multipotents qui n'ont plus de potentiel d'auto-renouvellement mais qui peuvent se différencier dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes. De nombreux facteurs de croissance et cytokines vont induire la différenciation des progéniteurs, aboutissant à la production des différents types de cellules sanguines : lymphocytes T, B et cellules NK pour les cellules lymphoïdes et les granulocytes, macrophages, érythrocytes et plaquettes pour les cellules myéloïdes (Broudy 1997). Les CSH vont également être à l'origine des cellules dendritiques et des ostéoclastes. Outre la production des cellules sanguines, une grande plasticité a été attribuée aux CSH. En effet, après transplantation de CSH plus ou moins purifiées, des cellules différenciées provenant du donneur sont trouvées au niveau du muscle (Jackson *et coll.* 2001), du foie (Lagasse *et coll.* 2000) et dans différents

épithéliums (Krause *et coll.* 2001). Les perturbations de la prolifération ou de la différenciation des CSH ou des progéniteurs sont à l'origine de nombreuses pathologies.

2.2.4. Utilisations thérapeutiques

Les principales utilisations thérapeutiques des CSH sont les transplantations pour les traitements des hémopathies malignes (leucémies, lymphomes, myélomes) (Bensinger *et coll.* 1996), affections sanguines congénitales/héréditaires (anémies (Kremens *et coll.* 2001), immunodéficiences (Antoine *et coll.* 2003)), certaines maladies métaboliques congénitales (ostéopétrose (Tolar *et coll.* 2006)), maladies autoimmunes (van Laar et Tyndall 2006), tumeurs solides (Hale 2005) ou pour les reconstitutions après de fortes chimiothérapies (O'Shaughnessy *et coll.* 1994). Selon l'agence de la Biomédecine, en France, en 2006, 3967 malades ont reçu une ou plusieurs injections de CSH autologues (62,3 %) ou allogéniques (33,7%) (Agence de la Biomédecine 2006). Actuellement, la récupération des CSH se fait également à partir du sang périphérique. Cette procédure, moins invasive que la récupération de moëlle osseuse, est préférée (Jansen *et coll.* 2005). Les populations purifiées de CSH sont encore peu utilisées pour la transplantation chez les patients (Negrin *et coll.* 2000; Vose *et coll.* 2001). La propriété de « transdifférenciation » des CSH a conduit à envisager leur utilisation pour la réparation tissulaire lors d'infarctus du myocarde (Kang *et coll.* 2006) ou de lésions hépatiques (Austin et Lagasse 2003) entre autres. De nouvelles utilisations expérimentales des CSH sont en cours de développement, notamment la thérapie génique (Malik 2007).

2.3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

2.3.1. Généralités

Friedenstein *et coll.* ont été les premiers à démontrer l'existence, dans la moëlle osseuse de rat, de cellules stromales de type fibroblastique, formant des colonies, capables de fabriquer de l'os et du cartilage (Friedenstein *et coll.* 1966; Friedenstein *et coll.* 1987). Nommées dans un premier temps CFU-F (Colony Forming Units-Fibroblast), elles ont été renommées en CSM par Arnold Caplan en 1991 (Caplan 1991). Par manque de marqueurs de surface spécifiques, les CSM sont identifiées *in vitro* par leur capacité à former des colonies et leur différenciation dans différentes conditions de culture en

ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes principalement (Kassem 2004). Traditionnellement, les CSM sont obtenues à partir de la fraction mononucléaire de la moëlle osseuse adhérente à des surfaces plastiques (Pountos et Giannoudis 2005). Elles représentent $1/10^4$ à $1/10^5$ des cellules mononuclées de la moëlle osseuse et peuvent être grandement amplifiées *in vitro* dans des conditions standards de culture (jusqu'à 40 doublements) ce qui facilite leurs éventuelles utilisations thérapeutiques (Pittenger *et coll.* 1999). D'autres cellules souches à potentiels mésenchymateux ont été isolées du périoste (Nakahara *et coll.* 1990; Fukumoto *et coll.* 2003), du cartilage (Alsalameh *et coll.* 2004), du liquide synovial (Jones *et coll.* 2004), des muscles (Young *et coll.* 2001), des tendons (Salingcarnboriboon *et coll.* 2003), du système vasculaire (Abedin *et coll.* 2004), du rein (Dekel *et coll.* 2006) et du tissu adipeux (Dicker *et coll.* 2005).

2.3.2. Hétérogénéité des CSM

Il est aujourd'hui évident que les CSM sont une population hétérogène en taille, morphologie (Figure 4) et potentiels de différenciation (Aubin 1998; Colter *et coll.* 2001; D'Ippolito *et coll.* 2004). C'est pourquoi le terme de cellules stromales de moëlle osseuse est préféré pour décrire l'ensemble des cellules adhérentes de la moëlle osseuse (Bianco *et coll.* 2001). Les méthodes d'extraction traditionnelles induisent une contamination des CSM par des cellules hématopoïétiques et endothéliales pouvant également adhérer sur des surfaces plastiques (Baddoo *et coll.* 2003). Alors que chez l'homme et le rat la proportion des cellules hématopoïétiques est raisonnable et diminue avec le temps de culture, elle est très importante chez la souris ; l'isolement des CSM chez la souris nécessite des étapes de purification supplémentaires comme une immunodéplétion des cellules contaminantes (Van Vlasselaer *et coll.* 1994; Tropel *et coll.* 2004). Il est également à noter que la prolifération et la différenciation des CSM *in vitro* varie en fonction du donneur chez l'homme (indépendamment de l'âge) ou de l'espèce pour la souris, variations probablement dues à différentes représentations des sous-populations de CSM (Phinney *et coll.* 1999; Phinney *et coll.* 1999).

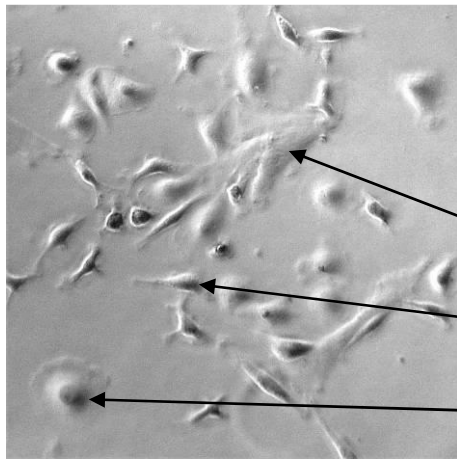


Figure 4 : Culture primaire de cellules de moëlle osseuse de souris observée au microscope à contraste de phase. Noter les différentes morphologies des cellules adhérentes.

Grande cellule aplatie : CSM

Petite cellule type fibroblastique

Cellule ronde hématopoïétique

2.3.3. Phénotype

Le phénotype des CSM commence à être bien connu mais un marqueur spécifique n'est toujours pas identifié. Les principales caractéristiques du phénotype des CSM sont :

- absence d'expression d'antigènes HLA de classe II. Elles ont une faible immunogénicité. Cependant, cette expression est inductible en particulier par l'interféron gamma dans les cellules indifférenciées (Le Blanc *et coll.* 2003).

- absence d'expression de marqueurs de type hématopoïétiques CD3, CD4, CD11a, CD34 et CD45 permettant de les distinguer des cellules hématopoïétiques à partir d'un échantillon de moëlle osseuse par FACS (Pittenger et Martin 2004).

- expression de molécules de surface dont les ligands sont présents sur les cellules matures des lignées hématopoïétiques, soulignant l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires (Majumdar *et coll.* 2003).

- expression de nombreuses intégrines jouant un rôle important dans la mobilité des CSM (Docheva *et coll.* 2007).

2.3.4. CSM et microenvironnement

Les CSM secrètent de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, des protéines matricielles et expriment des molécules d'adhésion (Conget et Minguell 1999) influençant directement sur le microenvironnement osseux. L'étude du transcriptome des CSM a montré que ces cellules expriment les ARNm des interleukines IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, le Monocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), le Stem Cell Factor (SCF), le Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et le granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) (Majumdar *et coll.* 1998). Par ce microenvironnement, les CSM

participent à la survie, la prolifération et différenciation des précurseurs hématopoïétiques. Ce rôle de soutien de l'hématopoïèse par les CSM a été démontré *in vitro* par des expériences de co-culture (Bennaceur-Griscelli *et coll.* 2001; Majumdar *et coll.* 2003) et *in vivo* par des expériences de co-transplantation (Angelopoulou *et coll.* 2003). Les CSM secrètent également la thrombopoïétine impliquée dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse (Cheng *et coll.* 2000). Par les facteurs solubles qu'elles produisent, les CSM ont une action dose-dépendante inhibitrice sur la prolifération des lymphocytes T induite par des cellules dendritiques, jouant ainsi un rôle d'immunomodulateur utilisé dans certaines stratégies thérapeutiques (Lazarus *et coll.* 2005).

2.3.4. Potentiels de différenciation

Les CSM ont été pendant longtemps qualifiées de cellules souches multipotentes à la vue de leur différenciation uniquement en cellules des tissus conjonctifs. Elles n'étaient associées qu'à la formation des différents tissus conjonctifs, incluant l'os, le cartilage, le muscle lisse, les ligaments, les tendons et le tissu adipeux (Pittenger *et coll.* 1999). Les CSM de la moelle osseuse sont aussi capables dans des conditions environnementales particulières *in vitro* ou *in vivo* de se différencier en cellules musculaires cardiaques (Toma *et coll.* 2002), squelettiques (Pittenger *et coll.* 2002), cellules endothéliales (Davani *et coll.* 2003), péricytes (Gojo *et coll.* 2003), cellules neuronales (Long *et coll.* 2005), hépatocytes (Thorgeirsson et Grisham 2006), gonocytes (Drusenheimer *et coll.* 2007) et cellules pancréatiques (Chen *et coll.* 2004). Ces différentes voies de différenciation sont induites *in vitro* par des stimuli chimiques divers dont certains font appels à des agents déméthylants (5-azacytidine) pouvant potentiellement reprogrammer les cellules *in vitro*.

2.3.3. Utilisations thérapeutiques

L'utilisation clinique des CSM est effective ou envisagée dans 4 domaines :

- L'implantation locale : des rapports de cas cliniques ont prouvés l'efficacité de l'injection locale de CSM autologues amplifiées *ex vivo* pour le traitement de défauts osseux de grandes tailles après des fractures non cicatrisées (Quarto *et coll.* 2001). Des études cliniques sont également en cours pour évaluer l'efficacité de l'utilisation des CSM pour les insuffisances cardiaques (Ohnishi *et coll.*

2007), les maladies artérielles périphériques (Tateishi-Yuyama *et coll.* 2002) ou coronaires (Wollert *et coll.* 2004) et les plaies chroniques de la peau (Badiavas et Falanga 2003). L'injection directe de CSM dans le cerveau a été testée chez le rat et la souris. Les CSM implantées acquièrent un phénotype neuronal partiel et leur présence permet un rétablissement fonctionnel (Sanchez-Ramos 2002; Zhao *et coll.* 2002). Mais il est peu probable que ce rétablissement fonctionnel soit dû à l'intégration de nouvelles cellules neuronales ; il pourrait-être provoqué par des facteurs sécrétés par les CSM implantées suggérant un rôle trophique ou cytoprotecteur sur les progéniteurs préexistants.

- La transplantation systémique : la transplantation de CSM peut-être envisagée dans le cas de maladies liées à un dysfonctionnement des cellules des tissus conjonctifs. Cette technique thérapeutique a été utilisée pour le traitement de l'ostéogénèse imparfaite (Horwitz *et coll.* 2001), l'ostéopétrose (Tolar *et coll.* 2006) ou le syndrome de Hurler, maladie génétique dégénérative liée à un déficit enzymatique qui est responsable de l'accumulation de glycosaminoglycanes (Koc *et coll.* 2002). La transplantation de CSM est envisagée dans de nombreuses maladies dégénératives comme la myopathie de Duchenne (Jensen et Drapeau 2002; Dreyfus *et coll.* 2004; Peault *et coll.* 2007). Les CSM amplifiées *ex vivo* sont également transplantées avec les CSH afin de réduire la réaction du greffon contre l'hôte et ainsi d'améliorer la greffe des CSH (Koc *et coll.* 2002; Bacigalupo 2004; Le Blanc *et coll.* 2007).

- Thérapie cellulaire combinée à la thérapie génique : les CSM sont capables d'exprimer des protéines exogènes, comme par exemple la tyrosine hydroxylase (Lu *et coll.* 2005), l'interleukine 3 (Allay *et coll.* 1997) ou la BMP-4 (Zhang *et coll.* 2004) pendant une longue période tout en maintenant leurs capacités après transplantation. Zhang *et coll.* ont obtenu une augmentation de la formation osseuse chez la souris, après injection intramédullaire de CSM transfectées avec le gène de la BMP-4 humaine (Zhang *et coll.* 2004).

- L'ingénierie tissulaire : les CSM sont cultivées sur des biomatériaux tridimensionnels dans des conditions de culture particulières permettant la formation *ex vivo* de tissus ou organes (Stock et Vacanti 2001). Des études cliniques d'ingénierie tissulaire pour le cartilage (Vacanti et Vacanti 1994; Hunziker 2002) et la peau (Boyce *et coll.* 2000) sont menées mais pour de nombreux tissus et organes, elles sont encore expérimentales. L'ingénierie tissulaire du tissu osseux est détaillée dans le prochain chapitre de cette thèse.

2.4. Les Multipotent Adult progenitor cells (MAPCs)

Les MAPCs sont des cellules rares, découvertes en 2002 (Jiang *et coll.* 2002; Verfaillie 2005) parmi les CSM, ayant des potentiels de prolifération et de différenciation plus vastes, rendant leur potentiel thérapeutique plus attractif. Contrairement aux CSM, elles peuvent être cultivées indéfiniment (>100 doublements). Placées *in vitro* dans des conditions adéquates en cytokines et nutriments, les MAPCs se différencient en cellules entoblastiques (hépatocytes) (Schwartz *et coll.* 2002), mésoblastiques (endothéliales et hématologiques) (Reyes *et coll.* 2002) et ectoblastiques (neuronales) (Zhao *et coll.* 2002). Ces potentiels de différenciation ont été confirmés *in vivo* après injection à des receveurs irradiés. Micro-injectées dans un blastocyte de souris, une seule de ces cellules contribue à la formation de tous les tissus embryonnaires à l'exception du tissu nerveux (Jiang *et coll.* 2002). Les MAPCs ont été comparées aux cellules souches embryonnaires du fait de leur capacité de différenciation et proposées comme précurseur commun aux CSH et CSM (Coulombel 2003) dont l'existence avait été suggérée par ailleurs (Krause *et coll.* 2001; Dominici *et coll.* 2004). Une première étude a démontré que la transplantation de MAPCs chez des souris irradiées permet une reconstitution hématopoïétique avec production de CSH et des différentes populations cellulaires hématopoïétiques (Serafini *et coll.* 2007). Les MAPCs ont été décrites chez la souris, le rat et l'homme (Schwartz *et coll.* 2002), à partir de moelle osseuse mais également de muscle et de cerveau (Jiang *et coll.* 2002). Elles sont sélectionnées par culture à faible densité cellulaire, sur un support recouvert de fibronectine, dans un milieu pauvre en sérum (<2%) additionné d'EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) et LIF. Une immunodéplétion de cellules CD45⁺ et TER119⁺ est réalisée avant la mise en culture pour l'isolement des MAPCs chez la souris.

2.5. Les précurseurs endothéliaux

La moelle osseuse contient des progéniteurs de cellules endothéliales (PCE) (Rafii *et coll.* 1994; Schatteman *et coll.* 2007) qui participent à la morphogénèse du système vasculaire postnatale (Asahara *et coll.* 1999). Deux origines ont été décrites pour les PCE : l'hémangioblaste médullaire et les MAPCs. L'hémangioblaste, initialement décrit

parmi les cellules souches embryonnaires, précurseur commun aux CSH et PCE, a été isolé de la moëlle osseuse selon leur phénotype CD34⁺ et vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR)⁺ (Pelosi *et coll.* 2002). Les CSH peuvent avoir une activité d'hémangioblaste et être à l'origine de PCE lors d'une lésion tissulaire (Grant *et coll.* 2002; Bailey *et coll.* 2004). Les MAPCs cultivées en présence de VEGF (vascular endothelial growth factor) se différencient en cellules CD34⁺, VE-cadherin⁺ et Flk1⁺ (vascular endothelial growth factor receptor-2), phénotype caractéristique des angioblastes, puis en cellules endothéliales fonctionnelles. *In vivo*, les cellules endothéliales dérivées de MAPCs humaines contribuent à la néoangiogénèse tumorale et à la cicatrisation (Reyes *et coll.* 2002). L'utilité des PCE issus de la moëlle osseuse dans le remodelage vasculaire des pathologies ischémiques et de l'infarctus du myocarde est reconnue (Orlic *et coll.* 2001; Stamm *et coll.* 2003; Finney *et coll.* 2006).

2.6. Précurseurs des péricytes et péricytes

Les péricytes, également appelés cellules de rouget ou « vascular smooth muscle cells », sont les cellules de soutien des cellules endothéliales. Elles participent au remodelage du système vasculaire chez l'adulte en permettant la stabilisation et la maturation des vaisseaux néoformés (Betsholtz *et coll.* 2005). Récemment, il a été démontré l'existence de précurseurs de péricytes dans la moëlle osseuse (Rajantie *et coll.* 2004). Des cellules de moëlle osseuse transplantées chez des souris après une ischémie cérébrale, sont retrouvées au niveau du parenchyme cérébral mais d'autres sont associées au système vasculaire. Ces dernières sont entourées d'une membrane basale, expriment la desmine et vimentine, mais pas de marqueurs de cellules endothéliales, les identifiant comme des péricytes (Kokovay *et coll.* 2006). Ces précurseurs sont également recrutés lors de l'angiogénèse tumorale (Song *et coll.* 2005). Les progéniteurs extraits des tumeurs ne sont pas des péricytes matures, sont issus de la population sca-1⁺ des CSH et peuvent se différencier en péricytes matures *in vitro*.

Les péricytes sont eux-mêmes des précurseurs : les péricytes issus des capillaires rétiens se différencient en ostéoblastes et chondrocytes *in vitro* et *in vivo* (Doherty *et coll.* 1998; Collett *et coll.* 2003) et les péricytes extraits des vaisseaux sanguins du tissu musculaire squelettique ont été décrits comme des précurseurs myogéniques (Dellavalle *et coll.* 2007).

2.7. Les autres (MIAMI, TCSC, RS-1)

De nombreuses autres sous-populations de CSM ont été isolées de la moëlle osseuse et décrites comme des cellules souches adultes primitives pluripotentes (différenciation dans les 3 feuilletts embryonnaires) ou multipotentes.

- Les Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible (MIAMI) cells (D'Ippolito *et coll.* 2004). Ces cellules sont obtenues à partir de la fraction adhérente (CSM) de la moëlle osseuse humaine après 14 jours de culture avec les cellules non adhérentes. Les colonies formées sont remises en culture à faible densité cellulaire, sur un support recouvert de fibronectine (Fn), avec 2% de sérum seulement et en hypoxie soit 5% O₂ (au lieu de 21% dans l'air), 5% CO₂ et 92% N₂. Cette population cellulaire peut se différencier, en présence de cytokines et facteurs appropriés, en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes mais également en cellules neuronales et en cellules produisant de l'insuline, ressemblant à des îlots β pancréatiques. Elles maintiennent ces potentiels de différenciation après plus de 50 doublements. Les MIAMI cells expriment des marqueurs de surface non exprimés par les autres sous-populations de CSM comme le CD10.

- Les Tissue Committed Stem Cells (TCSC) (Kucia *et coll.* 2005). Cette population cellulaire a été obtenue chez la souris et l'homme. Ce sont les cellules CXCR4⁺ parmi les cellules non-hématopoïétiques (CD45⁻) de la moëlle osseuse. Le CXCR4 est le récepteur spécifique du chémoattractant α -chemokine stromal derived factor-1 (SDF-1) secrété par les ostéoblastes, fibroblastes et cellules endothéliales. L'axe SDF-1-CXCR4 a été principalement décrit dans le processus de migration des CSH du foie vers la moëlle osseuse par la circulation générale au cours de l'embryogénèse. Il a été montré que l'expression de SDF-1 et d'autres chémoattractants était augmentée au niveau d'un tissu endommagé, permettant la mobilisation des cellules souches de la moëlle osseuse (HSC ou MSC CXCR4⁺) dans la circulation générale pour aller au niveau de la lésion et participer à la réparation tissulaire. Ce phénomène expliquerait l'observation de CSM dans le sang périphérique (Eghbali-

Fatourechhi *et coll.* 2005) et d'autres tissus où elles ne sont pas attendues, par exemple des CSH au niveau du muscle squelettique (McKinney-Freeman *et coll.* 2002).

- Les Recycling Stem cells (RS) (Colter *et coll.* 2000; Colter *et coll.* 2001). Leur découverte est venue de l'observation des cultures de CSM humaines. La culture à très faible densité (3 cellules/cm²) est composée de cellules morphologiquement différentes : de petites cellules fusiformes, de grandes cellules aplaties et de toutes petites cellules rondes, non granulaires. Ces dernières sont les cellules RS, à taux de prolifération rapide, semblant générer les CSM (grandes cellules aplaties) et ayant de meilleures capacités de différenciation ostéogéniques et chondrogéniques (Colter *et coll.* 2001). Les marqueurs de surface permettant de les distinguer des CSM sont le FLK-1, le récepteur à la transferrine et l'annexine II.

Ces découvertes (MAPC, RS-1, TCSC, MIAMI) sont issues de différents protocoles expérimentaux incluant des milieux, temps et conditions de culture cellulaires différentes (table 1). La preuve de leur existence *in vivo* n'a pas encore été démontrée. Il est impossible de savoir à l'heure actuelle si les différentes sous populations de CSM ne sont pas en fait un seul et même précurseur *in vivo*, dont les variances sont apparues au cours de la culture *in vitro*.

	Nom	Proportion	Isolement	Conditions de culture	Caractéristiques
Cellules non-hématopoïétiques CD45⁻	CSM	1/10 ⁴ à 1/10 ⁵ de CMN	CMN, CFU-F	Standard	morphologies variables
	MAPC	ND	CMN, 2% SVF, EGF, PDGF, LIF, Fn	2% SVF, Fn, EGF, PDGF, LIF, 1000 ϕ /cm ²	pas de sénescence en culture, proches des CSE
	MIAMI	ND	MOT, hypoxie, 2% SVF, Fn, CFU-F	hypoxie, 2% SVF, Fn, 1300 ϕ /cm ²	petites cellules avec peu de cytoplasme, pluripotentes
	TCSC	1/10 ³ à 1/10 ⁴ de CMN	MOT, CXCR4 ⁺ /SDF-1 gradient	ND	population hétérogène, pluripotente, dans de nombreux tissus
	RS	1/10 ³ de CSM	CMN, 3 ϕ /cm ²	standard	petites cellules non granulaires à expansion rapide
Cellules hématopoïétiques CD45⁺	CSH	1/10 ⁵ de MOT	c-kit ⁺ Sca-1 ⁺ lin ⁻ Thy-1 [±]	Co-culture avec des cellules stromales. Expansion faible	plasticité <i>in vivo</i>

Table 1: Principales cellules souches présentes dans la moelle osseuse : différentes conditions d'isolement et de culture.

CMN : cellules mononuclées ; MOT : moelle osseuse totale ; CSE : cellules souches embryonnaires ; ND : non déterminé

II. THERAPIES CELLULAIRES POUR LA REPARATION DU TISSU OSSEUX

Le terme thérapie cellulaire désigne un ensemble de nouvelles techniques ou technologies permettant le remplacement ou la régénération de cellules non fonctionnelles par des cellules saines et fonctionnelles.

L'utilisation des cellules souches suscite un intérêt grandissant dans la communauté orthopédique depuis que l'on sait obtenir à partir d'un petit nombre de ces cellules un grand nombre de cellules ostéogéniques. L'utilisation de ces cellules est envisagée dans deux situations cliniques bien différentes. Dans un premier cas, elles pourraient être injectées par voie systémique, pour traiter principalement des maladies osseuses d'origine génétique. Le but ultime étant que les cellules injectées (ou leur descendance) migrent dans le squelette et se substituent progressivement aux cellules malades. Dans un second cas, des cellules ostéogéniques seraient amplifiées *in vitro* puis transplantées localement, pour combler des pertes de substance osseuse. Pour cela, après avoir obtenu un nombre important de cellules ostéogéniques à partir d'un prélèvement limité, elles seront associées à un matériau support et/ou à des facteurs de croissance, pour constituer un substitut d'autogreffe osseuse.

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la réparation du tissu osseux est indispensable pour le développement de thérapies basées sur la régénération osseuse.

1. LA REPARATION DU TISSU OSSEUX

1.1. La régénération spontanée

Le tissu osseux a la capacité de se régénérer suite à une fracture. La cicatrisation fait appel à de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires impliquant principalement la moelle osseuse, les vaisseaux et le périoste (Einhorn 1998; Dimitriou *et coll.* 2005). Certains processus cellulaires impliqués dans la réparation des fractures sont également

impliqués dans l'ostéointégration d'un implant ou d'un greffon en site osseux mais sans formation osseuse endochondrale (cal cartilagineux) (Moreau *et coll.* 2003).

Après un traumatisme ou un acte chirurgical, les lésions vasculaires engendrent un hématome avec accumulation de plaquettes. Les facteurs de croissance et cytokines produits par les plaquettes et les lésions tissulaires, provoquent une réaction inflammatoire avec l'arrivée de leucocytes polynucléés, de lymphocytes, monocytes et macrophages au niveau de l'hématome. Le PDGF et TGF- β secrétés par les plaquettes, les IL-1, IL-6 et TNF- α secrétés par les cellules inflammatoires induisent la chémoattraction des cellules inflammatoires, la migration, prolifération et différenciation des CSM provenant du périoste, de l'endoste et de la moëlle osseuse (Bolander 1992). L'angiogénèse, indispensable à la poursuite de la régénération osseuse est régulée par les voies du VEGF et des angiopoïétines (Gerstenfeld *et coll.* 2003). En même temps, les BMP sont relarguées de la matrice osseuse endommagée et secrétées par les premières CSM recrutées (Bostrom et Camacho 1998). Les CSM vont se différencier en ostéoblastes et chondrocytes et contribuer à la formation d'une nouvelle matrice. Les ostéoblastes dérivés du périoste vont former un tissu osseux non lamellaire de type woven bone en périphérie pour assurer la stabilisation des deux fragments osseux lors d'une fracture (ou de l'os avec le biomatériau implanté). Dans les zones mécaniquement moins stables et hypoxiques, comme au niveau de l'hématome fracturaire, la formation osseuse est endochondrale suite à la différenciation des CSM en chondrocytes (Boyan *et coll.* 1996). Lorsque la stabilité mécanique est établie, le tissu cartilagineux calcifié est éliminé par des ostéoclastes et remplacé par du woven bone avec recrutement de nouvelles cellules ostéoprogénitrices. La vascularisation des tissus nouvellement formés va permettre le remodelage du woven bone en os lamellaire avec des systèmes de Havers, plus résistant.

Du fait de la migration de cellules inflammatoires ou mésenchymateuses des tissus de l'environnement immédiat, la régénération osseuse spontanée dans le foyer de fracture n'est possible que si la perte osseuse est faible et que les deux fragments osseux sont proches. Dans le cas de pertes osseuses plus importantes ou de non-union (pseudarthrose), une greffe est nécessaire pour combler l'espace, apporter un soutien mécanique et un support pour la migration des cellules.

1.2. Les greffes osseuses et autres substituts

D'après Giannoudis *et coll.*, 2.2 millions de greffes osseuses sont réalisées dans le monde chaque année en chirurgie orthopédique (comblements de lacunes osseuses, reprises de prothèses, ostéotomies...), neurochirurgie (arthrothèses vertébrales), en chirurgie reconstructrice, ainsi que dans le domaine dentaire, en particulier la parodontologie et l'implantologie, représentant un coût de 2.5 billions de dollars (Giannoudis *et coll.* 2005). Les greffes osseuses consistent en un comblement d'un défaut osseux par un biomatériau pouvant être naturel ou synthétique, celui-ci devant permettre une stimulation de la cicatrisation. L'ostéoconduction, l'ostéoinduction et la biocompatibilité sont trois éléments essentiels à la régénération conduisant à l'**ostéointégration** du matériau au niveau du site osseux receveur. L'**ostéoconduction** décrit la capacité de colonisation du matériau par des cellules, des vaisseaux sanguins puis d'un os néoformé. L'**ostéoinduction** consiste en un recrutement et une activation des CSM de l'hôte au niveau des tissus environnants, pouvant se différencier en ostéoblastes.

1.2.1. Les greffes osseuses

L'**autogreffe** est le meilleur matériau de comblement car il possède des propriétés d'ostéoconduction, ostéoinduction et possède également ses propres cellules ostéogéniques (Perry 1999). De l'os trabéculaire et/ou cortical est prélevé le plus souvent au niveau de la crête iliaque des patients mais également au niveau du tibia, de la fibule, des côtes ou de la symphyse mentonnière. Les greffes autologues d'os cortical peuvent être réalisées avec le pédicule vasculaire, accélérant la consolidation de la greffe (Pederson et Person 2007). Les avantages de l'autogreffe sont une absence de réaction de rejet et un potentiel ostéogénique dû à la présence de cellules et de facteurs ostéogéniques. Il est toutefois à noter que de nombreuses cellules ne survivent pas après l'implantation (Sandhu *et coll.* 1999). En plus de la chirurgie additionnelle et de l'augmentation des temps d'intervention, le prélèvement du greffon est associé à 8,5 - 20% de complications, notamment la formation d'hématome, d'hémorragie, de lésions nerveuses, d'infections, des dommages esthétiques et parfois des douleurs chroniques (Arrington *et coll.* 1996; Ross *et coll.* 2000; Seiler et Johnson 2000). La réalisation d'une autogreffe est limitée par la quantité de greffon prélevé et par sa qualité.

Les **allogreffes** représentent une alternative répandue aux autogreffes (Graham et Stockley 2004; Dennis et Little 2005). Une grande quantité d'os cortical et/ou trabéculaire, voire des pièces anatomiques entières, peuvent être obtenues à partir de rebuts chirurgicaux (principalement des têtes fémorales) ou à partir de cadavres. Actuellement, les greffons allogéniques ne doivent plus contenir de cellules vivantes, de façon à éviter les réactions immunologiques. Leur utilisation nécessite des précautions supplémentaires pour diminuer les risques infectieux et les potentiels risques de transmission de maladies virales. La sécurisation bactérienne et virale des greffons est assurée par une sélection stricte des donneurs, des conditions aseptiques de prélèvement et de conservation, une mise en quarantaine dans des banques de tissus, à -80°C et une stérilisation par irradiation γ (Buck et Malinin 1994). Différents types d'allogreffes sont utilisés : fraîchement congelées, lyophilisées et/ou déminéralisées. La congélation permet de détruire les cellules du greffon, qui reste cependant inflammatoire par la présence des débris cellulaires et de protéines solubles (VandeVord *et coll.* 2005), ce qui retarde les mécanismes d'incorporation de la greffe (Stevenson *et coll.* 1996; Strong *et coll.* 1996). De plus, la congélation n'empêche pas les risques infectieux viraux et bactériens (Friedlaender *et coll.* 1976; Eastlund 1995). La stérilisation par irradiation γ ne doit être réalisée qu'après la purification et surtout la délipidation du greffon, sous peine de produire un matériau présentant des effets délétères sur les cellules osseuses (Chappard *et coll.* 1993; Moreau *et coll.* 2000). Les allogreffes lyophilisées présentent une solidité très fortement diminuée du fait de l'apparition de craquelures macroscopiques et microscopiques lors de la réhydratation (Sandhu *et coll.* 1999). Les greffons déminéralisés par des agents chimiques tels que l'éthanol, l'urée et l'acide chlorhydrique présentent moins de risques de transmission virale (Mellonig *et coll.* 1992; Swenson et Arnoczky 2003), sont moins inflammatoires mais également moins bien incorporés que des allogreffes fraîchement congelées (Ehrler et Vaccaro 2000). Il semblerait que les allogreffes déminéralisées induisent plus d'apposition osseuse lorsqu'elles contiennent 2 % de calcium résiduel (Turonis *et coll.* 2006). Récemment, plusieurs sociétés ont développé des procédés permettant de nettoyer, purifier et désinfecter des allogreffes humaines de façon à produire des greffons propres et stériles, facilement stockables et distribuables. Le traitement physique par CO₂ supercritique permet d'éliminer les lipides de fragments osseux de grande taille (Fages *et coll.* 1994; Frayssinet *et coll.* 1998). La délipidation permet ensuite le traitement par des solutions aqueuses oxydatives (peroxyde d'hydrogène, soude...) pour le nettoyage et

l'élimination des protéines solubles. Certaines allogreffes osseuses sont actuellement commercialisées. Cependant, il n'existe aujourd'hui aucun consensus sur les traitements à appliquer pour la purification des allogreffes osseuses humaines et peu d'études précises sur le retentissement des différents procédés utilisés ont été entreprises pour vérifier leur(s) effet(s) ou inactivité sur la qualité des greffons.

Les **xénogreffes** osseuses sont connues depuis très longtemps (Lexer 1914) et plusieurs spécialités préparées à partir d'os bovin ont été commercialisées en France et à l'étranger. Cependant, le risque théorique de transmission d'agents infectieux non conventionnels (prion) lié à l'encéphalopathie spongiforme bovine a considérablement diminué l'emploi de ces substituts (Butler 1998; Melo *et coll.* 2001). L'utilisation d'autres espèces animales (ex : le porc) pour la préparation de greffons osseux a été proposée dans la littérature (Kim *et coll.* 2004) mais expose à un risque de pandémie par activation d'oncovirus.

1.2.2. Les autres substituts osseux

Un grand nombre d'alternatives aux greffes osseuses sont commercialisées. On peut distinguer les biomatériaux de comblement (nécessaires pour combler des défauts osseux) et les biomatériaux prothétiques nécessaires pour remplacer une pièce squelettique (prothèses articulaires, implants dentaires). Le cahier des charges des biomatériaux est strict puisqu'ils sont appelés à travailler simultanément sous contraintes biologiques, mécaniques et chimiques. La réussite à moyen et long terme de l'implant exige sa biocompatibilité, des propriétés mécaniques compatibles avec le site d'implantation, une intégration optimale par sa colonisation par des cellules vasculaires et osseuses et un contact direct avec l'os nouvellement formé (matériau bioactif), sans tissu fibreux intermédiaire. En plus de sa composition et de sa structure, l'état de surface du biomatériau (sa topographie, son énergie de surface) est un paramètre influençant les processus biologiques de l'incorporation de l'implant (Friedman *et coll.* 1996; Degasne *et coll.* 1999). Les substituts osseux sont naturels ou synthétiques.

- Les matériaux naturels

Le corail ou la nacre ont été proposés comme substituts osseux (Guillemin *et coll.* 1987; Atlan *et coll.* 1999; Shors 1999). Ces biomatériaux sont ostéoconducteurs,

biocompatibles mais n'ont pas les propriétés mécaniques nécessaires pour leur utilisation dans des sites en charge. Les quantités disponibles à l'échelon de la planète s'avèrent infimes et des réactions indésirables ont été décrites avec ces matériaux (Martin *et coll.* 1993).

- Les métaux

Ils sont utilisés pour leur grande résistance mécanique, leur permettant de supporter un régime de contraintes mécaniques physiologiques pendant plusieurs dizaines d'années. Les biomatériaux métalliques peuvent-être en titane pur, alliages de titane, alliages de cobalt-chrome-molybdène ou des aciers inoxydables. Ils sont principalement utilisés comme matériaux prothétiques. Les traitements de surface, notamment l'augmentation de la rugosité, ont permis d'augmenter la capacité du titane à se lier directement à l'os, sans l'intermédiaire de tissu fibreux (Buser *et coll.* 1991; Wennerberg *et coll.* 1995). Cependant, les implants métalliques libèrent des ions et des particules d'usure induisant une réaction inflammatoire pouvant conduire à une ostéolyse et un descellement de prothèse (Amstutz *et coll.* 1992; Soloviev *et coll.* 2002; Wennerberg *et coll.* 2004).

- Les céramiques

Des céramiques synthétiques, comme les phosphates de calcium et les bioverres, peuvent être préparées en grandes quantités et semblent correspondre à une alternative intéressante. Ils ont l'avantage de se présenter sous différentes formes : céramiques ou ciments, poreux ou pleins, en blocs ou en granules, injectables ou non. Malgré une compatibilité tissulaire et cellulaire souvent excellente, elles présentent une valeur biomécanique nettement inférieure à celle du tissu osseux, et leur friabilité ou leur mauvaise résistance aux forces en compression empêchent leur utilisation dans des sites en charge (Khan *et coll.* 2000). Les **bioverres** sont principalement utilisés pour le recouvrement de prothèse (Ducheyne et Cuckler 1992) et le comblement de pertes osseuses au niveau de la mâchoire (Wilson et Low 1992). Cependant, ils exposent l'organisme à de grandes quantités de silice pouvant être néphrotoxique et générer des maladies autoimmunes (Gorustovich *et coll.* 2007). Parmi les **phosphates de calcium** on distingue principalement les phosphates tricalciques (TCP) dont le β TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), l'hydroxyapatite (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et les céramiques biphasées (BCP), mélanges en proportions variables de HA et de β TCP (Jarcho 1981). Ces produits sont

bioactifs, biocompatibles et ostéoconducteurs. L'HA est le minéral présent dans les tissus calcifiés. De nombreux matériaux hybrides à base de phosphates de calcium ont été proposés. La combinaison d'HA et d'un polymère permet souvent de rendre ce dernier plus ostéoconducteur. L'HA peut également servir de support pour l'implantation de cellules et/ou de facteurs ostéogéniques (Noshi *et coll.* 2000).

- Les polymères

Un polymère est formé par l'assemblage de macromolécules formant des chaînes principales et des chaînes latérales dont l'agencement conditionne la structure, mais également les comportements mécaniques et chimiques du polymère. Les polymères peuvent être d'origine naturelle (cellulose, chitine) mais également de synthèse (polyméthylméthacrylate, acide poly-lactique...). D'autres matériaux peuvent être ajoutés lors de la synthèse du polymère et former ainsi des matériaux composites ou des copolymères. Les différentes stratégies de synthèse permettent de contrôler l'architecture, la forme et les propriétés mécaniques du biomatériau produit, afin de s'adapter au mieux à l'application choisie. Les principaux polymères utilisés jusqu'à présent pour les implants osseux sont le polyéthylène de haut poids moléculaire et le poly-méthylméthacrylate (Lerouge *et coll.* 1997; Webb et Spencer 2007). Tous deux sont hydrophobes, non biodégradables et ne peuvent être éliminés de l'organisme, ce qui limite leur utilisation dans certaines indications. Tout comme les implants métalliques, les particules d'usure du polyéthylène peuvent migrer (Massin *et coll.* 2004) et induire des pertes osseuses locales autour de la prothèse ou à distance (Schmalzried *et coll.* 1992; Baslé *et coll.* 1996). D'autres polymères, plus hydrophiles, voire hydrosolubles, peuvent être utilisés comme biomatériaux (acide poly-lactique-glycolique (PLGA), poly-hydroxyéthyl-méthacrylate (PHEMA), poly-éthylène glycol (PEG)). Ils trouvent un intérêt comme matériaux injectables pour le comblement de cavités par des techniques mini-invasives (Laschke *et coll.* 2007) ou comme hydrogels pour la libération de substances actives ou des cellules (Yamamoto *et coll.* 2006; Yamaoka *et coll.* 2006).

1.3. Problèmes cliniques

Les greffes et autres substituts osseux ne permettent de restaurer que les pertes osseuses locales. Les pertes osseuses généralisées d'origine métabolique ou génétique sont traitées principalement de manière médicamenteuse afin de limiter les pertes osseuses et diminuer le risque de fractures mais ne permettent pas de restaurer une masse ou une qualité osseuse normale. La transplantation de moelle osseuse a été réalisée chez des jeunes patients atteints d'ostéogénèse imparfaite et a permis une amélioration de leurs conditions de vie (Horwitz *et coll.* 2001), mais la synthèse d'un collagène normal par les cellules transplantées n'a pas été démontrée. Les processus cellulaires et moléculaires lors de la transplantation systémique de cellules doivent être mieux décrits et la thérapie cellulaire systémique des pertes osseuses fait l'objet de nombreuses études précliniques (Cancedda *et coll.* 2003).

La reconstruction de segments osseux de grande taille est encore un problème clinique important dans le cas de pertes osseuses significatives après des traumatismes, infections ou le traitement chirurgical des tumeurs. Les approches thérapeutiques actuelles incluent de nombreux greffons et substituts osseux, mais aucun n'a donné entière satisfaction. L'incorporation des greffons osseux est limitée dans le temps et dans l'espace (Khan *et coll.* 2005). Ainsi dans le cas de larges défauts, l'ostéointégration des greffons ou biomatériaux est souvent incomplète (Delloye 2003). Le taux d'échec après des allogreffes massives est rapporté à 60 % après 10 ans (Wheeler et Enneking 2005). La médecine régénérative actuelle développe l'utilisation de facteurs ostéogéniques comme les BMPs permettant le recrutement local des ostéoprogéniteurs (Nordsletten 2006) et l'ingénierie tissulaire pour la reconstruction de larges pertes osseuses (Cancedda *et coll.* 2007).

2. TRANSLANTATION DE MËLLE OSSEUSE

2.1. Généralités

La transplantation de moelle osseuse (TMO) est utilisée en thérapeutique depuis la fin des années 60 (Thomas et Storb 1970). Le but de cette thérapie est de remplacer des

cellules non fonctionnelles ou détruites par chimiothérapie et/ou irradiation par des cellules saines. En fonction de la pathologie traitée, les cellules sont autologues, allogéniques ou les deux combinées, de la moelle osseuse totale, des CSH ou des CSM, pré-cultivées ou non. Les principales applications thérapeutiques de la TMO comme thérapie cellulaire pour la réparation du tissu osseux sont les maladies malignes comme la maladie de Hodgkin et autres lymphomes (Armitage *et coll.* 1991; Chopra *et coll.* 1992), le myélome multiple (Gahrton *et coll.* 1991) et les maladies constitutionnelles comme l'ostéopétrose (Coccia *et coll.* 1980; Tolar *et coll.* 2006) et la maladie de Gaucher (déficiency d'une enzyme lysosomale induisant l'accumulation de lipides notamment au niveau de la moelle osseuse se traduisant par des ostéonécroses par trouble de la vascularisation) (Rappeport et Ginns 1984). Les manifestations cliniques osseuses de ces maladies sont dues à des anomalies des cellules de la lignée hématopoïétique. Des études précliniques sont en cours pour évaluer de nouvelles utilisations thérapeutiques, principalement dans le cas des maladies des CSM. En plus de la myéloablation prolongée, la TMO est associée à de nombreuses complications comme la réaction greffe contre hôte (Ferrara et Deeg 1991) et des pathologies associées aux traitements pré-transplantation des patients (conditionnement) comme l'ostéoporose (Weilbaecher 2000).

2.2. Nouvelles applications thérapeutiques de la transplantation de moelle osseuse : traitement des maladies des CSM

Les CSM sont responsables de certaines maladies du squelette du fait d'une mutation génétique ou de la diminution de leur activité avec l'âge, comme l'atteste de nombreux modèles animaux (Camacho *et coll.* 1999; Chen *et coll.* 2002; Watanabe et Hishiya 2005). Ceci est bien illustré par le fait que ces CSM extraites d'animaux malades, peuvent reproduire chez des animaux sains le phénotype malade après transplantation (Bianco *et coll.* 1998). Les CSM sont co-transplantées avec les CSH lors de la TMO. Le devenir des CSM dans l'organisme receveur n'est pas clair et leur devenir dans la moelle osseuse hôte est controversée (Bianco et Gehron Robey 2000). Les CSM semblent capables de se loger dans la moelle osseuse après injection intraveineuse (Mosca *et coll.* 2000; Devine *et coll.* 2001; Dickhut *et coll.* 2005) et se différencier en ostéoblastes puis en ostéocytes (Hou *et coll.* 1999; Nilsson *et coll.* 1999) .

Les premières études précliniques dans ce domaine ont porté sur l'ostéogénèse imparfaite (Pereira *et coll.* 1998). Cette pathologie est une anomalie génétique d'un des deux gènes codant pour le collagène de type I produit par les ostéoblastes. Elle engendre une ostéopénie généralisée qui mène à une grande fragilité avec de nombreuses fractures, des difformités et des retards de croissance. Aucun traitement curatif n'existe, même si le pamidronate a montré quelques potentiels thérapeutiques (Glorieux *et coll.* 1998). L'équipe d'Horwitz a réalisé une transplantation allogénique de moelle osseuse totale chez trois enfants atteints d'ostéogénèse imparfaite. Trois mois après la prise de greffe, les jeunes sujets avaient une augmentation de 44 - 77 % de la densité osseuse, de la vitesse de croissance et une diminution du nombre de fractures (Horwitz *et coll.* 1999; Horwitz *et coll.* 2001). Ces premiers résultats ont été améliorés par une transplantation de CSM amplifiées *ex vivo*, plusieurs mois après la première TMO (Horwitz *et coll.* 2002). Des résultats similaires ont été observés chez des enfants atteints du syndrome de Hurler ou de leucodystrophie métachromatique après des injections répétées de CSM allogéniques (Koc *et coll.* 2002). Sur quatre patients atteints du syndrome de Hurler, il a été observé une amélioration significative de la conduction neuronale. La densité minérale osseuse a été maintenue ou légèrement augmentée chez tous les patients. Le potentiel thérapeutique de la TMO pour les maladies des tissus mésenchymateux réside dans la réussite de la greffe des CSM, or ces cellules sont minoritaires dans la moelle osseuse. Certains auteurs préconisent la transplantation de CSM préalablement sélectionnées et amplifiées *ex vivo* ou encore l'implantation directement au niveau du tissu à régénérer. La transplantation de cellules en site intra-osseux (Ikehara 2005) a permis d'obtenir la rémission d'une maladie auto-immune chez la souris (Kushida *et coll.* 2001) et la prévention de l'ostéoporose sénile chez la souris SAMP6 à vieillissement précoce (Ichioka *et coll.* 2002). Le développement des thérapies cellulaires pour la réparation du tissu osseux représente une porte ouverte pour la mise en place de la thérapie génique (Caplan et Mosca 2000).

2.3. Le conditionnement : l'irradiation corporelle totale

Le conditionnement est le traitement préparatoire reçu par le receveur d'une transplantation de moelle osseuse pour diminuer, voire supprimer les processus de rejet. Il consiste en une chimiothérapie associée ou non à une irradiation corporelle totale

(Vriesendorp 2003). La chimiothérapie comprend différents immunosuppresseurs associés ou non à des glucocorticoïdes et des antimétabolites. Ces produits ont des effets sur le microenvironnement osseux et donc participent à la perte osseuse induite après greffe (Weilbaecher 2000).

2.3.1. Principes

La radiothérapie correspond à l'utilisation thérapeutique des radiations ionisantes. Le gray (Gy) représente aujourd'hui l'unité de dose des radiations ionisantes absorbées, qui est équivalente à l'énergie absorbée par une quantité de matière donnée (1Gy = 1 J/Kg). Elle est réalisée seule ou après chirurgie pour le traitement de certains cancers ou associée à une chimiothérapie, principalement dans le cadre du conditionnement avant une transplantation allogénique. Les objectifs de l'irradiation corporelle totale sont une immuno- et myélosuppression suffisantes pour permettre la prise de la greffe, la création de l'espace médullaire utile à l'installation du greffon et la réduction de la masse des cellules tumorales (Ozsahin *et coll.* 1992). Elle peut-être réalisée en une seule dose ou être fractionnée. Les radiations ionisantes utilisées habituellement en thérapeutique humaine sont des photons issus du cobalt 60. Les irradiations corporelles totales sont fractionnées en six séances à raison de 2 Gy par jour limitant la dose entre 6 et 11 Gy (Hoffstetter *et coll.* 2003). La souris est le modèle animal le plus utilisé pour les études sur la transplantation de moelle osseuse. La dose d'irradiation létale généralement utilisée est de 9 Gy.

Les effets cellulaires et tissulaires des radiations ionisantes sont les conséquences de lésions de l'ADN principalement (Little 1993). Les effets des particules ionisantes sur l'ADN peuvent être directs ou indirects, par l'intermédiaire des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau cellulaire. Les radicaux libres produits induisent également des altérations des membranes cellulaires (péroxydation des lipides) et des protéines, majoritairement au niveau des cystéines.

2.3.2. Les effets de la radiothérapie sur le tissu osseux

La radiothérapie des os est associée à une perte osseuse, responsable d'une augmentation de la fragilité osseuse et du taux de fractures (Gilsanz *et coll.* 1990; Miro et Orecchia 2002; Baxter *et coll.* 2005), des ostéonécroses (Dalinka et Mazzeo 1985; Fu

et coll. 1994), une altération de la croissance osseuse (Probert et Parker 1975) et de sa cicatrisation (Arnold *et coll.* 1998) et des ostéosarcomes radio-induits (Kalra *et coll.* 2007).

Les cellules sont d'autant plus radiosensibles qu'elles sont peu différenciées et qu'elles se divisent beaucoup (Bergonie et Tribondeau 2003). Au niveau du tissu osseux, ce sont les cellules hématopoïétiques et les différents progéniteurs à forts taux de prolifération qui seront majoritairement atteints. La perte des cellules hématopoïétiques après irradiation modifie grandement le microenvironnement osseux ce qui entraîne des conséquences sur les cellules stromales et cellules osseuses, le remodelage, le modelage, la vascularisation et les propriétés biomécaniques. L'irradiation corporelle totale peut également entraîner un hypogonadisme ayant des répercussions sur le métabolisme osseux (Bakker *et coll.* 1999). Mais les radiations ionisantes ont également des effets directs sur le tissu stromal et le tissu osseux (Galotto *et coll.* 1999) : les principales altérations seront vasculaires et cellulaires.

Effets sur le système vasculaire : Les radiations ionisantes induisent une perte de vascularisation des tissus osseux, par le développement d'artérites oblitérantes avec gonflement et augmentation du nombre de vacuoles dans le cytoplasme des cellules endothéliales (Hopewell 2003). A plus long terme, le développement de fibrose vasculaire est en partie responsable des ostéonécroses (Fu *et coll.* 1994).

Effets sur les cellules osseuses : L'irradiation induit une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline, observée par histochimie, et une diminution de la production de collagène suggérant une altération des ostéoblastes (Savostin-Asling et Silverman 1978). L'activité ostéoclastique n'est pas altérée. Le nombre d'ostéoclastes est même augmenté au niveau des zones localement irradiées, induisant une augmentation du nombre de lacunes de résorption. La majorité des ostéoclastes provient des sites non irradiés et sont recrutés par les différents facteurs produits lors de l'inflammation radio-induite. Le nombre de lacunes ostéocytaires vides augmente après irradiation (Sugimoto *et coll.* 1993; Takahashi *et coll.* 1994), mais les ostéocytes sont des cellules considérées comme radiorésistantes et leur mort est plutôt attribuée à l'hypovascularisation.

Effets sur les CSM : Il a été montré que les patients ayant reçu une TMO présentent une forte diminution du nombre de CSM et de leur différenciation ostéoblastique *ex vivo* (Piersma *et coll.* 1983; Galotto *et coll.* 1999; Lee *et coll.* 2002). Les patients ayant reçu également une chimiothérapie, il est difficile dans ces cas cliniques d'attribuer les effets observés à la radiothérapie seule. Une étude *in vitro* a montré que l'irradiation

d'une culture de CSM induit une diminution de leur prolifération et de leur différenciation ostéoblastique (Li *et coll.* 2007).

La TMO ne permet pas de prévenir les pertes osseuses et les modifications du métabolisme osseux également observées après transplantation des organes solides (Cohen et Shane 2003; Kerschman-Schindl *et coll.* 2004). La restauration d'une masse osseuse normale a été obtenue chez des patients plusieurs années après TMO et après arrêt des traitements immunosuppresseurs (Kananen *et coll.* 2002). L'implication des cellules transplantées par rapport aux cellules de l'hôte dans le remodelage post-transplantation n'est pas clairement définie.

3. INGENIERIE TISSULAIRE

3.1. Définitions

Le but de l'ingénierie tissulaire est de constituer un substitut biologique qui permettra de restaurer, maintenir, améliorer les fonctions tissulaires altérées suite à des maladies ou des traumatismes (Langer et Vacanti 1993). Le principe général est de combiner des cellules avec un support, naturel ou synthétique, pour construire un tissu vivant tridimensionnel. Celui-ci doit être fonctionnellement, structurellement et mécaniquement équivalent ou meilleur que le tissu devant être remplacé ou comblé (figure 5) (Stock et Vacanti 2001). Le tissu osseux est un candidat de choix pour l'ingénierie tissulaire car il est facile d'amplifier des cellules ayant un potentiel de différenciation ostéoblastique à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. L'amplification de cellules *in vitro* induit des coûts supplémentaires et des risques, tels des contaminations bactériennes ou virales et expose à un risque d'altérations génétiques pouvant aller jusqu'au développement de tumeurs. Le risque de formation de tumeurs après transplantation de CSM semble cependant très bas et l'utilisation des cellules amplifiées *in vitro* est autorisée pour la réparation de défauts cartilagineux (Peterson 1996; Hunziker 2002).

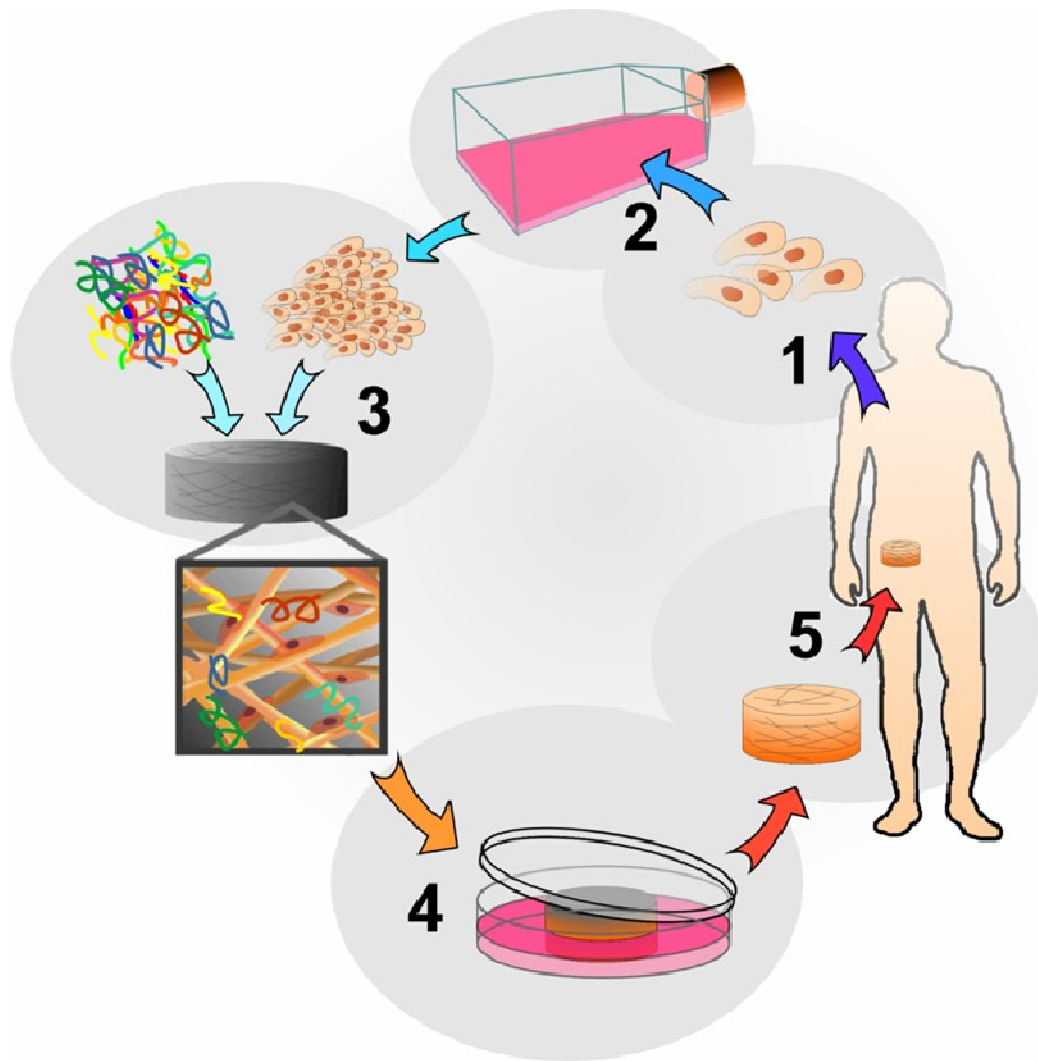


Figure 5 : Schématisation du principe de l'ingénierie tissulaire.

(1) les cellules sont extraites du patient, (2) éventuellement amplifiées in vitro, (3) déposées sur une matrice tridimensionnelle avec éventuellement des facteurs de croissance, (4) laissées adhérer, coloniser le matériau ou cultivées plus longtemps pour permettre leur éventuelle différenciation et le dépôt d'une matrice extracellulaire. (5) Réimplantation chez le patient.

D'après http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/images/background/TE_model_large.jpg

3.2. Applications thérapeutiques

Les premières utilisations cliniques de l'ingénierie tissulaire pour la réparation de défauts osseux de grande taille (de 4 à 7 cm) au niveau des os des membres ont été décrites en 2001 par Quarto *et coll* (Quarto *et coll.* 2001). Les auteurs ont comblé le défaut osseux avec une céramique d'HA poreuse contenant les cellules stromales de moëlle osseuse, préalablement amplifiées en culture et déposées la veille de l'implantation sur la céramique. Une complète fusion entre l'implant et l'os a été observée 5 à 7 mois après l'opération (Marcacci *et coll.* 2007). Les analyses radiologiques, microtomographiques et angiographiques, réalisées chez ces mêmes patients 6 à 7 ans postopératoires, ont révélé une cicatrisation complète avec persistance d'un canal médullaire au sein de l'implant, et établissement d'une nouvelle vascularisation. Aucun signe de résorption de l'implant n'a été observé. La même année, Vacanti *et coll* ont décrit la reconstruction d'une phalange du pouce d'un patient par l'implantation de cellules autologues du périoste déposées sur du corail (Vacanti *et coll.* 2001). Warnke *et coll* ont rapporté la reconstruction d'une mandibule chez un patient de 56 ans ayant subi 8 ans plus tôt une mandibulectomie (plus de 7 cm) pour l'exérèse d'une tumeur (Gronthos 2004; Warnke *et coll.* 2004). Un grillage de titane, élaboré suivant la morphologie du patient, a été rempli par des blocs d'HA recouverts de BMP-7 et des cellules stromales de moëlle osseuse autologues puis implanté dans un muscle dorsal du patient afin d'initier la néoformation osseuse et la néovascularisation. Après 7 semaines, le greffon mandibulaire a été mis en place avec le pédicule vasculaire. Le patient a retrouvé une mastication au bout de 4 semaines (Warnke *et coll.* 2006). L'association des cellules stromales autologues pré-amplifiées avec une céramique d'HA a également été utilisée pour le comblement d'une cavité osseuse après exérèse d'une tumeur chez trois patients (Morishita *et coll.* 2006). L'ingénierie tissulaire a également été utilisée pour l'augmentation du plancher du sinus maxillaire. Dix huit patients sur vingt-sept ont présenté la formation d'os trabéculaire minéralisé, 3 mois après l'implantation (Schimming et Schmelzeisen 2004).

3.3. Les biomatériaux

Au niveau macroscopique, ils vont permettre de garder le volume de la perte de substance disponible pour la reconstruction osseuse en empêchant l'invagination des masses musculaires environnantes dans la zone lésée. A l'échelle tissulaire, le biomatériau va jouer le rôle de charpente sur laquelle va se former le tissu osseux. Au niveau cellulaire, il va procurer une surface développée importante sur laquelle les CSM vont pouvoir adhérer, proliférer et se différencier. Le cahier des charges du matériau support est encore sujet à débats. Idéalement le matériau support doit être :

- **Biocompatible**, c'est-à-dire qu'il ne doit pas déclencher de réaction inflammatoire intense qui pourrait entraîner une modification du potentiel ostéogène des CSM ou leur élimination. De même, les produits dérivés de sa dégradation ne doivent être ni cytotoxiques ni pro-inflammatoires (Hollinger et Battistone 1986).
- **Ostéoconducteur**, c'est-à-dire autoriser l'adhésion, la migration des cellules en son sein, le développement d'un réseau vasculaire et le dépôt de tissu osseux en contact direct avec le matériau sans aucune interposition fibreuse. L'ostéoconduction d'un biomatériau est gérée par les propriétés chimiques (hydrophobicité, polarité...) et physiques (rugosité, cristallinité...) de sa surface mais également de sa structure et microstructure (porosité, interconnectivité...) (Cornell et Lane 1998).
- **Poreux**. La porosité d'un biomatériau doit être adaptée à celle de l'os au niveau du site de greffe, qui varie en fonction de la localisation et de la fonction. La taille minimum des pores permettant une ostéoformation au sein du biomatériau est de 100 μm , mais la taille optimale semble être entre 300 et 400 μm (Karageorgiou et Kaplan 2005). Plus que la taille des pores, l'interconnectivité est un paramètre primordial (Chang *et coll.* 2000).
- **Résistant mécaniquement**, quand cela est nécessaire, pour supporter les charges élevées de la fonction de soutien du matériel osseux.
- **Résorbable** afin de permettre son remplacement progressif par un tissu osseux néoformé. Sa résorption devrait être concomitante à la formation osseuse. En effet, trop rapidement résorbé, il ne pourrait pas servir de charpente sur laquelle les CSM vont déposer la matrice osseuse. Trop lentement résorbé, il empêcherait la formation osseuse en occupant un volume important de la lésion.
- **Stérilisable**, sans perte de propriétés et sa fabrication doit être compatible avec une production de grade clinique à l'échelle industrielle.

- **Malléable**, le biomatériau doit pouvoir être mis en forme de façon aisée au bloc opératoire afin de pouvoir l'adapter au mieux à l'anatomie du site de lésion.

Les céramiques de phosphates de calcium et les polymères sont les biomatériaux les plus étudiées pour l'ingénierie du tissu osseux (Burg *et coll.* 2000; Shin *et coll.* 2003). Les matrices osseuses allogéniques ou xénogéniques purifiées représentent une autre source de biomatériau de remplacement pouvant être combiné avec des cellules. Une seule étude jusqu'à présent, à ma connaissance, a porté sur l'utilisation d'os trabéculaire bovin purifié combiné à des ostéoblastes allogéniques pour le comblement d'un défaut de grande taille au niveau du crâne de rats (Kneser *et coll.* 2006). Or les matrices osseuses purifiées présentent de nombreuses qualités : leur micro- et macro-architecture, leur composition chimique (phase minérale) et leurs propriétés mécaniques correspondent parfaitement à celles de l'os du site receveur. De plus, elles sont disponibles en grandes quantités. Ces matrices ont été utilisées pour la réalisation d'allogreffes osseuses (Keith 2004). L'adhésion, la prolifération et la sécrétion d'une matrice minéralisée par des cellules ostéogéniques cultivées sur les matrices osseuses purifiées ont été démontrées (Stangenberg *et coll.* 2005; Dumas *et coll.* 2006).

3.4. Les cellules ostéogéniques

Les CS adultes sont les seules à être utilisées en clinique actuellement. Malgré leurs potentiels de multiplication *in vitro* plus faible que les CS embryonnaires, elles ont l'avantage de ne pas présenter le problème d'immunocompatibilité des CS embryonnaires puisqu'elles peuvent être isolées d'un prélèvement réalisé chez le patient. Les CS adultes à potentiel ostéogénique sont les CSM dont le nombre dans la moelle osseuse diminue avec l'âge du patient (Muschler *et coll.* 2001; Chen 2004). Leur prélèvement nécessite un geste invasif. Pour ces raisons, de nouvelles sources de cellules ostéoformatrices sont recherchées dans des tissus plus accessibles ou plus abondants (Jensen et Drapeau 2002).

3.4.1. Les autres sources de cellules ostéogéniques

- Les cellules adhérentes du sang

Il est possible d'obtenir une population cellulaire similaire aux CSM en terme de morphologie (cellules adhérentes, prolifératives et fibroblastiques) à partir de prélèvements sanguins. En utilisant des agents de différenciation appropriés, elles sont capables de s'orienter vers un phénotype ostéoblastique ou adipocytaire *in vitro* (Zvaifler *et coll.* 2000; Eghbali-Fatourechchi *et coll.* 2005). Lorsqu'elles sont associées à un support ostéoconducteur et implantées *in vivo*, elles forment du tissu osseux. Elles possèdent donc des propriétés de différenciation et d'ostéogénicité semblables à celles des CSM, dont le phénotype est d'ailleurs assez proche (Kuznetsov *et coll.* 2001). Bien que faciles à obtenir, ces cellules ne sont présentes dans le sang circulant que dans des proportions extrêmement faibles chez l'homme. Il faudra encore de nombreux travaux fondamentaux sur ces cellules avant d'envisager les premiers essais cliniques.

- Les CSM du muscle

La formation osseuse ectopique au niveau du muscle squelettique est un phénomène connu, suggérant l'existence de cellules ostéogéniques dans ce tissu. La présence d'ostéoprogéniteurs dans le muscle squelettique a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Bosch *et coll.* 2000; Lee *et coll.* 2000). Ces ostéoprogéniteurs peuvent provenir de différentes sous-populations de cellules du tissu musculaire, comme les cellules satellites (Asakura *et coll.* 2001; Ozeki *et coll.* 2007), la population SP (Asakura *et coll.* 2002), les MAPCs (Jiang *et coll.* 2002) ou les péricytes (Dellavalle *et coll.* 2007). Les cellules souches dérivées du tissu musculaire ont été utilisées dans de nombreuses études précliniques pour l'ingénierie tissulaire et la thérapie génique dans l'optique d'une réparation du tissu osseux (Usas et Huard 2007).

- Les CSM du tissu adipeux

Le tissu adipeux est une autre source intéressante de cellules ostéogéniques car il peut provenir de rebuts opératoires (Dicker *et coll.* 2005). Contrairement à la moelle osseuse, le tissu adipeux peut être prélevé en quantité relativement importante et ne semble pas diminuer avec l'âge. L'obtention d'une suspension cellulaire nécessite des manipulations supplémentaires pour isoler les cellules de type fibroblastique suite à une lipoaspiration (Zuk *et coll.* 2001). Une fois la différenciation ostéoblastique induite, les cellules dérivées du tissu adipeux présentent un phénotype similaire aux CSM (Winter

et coll. 2003) mais un potentiel ostéogénique inférieur à celui des cellules dérivées de la moelle osseuse (Im *et coll.* 2005).

3.4.2. Différenciation ostéogénique

Les CSM peuvent être engagées dans la voie de différenciation ostéoblastique par des conditions de cultures particulières, avant leur implantation chez l'hôte. La différenciation peut-être induite par des composés chimiques et/ou des protéines (cytokines et facteurs de croissance). La stimulation chimique la plus répandue est la combinaison de dexaméthasone (Dex), acide ascorbique-2-phosphate et de β -glycérophosphate (Grigoriadis *et coll.* 1988; zur Nieden *et coll.* 2003). Le mode d'action de la Dex est variable en fonction de l'espèce (Bellows *et coll.* 1998), de l'état de différenciation initial des cellules et du microenvironnement (Phinney *et coll.* 1999). La présence de Dex à des concentrations physiologiques est nécessaire pour la différenciation et notamment l'augmentation du nombre de cellules AlkP⁺, des cellules de moelle osseuse de rat et humaine (Cheng *et coll.* 1994; Aubin 1999). Les effets de la Dex sur la moelle osseuse de souris sont controversés (Fried et Benayahu 1996 ; Chen et Fry 1999; Chen *et coll.* 2004). La prostaglandine E₂ (Weinreb *et coll.* 1999) et la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (van Leeuwen *et coll.* 2001) sont également des composés ostéoinducteurs. Les cytokines/facteurs de croissance ostéoinducteurs majeurs sont les BMPs et particulièrement les BMP-2, -4, -6, -7 et -9 (Reddi 1998; Cheng *et coll.* 2003), l'interleukine-6 (Taguchi *et coll.* 1998) et l'hormone de croissance (Kroger *et coll.* 1997). Cependant, la culture en présence de protéines animales ou humaines pouvant se fixer à la surface des cellules, peut augmenter l'antigénicité de la construction biomatériau/cellules. L'utilisation de sérum est également sujette à discussion mais sa présence est préférée pour l'amplification des cellules (Kuznetsov *et coll.* 2000). En plus de leur potentiel immunogène, la composition exacte des sérums est variable et non déterminée. La différenciation ostéogénique dépend également du sérum utilisé (Abdallah *et coll.* 2006). Pour des applications cliniques, le sérum du patient remplace le sérum de veau dans les derniers temps de culture. Il existe également dans le commerce des substituts synthétiques de sérum, de composition bien déterminée et non immunogènes, déjà utilisés dans des modèles animaux d'ingénierie du tissu osseux (Kruyt *et coll.* 2004). Une stimulation mécanique des cultures cellulaires permettrait une

augmentation de la différenciation ostéogénique (Mauney *et coll.* 2004; Koike *et coll.* 2005).

3.5. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance jouent un rôle central lors des réparations osseuses. Ils proviennent de la matrice osseuse et des tissus environnants. Ils agissent sur le recrutement des CSM vers le site de lésion, sur leur prolifération et sur leur différenciation en cellules osseuses. Ils induisent également l'angiogénèse. Aussi, ces protéines font l'objet d'une attention particulière pour l'ingénierie du tissu osseux. Ces facteurs comprennent les facteurs ostéogéniques TGF- β , BMPs, FGF, PDGF et IGF (Schmidmaier *et coll.* 2002; Degat *et coll.* 2005) et des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Kofron et Laurencin 2006). L'effet des facteurs de croissance sur la formation et la réparation osseuse dépend du choix de la protéine et de combinaisons éventuelles, de la dose utilisée et du mode d'application. Les facteurs de croissance étant sujets à une élimination rapide par l'organisme, ils nécessitent la mise en œuvre d'un système de libération qui permettrait de potentialiser leur activité biologique de façon locale, contrôlée et durable au niveau du site d'implantation. Le système de libération doit, en outre, permettre de limiter la quantité de protéines libérées, réduisant ainsi sa diffusion systémique et donc les risques d'apparition d'effets non désirables. Dans cette optique, trois stratégies se présentent pour induire *in situ* une néoformation osseuse :

- la protéine est libérée par un biomatériau. La libération se fait suite à la dégradation du biomatériau ou par simple diffusion (Winn *et coll.* 1999).

- Thérapie génique : l'ADN codant pour le facteur de croissance est introduit directement au niveau de la lésion chez le patient. Le gène est transfecté dans la cellule hôte par des vecteurs plasmidiques ou viraux (Phillips *et coll.* 2007; Betz *et coll.* 2008).

- Thérapie cellulaire (thérapie génique *ex vivo*) : les cellules du patient sont extraites, mises en culture, transfectées avec le gène du facteur de croissance comme dans le cas de la thérapie génique, puis réimplantées dans l'organisme avec un biomatériau (Gamradt et Lieberman 2004; Kimelman *et coll.* 2007).

L'utilisation de facteurs de croissance en ingénierie tissulaire pour la réparation du tissu osseux est très limitée en clinique. Certains auteurs ont testé l'efficacité des protéines recombinantes BMP-2 et BMP-7 (OP-1) pour le traitement de fractures tibiales non consolidées et de fusions rachidiennes, en comparaison avec une autogreffe (Govender *et coll.* 2002; McKay et Sandhu 2002; Swiontkowski *et coll.* 2006). Le système de libération de la protéine consistait en une éponge de collagène ou de granules de phosphates de calcium. Malgré les doses importantes de BMP implantées, les bons résultats cliniques obtenus ont permis l'autorisation européenne de mise en marché relative à l'utilisation de la rhBMP-2 pour le traitement des fractures du tibia chez l'homme.

3.6. Méthodes

Plusieurs protocoles de combinaison biomatériau/cellules peuvent être envisagés et testés en fonction des applications souhaitées.

1- La moëlle osseuse totale est associée extemporanément au biomatériau, et l'ensemble est immédiatement implanté (Le Nihouannen *et coll.* 2007). Ce protocole a l'avantage d'être réalisable en préopératoire et de ne pas nécessiter d'équipement important. Cependant, dans ce cas, le nombre de cellules ostéogéniques est limité par la quantité de moëlle osseuse récupérée et par la proportion de CSM qu'elle contient. Il est d'ailleurs impossible de connaître le nombre de cellules ostéogéniques au moment de l'implantation. D'autres protocoles, plus performants pour la régénération osseuse, ont été élaborés.

2- La moëlle osseuse totale est cultivée plusieurs jours sur le biomatériau avant son implantation. Cette stratégie permet de sélectionner les cellules qui adhèrent au biomatériau, d'obtenir une meilleure répartition des cellules et si les conditions et le temps de culture le permettent, de faire synthétiser par les cellules une matrice extracellulaire (Mendes *et coll.* 2002).

3- La moëlle osseuse est cultivée en boîte de culture, ce qui permet de sélectionner les cellules adhérentes de la moëlle osseuse (CSM), dans un milieu de

culture permettant leur prolifération. Les cellules peuvent alors être modifiées génétiquement pour exprimer un facteur ostéogénique par exemple. Les CSM sont ensemencées sur le biomatériau quelque temps avant l'implantation.

4- Les CSM préalablement amplifiées et éventuellement génétiquement modifiées, sont ensemencées sur le biomatériau. L'ensemble est laissé en culture plusieurs jours avant l'implantation. Les cellules sur le biomatériau peuvent ensuite être placées dans un milieu ostéogénique pour induire l'engagement des CSM dans la lignée ostéoblastique et la sécrétion d'une matrice extracellulaire (Ohgushi et Caplan 1999).

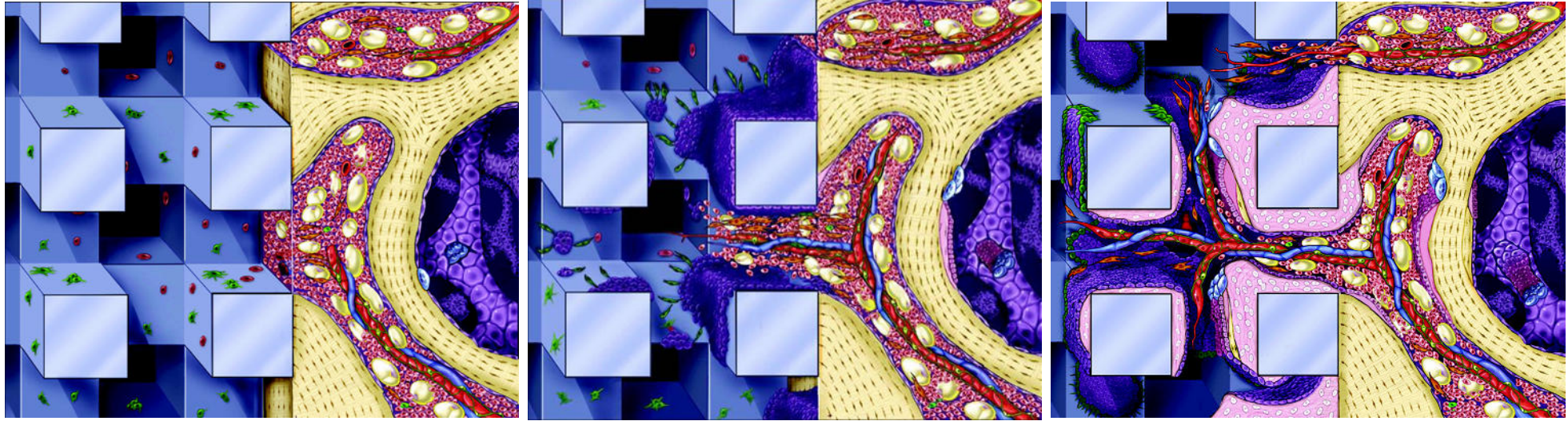
Les nombreuses études précliniques réalisées *in vitro* ou *in vivo* en site ectopique ou dans des modèles animaux de défauts osseux, ont permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant lors de l'implantation d'un biomatériau contenant des cellules de moelle osseuse (Muschler *et coll.* 2004) (Figure 6). Plusieurs critères sont devenus évidents pour permettre une réparation tissulaire optimale :

- Le **nombre de cellules** implantées doit être suffisamment important pour que des cellules persistent après implantation (Puelacher *et coll.* 1994). En effet, de nombreuses cellules ne survivent pas à l'implantation, principalement faute d'oxygène et de nutriments (Kneser *et coll.* 2006).

- La **population cellulaire** ensemencée sur le biomatériau doit être la plus enrichie possible en cellules ostéogéniques. Elles doivent pouvoir être différenciées en cellules ostéoblastiques ou cartilagineuses dans les plus brefs délais *in vitro* ou *in vivo*. La préculture des cellules, avant leur dépôt sur le biomatériau et la culture de cette construction dans un milieu ostéogénique, semblent être la méthode de choix pour une meilleure formation osseuse (Ohgushi et Caplan 1999).

- La **néovascularisation** de la construction après son implantation est un critère limitant pour l'efficacité de la greffe. Si les cellules sur les bords du biomatériau peuvent bénéficier de l'oxygène et des nutriments des tissus environnants, les cellules situées au centre du biomatériau doivent être alimentées en oxygène et nutriments *via* la circulation sanguine. Des procédés permettant l'augmentation de la vascularisation du greffon doivent être développés, comme l'utilisation de facteurs angiogéniques (Peattie *et coll.* 2004; Wenger *et coll.* 2004).

Figure 6 : Illustration de la formation osseuse au niveau d'un biomatériau implanté avec des cellules ostéogéniques d'après Muschler *et coll*, 2004.



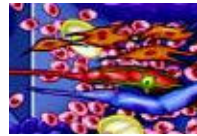
I

Après implantation, les cellules ostéogéniques près de la surface de l'implant bénéficient d'un environnement quasi normal en termes de concentration en oxygène, glucose et autres nutriments. Les cellules situées plus en profondeur sont dans un environnement de plus en plus pauvre en oxygène et nutriments puisque toutes les cellules sont en compétition les unes avec les autres. L'hypoxie modérée constitue un stimulus pour leur prolifération et la sécrétion de cytokines chimio-attractantes pour les cellules de l'hôte.



II

Parmi les cellules migrant dans la matrice :



cellules inflammatoires (roses), progéniteurs de l'hôte (orange) et des cellules endothéliales permettant l'angiogénèse. Avec l'arrivée des nouvelles cellules au sein de l'implant, la compétition pour l'oxygène et les nutriments augmente en attendant la vascularisation. On comprend à ce moment, la nécessité de limiter, au moment de l'implantation le nombre de cellules non ostéogéniques dans la matrice. Les cellules souches et progéniteurs ayant survécu et colonisé l'implant, se différencient pour former un réseau d'os non lamellaire (woven bone).

III

Après un certain temps on peut observer un remodelage au niveau de l'implant et de l'os adjacent. Le woven bone est progressivement remplacé par de l'os lamellaire formant un réseau interconnecté qui s'étend plus profondément dans l'implant. Un remodelage vasculaire se produit en parallèle. Les espaces délimités par les travées renferment des éléments médullaires. Des cellules souches et des ostéoprogéniteurs continuent de migrer vers le centre de l'implant.

III. MODELES D'ETUDES PRECLINIQUES

1. MODELES ANIMAUX DE DEFICIT OSSEUX

Les principaux animaux utilisés comme modèles de déficits osseux sont les rats, lapins, chiens, moutons et les primates. Les pièces osseuses utilisées sont le crâne, la mandibule, le tibia et le fémur. Le modèle sera sélectionné en fonction du biomatériau et des critères à évaluer.

Comme toutes les études précliniques, les essais de thérapies cellulaires doivent se rapprocher le plus possible des conditions cliniques. Dans le cas de l'ingénierie tissulaire pour la réparation du tissu osseux, les études précliniques tendront à respecter les proportions des déficits osseux en fonction des modèles et à utiliser des cellules d'origine humaine. L'utilisation de cellules humaines nécessite l'utilisation d'animaux immunodéficients (nude), limitant l'expérimentation aux petits animaux tels la souris et le rat. Le coût élevé des rats nude a conduit au développement de l'utilisation de la souris comme modèle de déficit osseux même si sa petite taille rend les expérimentations plus délicates. Les études d'ingénierie tissulaire peuvent être réalisées chez de gros animaux en utilisant des cellules autologues (Petite *et coll.* 2000) ou allogéniques (Yuan *et coll.* 2007).

1.1. Le crâne

Un déficit circulaire peut être réalisé sur la totalité de l'épaisseur de l'os pariétal du crâne. Cet os fait parti des os plats à formation osseuse membranaire. Il n'est pas soumis à des contraintes mécaniques : ce n'est pas un site en charge. Le potentiel ostéogénique des constructions à implanter est testé en utilisant un défaut de taille critique. La taille critique pour chaque espèce est définie comme la plus petite taille du défaut qui ne se comble pas spontanément pendant une certaine période (le plus souvent 6 mois) (Schmitz et Hollinger 1986). La taille critique au niveau du crâne est de 4 mm chez la souris (Aalami *et coll.* 2004), 8 mm chez le rat (Schmitz *et coll.* 1990) et 15 mm chez le lapin (Frame 1980).

Les avantages de ce modèle sont :

- une procédure opératoire simple : le crâne est accessible par une simple incision de la peau ce qui diminue grandement le risque d'infections. Le trou est réalisé à l'aide d'un trépan fixé à une perceuse. Les précautions à prendre sont de bien irriguer lors du forage et de ne pas détériorer la dure mère pour éviter le développement d'hématomes intracrâniens.

- aucune fixation n'est nécessaire. La construction implantée est maintenue en place par le cerveau en dessous et la peau au dessus.

- dans certaines conditions, l'animal peut être son propre témoin puisque 2 défauts peuvent-être réalisés sur le même crâne.

Les principaux inconvénients sont :

- l'épaisseur du crâne et le diamètre du défaut limitent la taille et la forme des biomatériaux pouvant être utilisés.

- L'analyse radiographique ne peut-être réalisée qu'après dissection. La réparation du défaut ne peut être suivie dans le temps chez un même animal.

Ce modèle permet l'étude préclinique de stratégies thérapeutiques en chirurgie maxillo-faciale. Les études précliniques pour la chirurgie orthopédique nécessitent l'utilisation de modèles de défauts en site en charge, au niveau des os longs.

1.2. Les os longs

Les déficits osseux de grande taille des os longs peuvent-être réalisés au niveau des diaphyses (défauts des corticales), de manière segmentaire (Reyes *et coll.* 2007) ou partielle (Colnot *et coll.* 2005) ou au niveau des condyles (os trabéculaire) (Shao *et coll.* 2006). De manière générale la procédure opératoire est plus invasive que pour les défauts crâniens. Les défauts segmentaires sont réalisés à l'aide d'une scie circulaire et nécessitent la plupart du temps une fixation externe ou interne. Les paramètres de réparation comme la réaction périostéale (formation d'un cal), la qualité de l'union des ostéotomies et le remodelage osseux peuvent-être quantifiés par analyses radiologiques et/ou histologiques selon un système de scores de 0 (minimal) à 3 (optimal) (Yuehuei et Friedman 1999). La qualité mécanique de la réparation est évaluée majoritairement par les tests de torsion (Bloemers *et coll.* 2003).

2. MARQUEURS DES CELLULES GREFFÉES (TRANSPLANTEES)

Parmi les publications décrivant la localisation des cellules de moelle osseuse après transplantation systémique ou implantation locale, beaucoup sont contradictoires. La plupart du temps, les différences techniques sont mises en cause et en particulier le type de marqueur utilisé pour différencier les cellules greffées des cellules hôtes (Brazelton et Blau 2005). Chaque technique présente des avantages et des limitations qui doivent être pris en considération afin d'optimiser leurs utilisations et éviter les résultats faussés.

2.1. Les chromosomes X et Y – hybridation *in situ*

Lorsque le donneur et le receveur ne sont pas du même sexe, il est possible de différencier les cellules greffées des cellules hôtes par la détection des chromosomes Y et/ou X (figure 7) (Nilsson *et coll.* 1999; Cowan *et coll.* 2004). La détection se fait par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Cette technique est très spécifique et très sensible car elle est basée sur l'association d'une sonde d'acides nucléiques marquée, avec sa séquence complémentaire au niveau de la préparation histologique. Laborieuse, elle présente néanmoins la particularité d'être un marquage nucléaire contrairement aux autres méthodes décrites. Un tel marquage n'est visible qu'à fort grossissement.

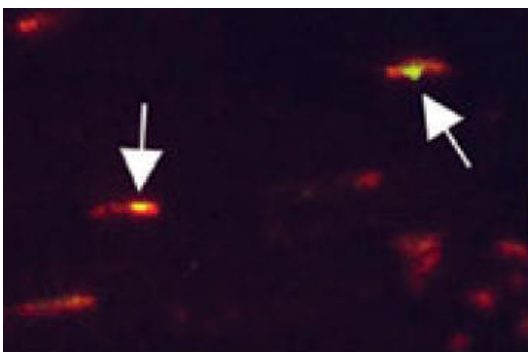


Figure 7: Mise en évidence des chromosomes X (rouge) et Y (vert) par FISH après implantation de cellules de moelle osseuse dans un défaut au niveau du crâne de souris.

Le marquage permet de distinguer les cellules du receveur (flèches) au niveau de l'os nouvellement formé (Cowan *et coll.* 2004).

2.2. La β -galactosidase (β -gal)

La β -gal est l'un des premiers marqueurs de cellules ayant été utilisé. Le gène (Lac-Z) codant pour la β -gal, extrait de bactéries peut être cloné et transfecté dans des cellules (Allay *et coll.* 1997). Mais il a été élaboré des souris transgéniques exprimant de manière constitutive la β -gal bactérienne, la souris ROSA26 (Zambrowicz *et coll.* 1997). La protéine bactérienne peut être détectée dans les tissus par des anticorps ou par son activité enzymatique, clivage d'un galactoside, générant un produit chromogène ou fluorescent pouvant être visualisé (figure 8). Un des substrats largement utilisé est le X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside) qui apparaît bleu après clivage. Or il s'avère que certains tissus des mammifères comme le foie, les reins, le pancréas, possèdent de manière significative une activité β -gal, pouvant être à l'origine de faux positifs (Cohen *et coll.* 1952; Hatton et Lin 1992). Néanmoins, les deux enzymes (des souris ROSA26 et des mammifères) semblent avoir différentes sensibilités au pH (Sanchez-Ramos *et coll.* 2000). L'utilisation de ce modèle pour tracer des cellules *in situ* nécessite une mise au point technique en fonction du tissu étudié. De plus, la β -gal est une enzyme cytoplasmique ; des précautions techniques, notamment de fixation sont nécessaires pour maintenir la protéine dans les cellules.

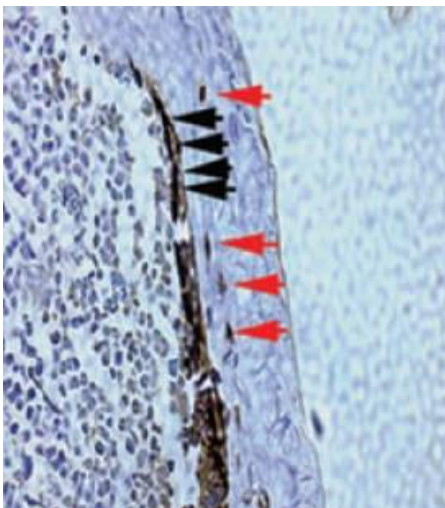


Figure 8 : Détection immunologique de la β -galactosidase sur coupe histologique de fémur de souris irradiée et transplantée avec de la moëlle osseuse de souris Rosa26.

Le marquage révèle des cellules issues du donneur et notamment des ostéocytes (flèches rouges) (Olmsted-Davis *et coll.* 2003).

2.3. Colorants vitaux

Les colorants vitaux sont d'autres marqueurs pouvant être utilisés pour tracer des cellules. Le plus utilisé est le PKH26 (Krause *et coll.* 2001). Il s'agit d'un colorant membranaire qui fluoresce en rouge. La spécificité de ce type de marqueur est qu'il n'est pas incorporé au génome des cellules. Le marquage ne consiste qu'en une simple incubation des cellules avec le colorant. En contrepartie, la quantité de colorant présent dans la membrane diminue de moitié à chaque division cellulaire, et ne permet donc pas la visualisation à long terme des cellules issues du donneur. La persistance du colorant dépend du taux de prolifération des cellules, c'est ainsi que certains auteurs ont observé un marquage 8 semaines après implantation au niveau de cellules ayant subi une différenciation (Tatebe *et coll.* 2005). De nombreux autres colorants vitaux ont été utilisés pour tracer les cellules transplantées, comme le CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimodyle ester) (Kneser *et coll.* 2006) ou le CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate), colorant cytoplasmique (Shao *et coll.* 2006).

2.4. La Green Fluorescent Protein (GFP)

La GFP est une protéine unique qui s'avère être un marqueur cellulaire de choix. Elle est originellement trouvée chez la méduse *Aequorea victoria*, puis a été modifiée afin d'obtenir une protéine plus stable et plus fluorescente. Des modifications de la protéine ont également été nécessaires pour permettre son expression par des cellules de mammifères. La variante la plus utilisée aujourd'hui est l'EGFP pour « enhanced green fluorescent protein », communément appelée GFP pour plus de simplicité. La protéine est très diffusible dans le cytoplasme mais également dans l'eau. Le fluorophore de la GFP est formé par la cyclisation des Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ et de la Gly⁶⁷, permettant un maximum d'excitation à 488 nm et un maximum d'émission à 508 nm (Heim *et coll.* 1994). De nombreux organismes transgéniques pour la GFP ont été élaborés : des plantes (Hu et Cheng 1995), le nématode (Chalfie *et coll.* 1994), la drosophile (Wang et Hazelrigg 1994), des poissons (Peters *et coll.* 1995), souris (Okabe *et coll.* 1997), rats (Yamasaki *et coll.* 2005), lapins (Al-Gubory et Houdebine 2006) et des singes (Chan *et coll.* 2001). Aucune toxicité de la GFP n'a été détectée chez ces organismes, pourtant certaines

études *in vitro* soulèvent la possibilité d'une toxicité de la GFP envers certains types cellulaires (Liu *et coll.* 1999).

Il existe à l'heure actuelle une grande variété de souris transgéniques pour la GFP, dont l'expression est sous le contrôle de différents promoteurs pouvant-être spécifiques d'un tissu (Kalajzic *et coll.* 2002; Rowe 2005; Boban *et coll.* 2006). La souris « verte » la plus répandue est celle élaborée par Okabe *et coll.*, pour laquelle l'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet et d'un enhancer de cytomégalovirus. Toutes les cellules nucléées expriment de manière constitutive la GFP. Les souris peuvent être phénotypées par simple illumination par une lumière ultraviolette. Le site d'insertion du transgène dans le génome de ces souris est inconnu, mais le phénotype homozygote pour le transgène est non viable. L'utilisation des cellules de moëlle osseuse des souris GFP-transgéniques pour la thérapie cellulaire du tissu osseux a fait l'objet de nombreuses études ayant montré que ces cellules ont un potentiel ostéogénique comparable à celui des souris contrôles (Ogawa *et coll.* 2004). Elles ont été visualisées dans de nombreux organes jusqu'à plusieurs mois après leur transplantation systémique (Ono *et coll.* 1999; Dreyfus *et coll.* 2004; Fukuda et Fujita 2005).

Comme pour la β -gal, l'observation de la GFP sur des coupes histologiques nécessite des précautions techniques rigoureuses pour des observations reproductibles. La quantité de GFP dans les cellules peut varier en fonction du type de cellules (quantité de cytoplasme) ou être diminuée par les diverses manipulations, rendant la fluorescence de la GFP difficilement discernable de l'autofluorescence des tissus. Le choix des filtres d'émission et d'excitation doit être adapté aux tissus observés. Des anticorps spécifiques de la GFP sont également disponibles et permettent une détection sensible de la protéine. Enfin, l'utilisation de la GFP comme traceur de cellule a été rendu très performante par l'utilisation de stéréomicroscopes à fluorescence permettant d'observer la GFP sur des petits animaux vivants ou des organes entiers non fixés (Yang *et coll.* 2001; Yoshimoto *et coll.* 2003) (Figure 9).

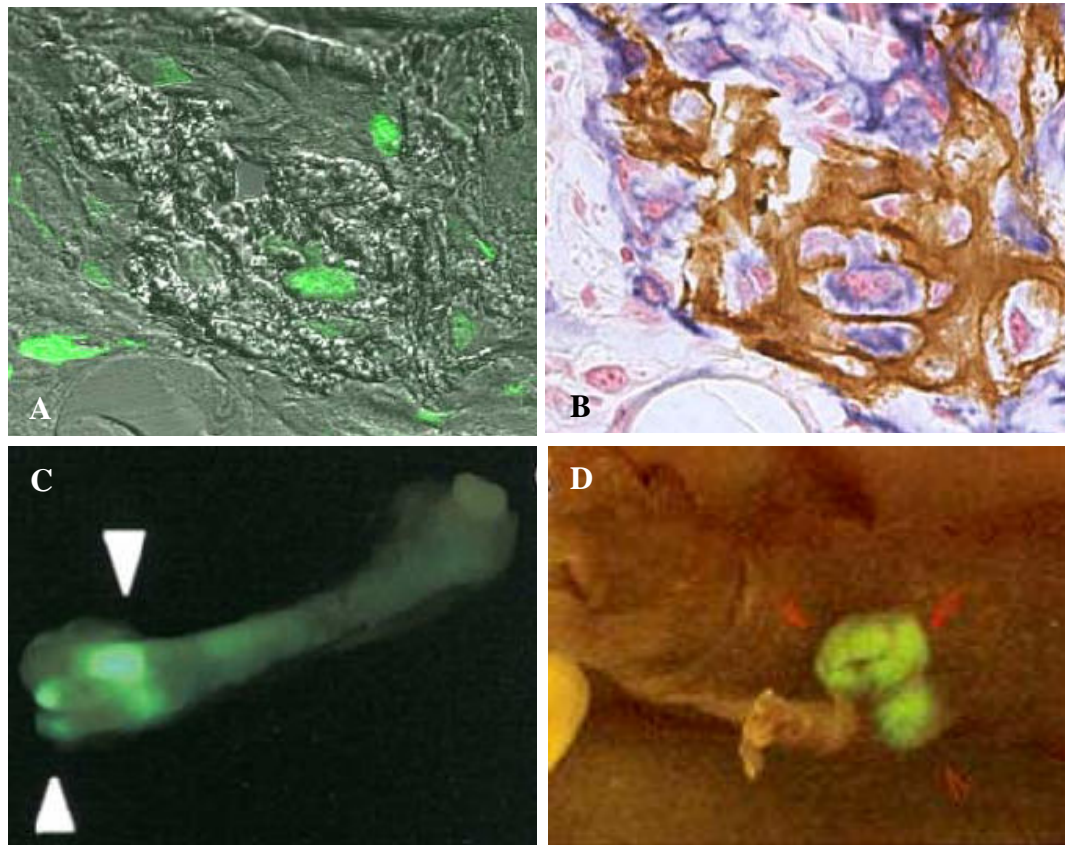


Figure 9 : Diverses applications de l'utilisation de la GFP comme traceur de cellules.

A-B : Observation des cellules GFP⁺ (A) issues de calvaria de souris transgéniques pour la GFP, 2 semaines après leur implantation en intramusculaire. Ces cellules sont localisées à la surface de travées osseuses minéralisées (B) (coloration Von kossa) (Kadowaki *et coll.* 2004).

C : Visualisation directe des cellules GFP⁺ après transplantation systémique par stéréomicroscopie à fluorescence (Yoshimoto *et coll.* 2003).

D : Suivre de l'évolution de l'angiogénèse d'une tumeur par imagerie corps entier à fluorescence. Des cellules cancéreuses humaines transfectées avec le gène de la GFP ont été implanté au niveau du bras de souris nude (Yang *et coll.* 2001).

TRAVAUX PERSONNELS

ARTICLE 1

The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility

Dumas A., Gaudin-Audrain C., Mabillean G., Massin P.,
Hubert L., Baslé M.F., Chappard D.

Biomaterials, 27(23):4204-11, 2006.

Les allogreffes sont actuellement la principale source (en terme de volume) de matériaux de comblement en chirurgie osseuse. La mise en place de banques d'os humains permet d'assurer une sélection des donneurs, la traçabilité des échantillons et la sécurisation bactérienne et virale. L'augmentation considérable de la demande en biomatériaux a conduit au développement de plusieurs sociétés qui appliquent des procédés physiques et chimiques permettant de nettoyer, purifier et désinfecter des allogreffes humaines de façon à produire des greffons propres et stériles, facilement stockables et distribuables à volonté. Cependant, il n'existe actuellement aucun consensus sur les traitements à appliquer pour la purification des allogreffes osseuses humaines. Les rares études entreprises pour vérifier le ou les effet(s) (ou inactivité) des traitements sur la qualité du greffon, se sont limitées à montrer une absence d'effets cytotoxiques des procédés mis en œuvre. Or, les procédés de délipidation et de stérilisation notamment, influent sur les propriétés mécaniques et la cytotoxicité des allogreffes (Vastel *et coll.* 2004).

Lors de cette étude nous avons reproduit 2 procédés de purification décrits dans la littérature (Frayssinet *et coll.* 1998; Moreau *et coll.* 2000) et évaluer les conséquences de chaque étape sur l'aspect histologique, morphologique et structural de la surface d'os trabéculaire humain et la cytocompatibilité des greffons ainsi purifiés.

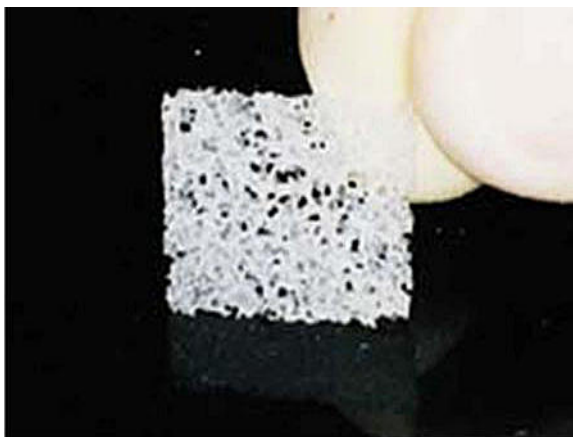
Les allogreffes ont été préparées à partir de têtes fémorales récupérées lors d'une arthroplastie de hanche (**Figure 10**). Les têtes fémorales ont été immédiatement congelées à -20°C. Des blocs d'os trabéculaire ont été découpés dans la spongieuse secondaire des têtes fémorales puis nettoyées mécaniquement sous un jet haute pression de sérum physiologique (NaCl). Des lamelles de 1 mm d'épaisseur environ ont été produites pour subir les différents traitements et les diverses analyses. Nous avons étudié la surface des allogreffes purifiées provenant de trois têtes fémorales différentes.



Tête fémorale humaine issue d'une arthroplastie totale de hanche, non fixée, conservée à -20°C.



Blocs d'os trabéculaire découpés au niveau de la spongieuse secondaire des têtes fémorales avant (à gauche) et après (à droite) nettoyage sous un jet haute pression de NaCl.



Lamelle d'os trabéculaire pouvant être traité selon les différents procédés.

Figure 10: Etapes de préparation des allogreffes avant leur purification selon les différents procédés.

Les procédés de purification étudiés sont détaillés **Figure 11**.

Le premier procédé cumule l'utilisation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'hydroxyde de sodium (NaOH).

- H_2O_2 35% est un oxydant puissant. Il est utilisé comme agent déprotéinisant. Il entre notamment dans le procédé de purification du kiel bone, greffon osseux xénogénique dont de nombreuses applications cliniques se sont révélées non satisfaisantes (McMurray 1982). H_2O_2 fait parti des formes oxygénées actives (ROS) pouvant être à l'origine de la production de radicaux libres qui sont notamment connus pour leurs effets néfastes sur le collagène et d'autres protéines matricielles (Ohshima *et coll.* 1993; Suzuki *et coll.* 1997).

- NaOH est utilisé pour l'inactivation d'agents infectieux tels les virus et le prion (Ernst et Race 1993). C'est un agent caustique. Ses effets sur la matrice n'ont pas été étudiés mais son utilisation a montré une diminution des propriétés mécaniques d'osselets (Speirs *et coll.* 1999). Le traitement au NaOH 1M nécessite une étape de neutralisation par une solution de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) afin de ramener le pH entre 5 et 6.

Le deuxième procédé utilise le bicarbonate de sodium $NaHCO_3$. Bien connu comme agent nettoyant non toxique, il s'est révélé efficace pour la délipidation d'os trabéculaire humain, délipidation compatible avec une stérilisation par irradiation γ (Moreau *et coll.* 2000).

Tous les greffons allogéniques ainsi purifiés sont conditionnés déshydratés par des bains d'éthanol (etOH). Afin d'étudier les conséquences des traitements seuls ou combinés, 6 groupes ont été élaborés selon le schéma de la figure 11.

Les études histologiques (**Figure 12**) ont révélé des altérations sévères de la surface des travées osseuses après traitement au H_2O_2 et/ou NaOH. Alors que du tissu ostéoïde est observé après déshydratation seule (groupe etOH) et macération dans le $NaHCO_3$, celui-ci est éliminé de la surface des travées des allogreffes traitées au H_2O_2 et au NaOH (coloration au trichrome de Goldner). Ces dernières présentent des zones non colorées, d'épaisseurs variables à la surface des travées. Ces zones ne présentent plus d'aspect lamellaire et ne fluorescent pas après coloration à la fuchsine basique. L'étendue des altérations est variable selon la tête fémorale dont sont issues les allogreffes, probablement en fonction de la qualité de la matrice de chaque patient au moment de l'arthroplastie. Une coloration argentique a mis en évidence la présence de

protéines non-collagéniques argyrophiles au niveau des lignes cémentantes et des lacunes et canalicules ostéocytaires de l'allogreffe purifiée au NaHCO_3 . Ces protéines ne sont plus présentes après macération dans H_2O_2 et/ou NaOH . Or une des protéines argyrophile osseuse la plus répandue du tissu osseux est l'ostéopontine (Pascaretti-Grizon *et coll.* 2007), protéine indispensable à l'adhésion, la migration et la survie des cellules (Standal *et coll.* 2004).

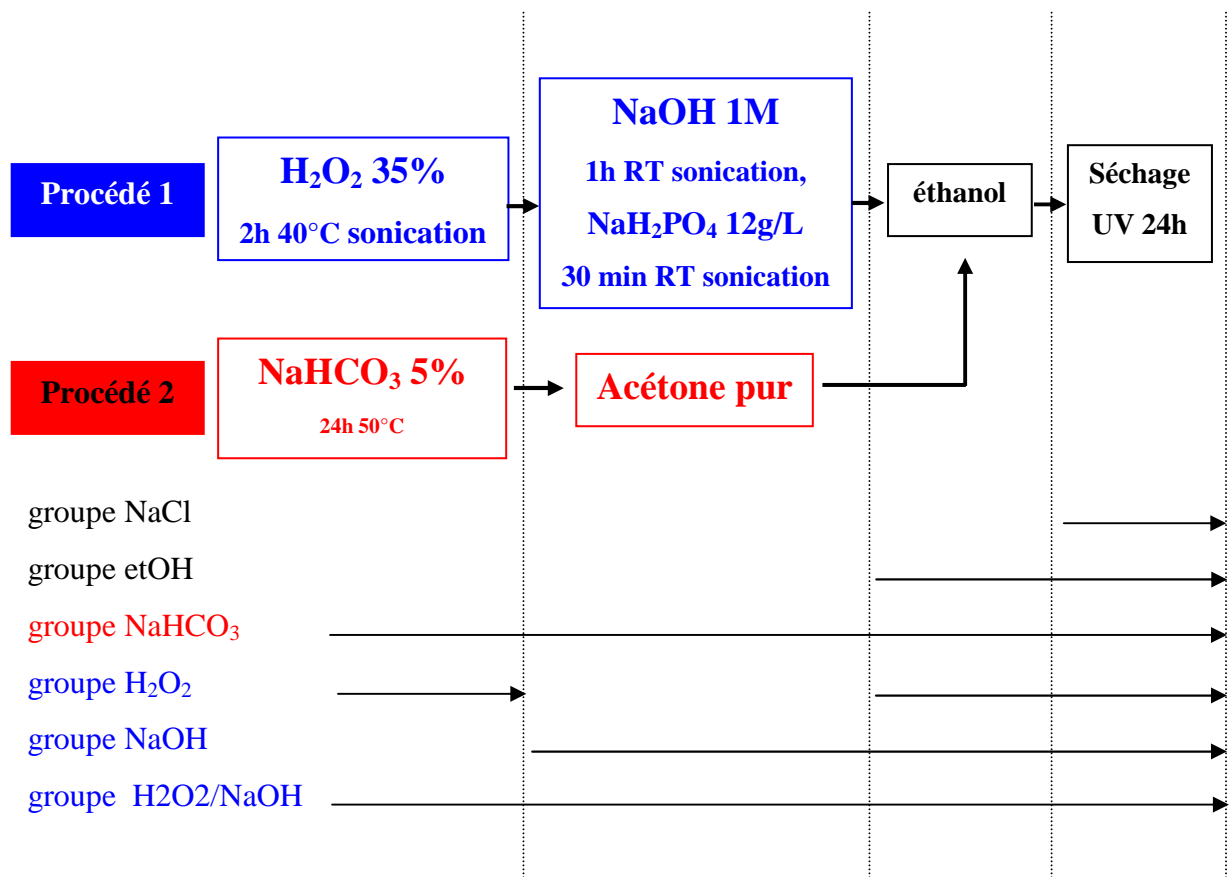


Figure 11: Schéma synoptique des différentes étapes des procédés de purification étudiés. Six groupes d'étude ont été constitués.

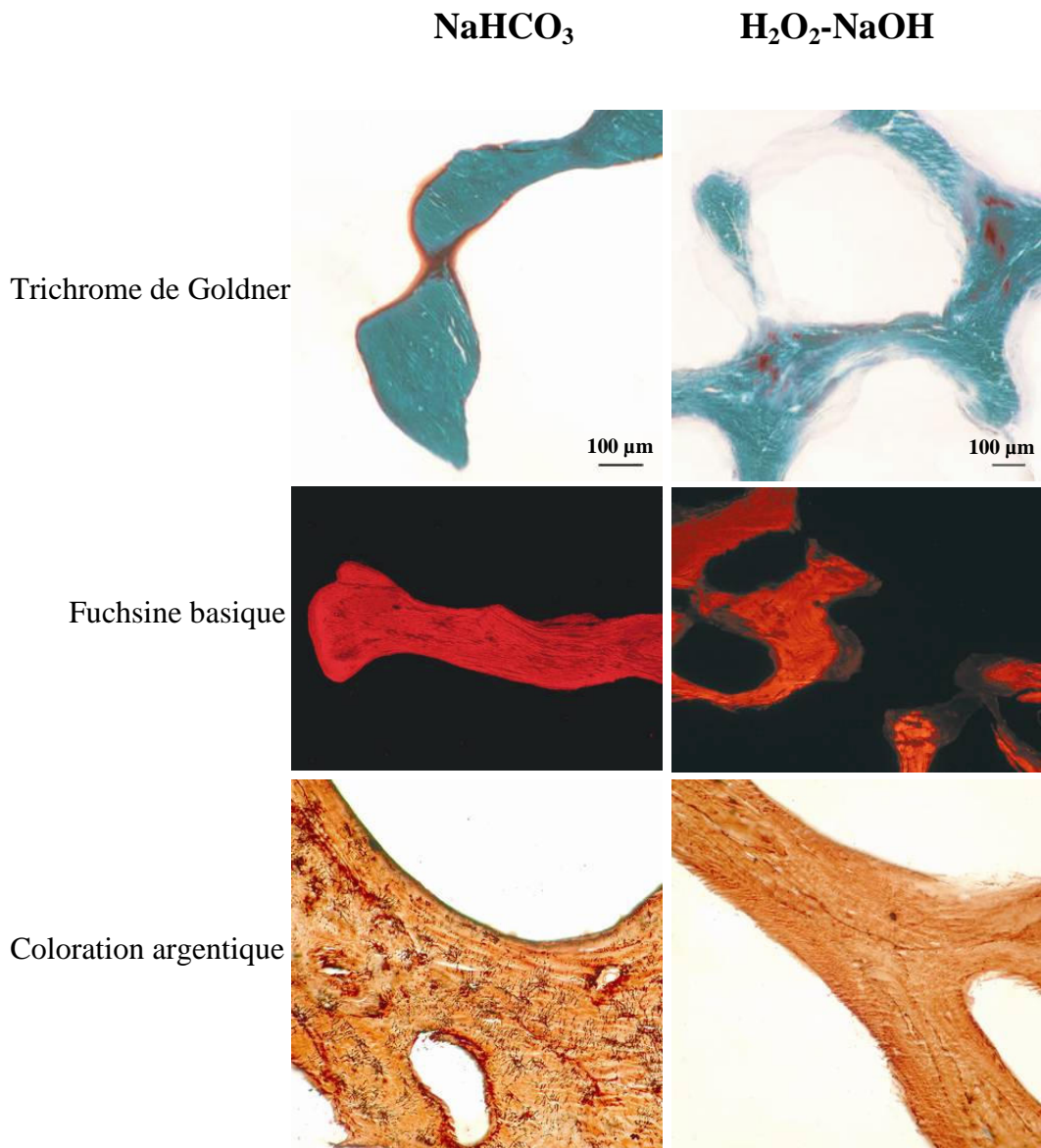


Figure 12 : Analyses histologiques de la qualité des allogreffes osseuses humaines issues d'un même patient après purification au NaHCO₃ et aux H₂O₂ et NaOH combinés.

Les modifications morphologiques de la surface des allogreffes purifiées ont été observées au microscope électronique à balayage (MEB) et par la microscopie de force atomique (AFM) (**Figure 13**). Les deux techniques sont complémentaires, l'AFM apportant une notion supplémentaire de topographie. Nous avons observé que le traitement au NaHCO_3 permet d'obtenir des travées avec une surface propre, sans lipides résiduels avec des fibres de collagène bien orientées et d'aspect calcifié. Les traitements au H_2O_2 et au NaOH n'induisent pas les mêmes aspects de surface des travées. Après traitement au H_2O_2 , au niveau de certaines régions des travées, les fibrilles de collagène sont exposées, cassées et désorganisées, la matrice n'a plus d'aspect calcifié. Après traitement au NaOH , les fibres de collagènes ne sont plus apparentes, la surface est floue, amorphe, suggérant un aspect gélatineux résultant de l'hydrolyse du collagène. D'après les analyses en microscopie électronique à transmission (MET), H_2O_2 dégrade le collagène et semble modifier la structure de cristaux, alors que NaOH altère le collagène et induit une diminution du nombre de cristaux d'hydroxyapatite (**Figure 13**). Les altérations des protéines collagéniques, non-collagéniques et de la phase minérale laissent présager une diminution des propriétés d'ostéoconduction de ces matrices endommagées.

Pour l'étude du comportement de cellules au contact des allogreffes purifiées, nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain SaOS-2, pour la simplicité de leur culture et leur phénotype ostéoblastique. Ces cellules sont dites ostéoblastes-like cells par leur haut niveau d'expression de la phosphatase alcaline (Murray *et coll.* 1987). Nous avons étudié la capacité des SaOS-2 à adhérer et à proliférer à la surface des allogreffes purifiées. Le nombre de cellules présentes sur les allogreffes à 1, 3 et 7 jours après leur dépôt a été déterminé par le test au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Le MTT est un sel de tétrazolium qui a la capacité de pénétrer dans les cellules pour y être hydrolysé par les déshydrogénases mitochondriales en formazan, produit coloré pouvant être dosé par mesure de l'absorbance de la solution obtenue à 570 nm (**Figure 14**). Les déshydrogénases mitochondriales sont des enzymes ubiquitaires à activité constante : la quantité de formazan produit est directement proportionnel au nombre de cellules vivantes. Comme montré à la figure 14C, les pastilles d'allogreffes utilisées ont une densité de travées variable. Nous avons donc exprimé nos résultats par unité de surface d'os, mesurée par analyse d'image sur des radiographies. Nous avons obtenu un nombre

significativement plus faible de cellules adhérentes aux allogreffes traitées au H₂O₂ et/ou au NaOH comparées aux allogreffes traitées au NaCl, etOH ou au NaHCO₃, et ce, à tous les temps étudiés. Seules les allogreffes etOH et NaHCO₃ ont permis une augmentation du nombre de cellules avec le temps. L'activité phosphatase alcaline (AlkP) des SaOS-2 est révélatrice de leur activité ostéoblastique. Elle est dépendante du microenvironnement et notamment du support sur lequel elles adhèrent (Marie 2001). Après 3 et 7 jours de culture sur les allogreffes, l'activité AlkP des SaOS-2 est semblable pour les groupes NaCl, etOH, NaHCO₃ et H₂O₂ mais diminuée jusqu'à 5 fois, lorsque les cellules sont cultivées sur les allogreffes NaOH et H₂O₂-NaOH. Pour tous les groupes, l'activité AlkP augmente entre 3 et 7 jours de culture. H₂O₂ et NaOH, par les altérations de la surface des matrices osseuses qu'ils engendrent, altèrent la cytocompatibilité *in vitro* des allogreffes. Une toxicité directe de ces composés pour les cellules n'a pas été démontrée.

En conclusion nous avons montré que H₂O₂ et NaOH ont des effets néfastes sur la surface des allogreffes humaines, diminuant l'adhésion, la prolifération et l'activité de cellules ostéoblastiques. Le traitement au NaHCO₃, quant à lui, a permis la production d'un greffon propre, intact et cytocompatible. Néanmoins, la capacité de l'ensemble du procédé à éradiquer les agents infectieux reste à déterminer pour envisager son utilisation pour le traitement d'os humains à visée thérapeutique.

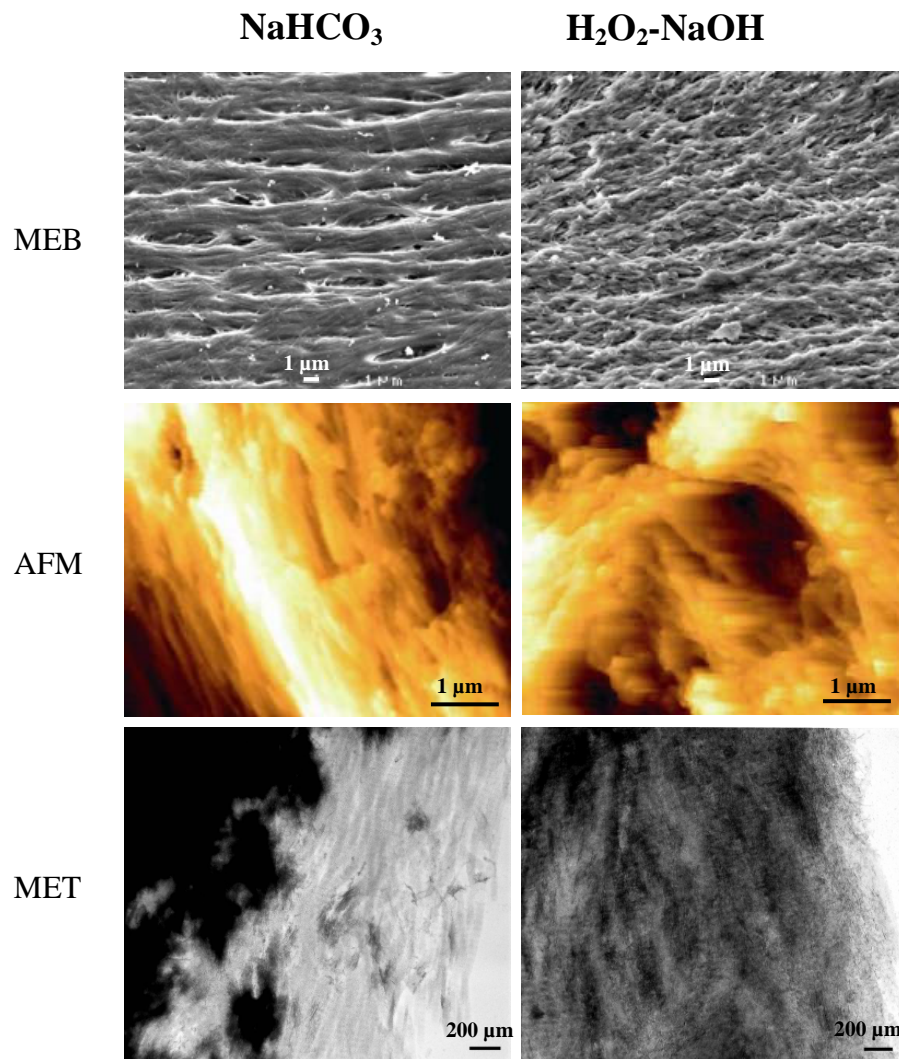


Figure 13: Analyses morphologiques et structurales de la surface des allogreffes osseuses humaines issues d'un même patient, après purification au NaHCO₃ et aux H₂O₂ et NaOH combinés.

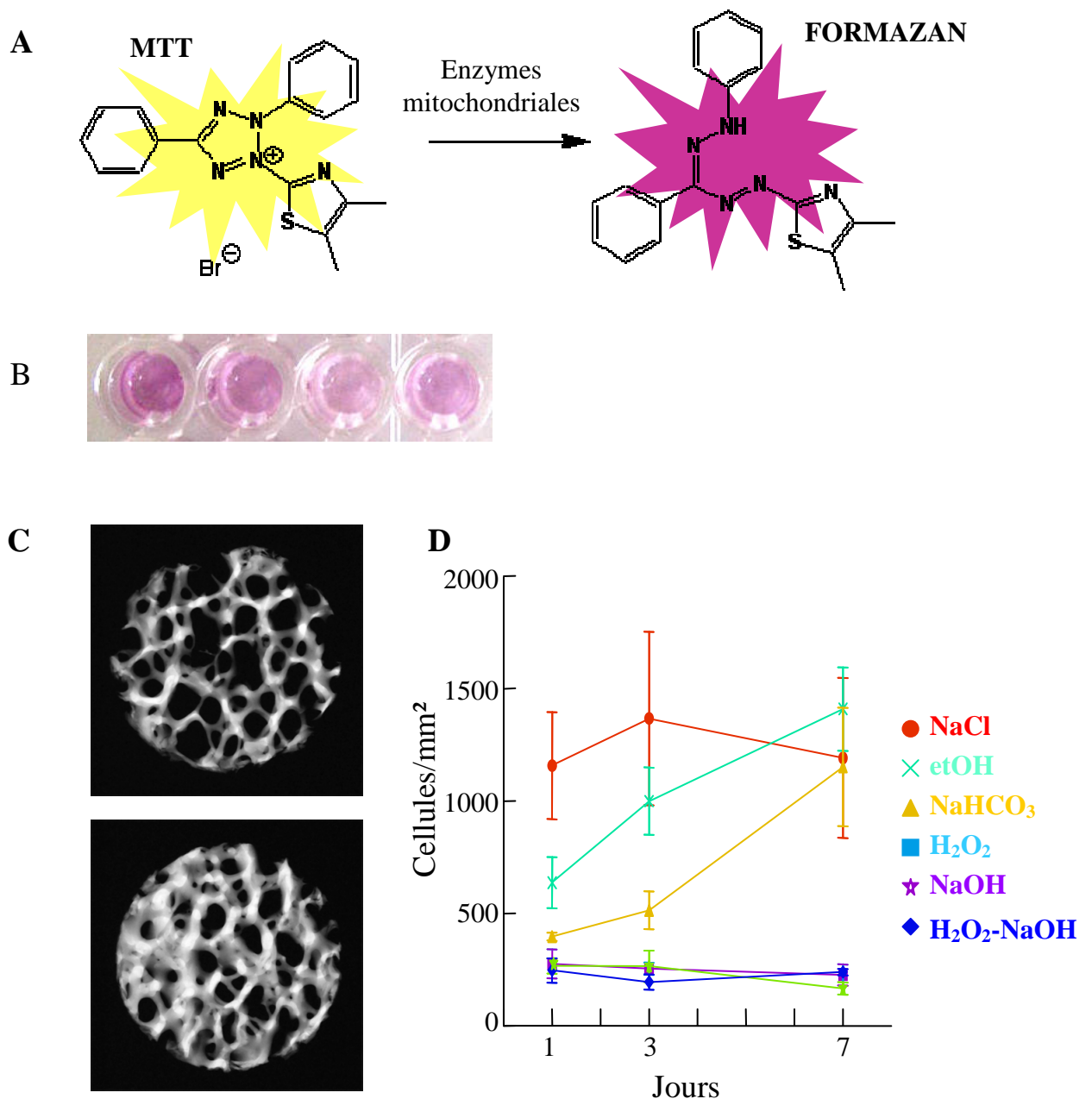


Figure 14 : Test de quantification de cellules vivantes au MTT

A : le MTT, composé de couleur jaune, est hydrolysé par des déshydrogénases mitochondriales en formazan, composé de couleur violette.

B : Exemple de résultats obtenus. L'absorbance à 570 nm de la solution colorée obtenue est directement proportionnelle à la concentration en formazan formé et donc directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

C : Radiographies d'allogreffes utilisées pour le test au MTT. La densité de travée osseuse est variable selon les allogreffes : nous avons exprimé nos résultats en nombre de cellules par mm² d'allogreffe.

D : résultats du nombre de cellules/mm² d'allogreffes en fonction du temps.

The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility

Aline Dumas^a, Christine Gaudin-Audrain^a, Guillaume Mabilieu^a, Phillipe Massin^b,
Laurent Hubert^b, Michel F. Baslé^a, Daniel Chappard^{a,*}

^aINSERM, EMI 0335—LHEA, Faculté de Médecine, 49045 Angers Cedex, France

^bINSERM, EMI 0335, Service d'orthopédie, CHU d'Angers, 49933 Angers Cedex, France

Received 7 November 2005; accepted 21 March 2006

Abstract

Different industrial processes exist to purify allogenic bone, providing safe and cleaned blocks for bone allografting. However, they often make use of chemical reagents that can be aggressive for the bone matrix. Bone samples were processed with several soaking techniques used in industry: NaHCO₃, H₂O₂, NaOH and H₂O₂ + NaOH combined; the consequences on the bone matrix and cytocompatibility were evaluated on femoral heads from osteoarthritic patients. Alterations of matrix were searched by histochemistry, atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Cytocompatibility was evaluated by coculturing human osteoblast-like cells (SaOS-2) on bone slices. Collagen fibers were dramatically altered at the surface of bone treated with H₂O₂, NaOH (and their association), but not with NaHCO₃. A marked reduction in the number of hydroxyapatite crystals was observed on the trabecular surfaces by TEM and morphological changes were evidenced in SEM and AFM. Argrophilic proteins of the bone matrix were removed by H₂O₂ and NaOH (and their association), but not by NaHCO₃. As a consequence, attachment, spreading, proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 were reduced by H₂O₂ and NaOH treatments. Strong oxidizing reagents altered matrix integrity by modifying collagenous and non-collagenous proteins. Whether these changes have clinical consequences on the bone bonding and osseointegration in human necessitate further investigations.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bone allograft; Bone bank; Purification process; Collagen; Cytocompatibility

1. Introduction

Filling bone defects can be done using different types of materials; bone itself appears to be the best material and autografts, xenografts and allografts are commonly used. The suspected transmission of the prion protein associated with the bovine spongiform encephalopathy has considerably limited the development and use of xenografts that were considered as interesting substitutes in the 1990s [1]. From about 30 years, banks of bone allograft have been constituted for managing, storing and dispatching bone fragments or complete anatomical pieces. Bone allografts are usually cryopreserved in deep freezers (−40 to −80 °C) or in liquid nitrogen (−196 °C). The viral and bacterial

safety is ensured by rigorous donor selection, excision under aseptic conditions as far as possible, keeping in sterile packages and possibly a secondary sterilization [2]. These processes provide reduction of immunogenicity due to donor's cells [3]; however, their effects on potential bacterial and viral infectivity are not fully satisfactory [4,5]. Few cases of HIV transmission have been reported after transplantation of unprocessed, fresh-frozen bone allograft [6]. Bone marrow removal by a series of washings, sonication and centrifugation steps without any other processing was proposed to reduce transmissible spongiform encephalopathy infectivity [7]. Demineralized freeze-dried bone allografts, using chemical agents such as ethanol, urea and hydrochloric acid, have been considered at less risk for viral transmission [8,9]. However, the osteoconduction, mechanical properties and cytocompatibility must also be preserved for graft incorporation.

*Corresponding author. Tel.: +33 241 73 58 64; fax: +33 241 73 58 86.
E-mail address: daniel.chappard@univ-angers.fr (D. Chappard).

Evidence comes from recent studies that bone marrow removal, defatting [10,11] and elimination of bone soluble proteins [12] require additional processing steps. New industrial processes have appeared recently, as a temptation to produce cleaner and safer grafts. Defatting with CO₂ in a supercritical state has been reported to efficiently remove lipids from large bone samples [13]. Purification procedures also involve elimination of cells and debris from medullar spaces based on prolonged immersion in oxidizing compounds (low oxidizing like sodium hydrogenocarbonate NaHCO₃ [10] or highly oxidizing like hydrogen peroxide H₂O₂). Viral and prion inactivation has been recommended by immersion in 1 N NaOH [14,15]. A study combining these different steps on sheep allogenic cancellous bone has reported satisfactory results in vivo [16]. Another process combining osmolysis, H₂O₂, NaOH and acetone is used to prepare the patented bone graft Tutoplast[®] (Tutogen medicals GmbH, Erlangen, Germany) [17]. Many other commercially available bone allografts are obtained after various chemical processes: Surgibone[®] (Unilab, Hillside, NJ, USA) or Kiel bone. Although the first clinical results seemed promising with these bone grafts, negative effects have been reported [18,19]. However, the effects of these processes on the organic and mineral phases and consequences on graft quality have never been evaluated.

The aims of the present study were

- (1) To evaluate histologically the surface status of human trabecular bone after cleaning bone with chemical treatments commonly reported in the literature to clean bone graft (ethanol, NaHCO₃, H₂O₂, NaOH). Combination of several of these chemicals was also used as proposed by several companies.
- (2) To determine the cytotoxicity (if any) of these processes on bone cells.

Bone samples were prepared from human femoral heads. Cytocompatibility was evaluated by culturing human osteoblast-like cells (SaOS-2) on cleaned bone slices. Proliferation rate of cells was examined by MTT test and their differentiation by alkaline phosphatase activity measurement.

2. Material and methods

2.1. Bone allograft preparation

Allogenic bone samples were prepared from three femoral heads that had been excised during hip surgery for osteoarthritis. All experiments were done in triplicate on each femoral head. They were packed under sterile conditions in plastic vials and frozen at -20 °C until use. After thawing at room temperature, the articular cartilage was removed with a scroll saw. Transversal slices (approximately 1 mm in thickness) were prepared from the block of cancellous bone with a precision saw (Accutom-2, Struers, Copenhagen, Denmark). Because various analysis techniques were used to characterize the quality of the bone surfaces, samples of different size were prepared from these slices for each type of analysis (a single trabecula for atomic force microscopy (AFM), 0.1 cm²

for transmission electron microscopy (TEM), 0.3 cm² for scanning electron microscopy (SEM) or MTT test and 3 cm² for alkaline phosphatase activity measurement). For light microscopy, blocks were cut into cubes (about 5 mm in side). All bone samples were immediately washed with NaCl 9‰ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) under a high-pressure jet in order to eliminate bone marrow materials. Different processing methods were studied.

1. *process NaCl*: no additional treatment occurred after this first cleaning step.
2. *process etOH*: dehydration for 3 h in 95% ethanol (etOH) and 2 h in pure etOH. This dehydration method is obligatory and served as control for the other processes and is part of almost all reported process [10,16,20,21].
3. *process NaHCO₃*: soaking in NaHCO₃ (5% in distilled water) at 50 °C for 24 h (Sigma-Aldrich) [10]. After three washes in distilled water, slices or cubes were extensively defatted in two baths of pure acetone (8 h) followed by two baths of 40° etOH (2 h each).
4. *process H₂O₂*: soaking in a 35% H₂O₂ solution (Acros Organics, New Jersey, USA) at 40 °C for 2 h with sonication as reported elsewhere [16] and dehydration as described above in process etOH. This group evaluated the specific effects of H₂O₂ on bone.
5. *process NaOH*: soaking in NaOH (1 M, Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature and buffering 30 min in NaH₂PO₄ (12 g l⁻¹, Acros Organics), buffering and dehydration as described above in process etOH. This group evaluated the specific effects of NaOH on bone.
6. *process H₂O₂+NaOH*: soakings in H₂O₂ followed by NaOH and NaH₂PO₄ as above. Samples were then dehydrated as described above in process etOH. This process evaluated the combined action of both chemicals.

These six groups of processed samples were then dried in a laboratory oven at 37 °C and stored in sterile tubes until use. Bone slices were sterilized by UV light for 24 h at room temperature before use in culture studies.

2.2. Light microscopy

Histology was used to detect bone matrix alterations in the depth of bone trabeculae after sectioning. From three femoral heads, a fresh cube of trabecular bone was cut and immediately fixed in 10% formalin at 4 °C for 24 h. This unwashed control cube, containing bone marrow, was dehydrated in acetone and cleared in xylene. Additional cubes were treated with one of the above processes and all cubes were embedded undecalcified in methylmethacrylate in a single block. Sections were cut dry (7 μm in thickness) on a PolycutS microtome equipped with tungsten carbide knives (Leica PolycutS, Rueil-Malmaison, France). Sections were stained by:

- (i) Goldner's trichrome, which stains collagen in green and osteoid tissue in red,
- (ii) Basic fuchsin, 1% in water. This dye is fixed by non-calcified collagen that appears pink under transmitted light and fluoresces orange under green incident light (545 nm),
- (iii) Toluidine blue, 0.5% in 1% sodium borax for cell staining,
- (iv) Silver staining, which identifies argyrophilic proteins [22].

2.3. Surface morphology of bone trabeculae

2.3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Surface morphology of the bone trabeculae was studied by SEM on a JEOL JSM-6301F, (JEOL, Paris, France). The method was used to observe the calcified collagen fibers that composed the resting and mineralization surfaces of bone [23].

2.3.2. Atomic force microscopy (AFM)

Examination of surfaces was performed using an autoprobe CP-research (ThermoMicroscopes, Sunnyvale, CA) in the tapping mode with ULNC-AUNM ultralevers (Veeco metrology, Dourdan, France). Acquisitions were done with the image processing software release 2.1. At least five topographic images ($5 \times 5 \mu\text{m}$) were recorded per sample. This method provides interesting data at the nanometer scale and is useful to detect bone microfibrillar changes and hydroxyapatite crystals [24].

2.3.3. Transmission electron microscopy (TEM)

Processed bone slices (0.1 cm^2) from three femoral heads were examined by TEM without decalcification and after embedding in epoxy resin. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Examinations were done with a JEOL 2010 electron microscope. TEM was used to have a precise visualization of the collagen ultrastructural changes in the immediate surface layer of the trabeculae after ultrathin sectioning; the method is also useful to illustrate the hydroxyapatite microcrystals of the mineral phase.

2.4. Cell culture

Osteoblast-like cells SaOS-2 (American Type Culture Collection ATCC no. HTB 85) were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Seromed Biochrom, Berlin), 100 IU/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Eurobio) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C. UV sterilized bone slices were incubated in serum-free culture medium 2 h before cells seeding. After 24 h of starving, cells were detached using trypsin-EDTA (trypsin/ethylenediamine tetraacetic acid—Eurobio) and plated on the six bone samples (NaCl, etOH, NaHCO_3 , H_2O_2 , NaOH and $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$) at a density of 2×10^5 cells/ cm^2 . Cells were incubated for 3 h before adding culture medium. They were harvested at 1, 3 and 7 days. Culture medium was changed twice a week.

2.5. Cultured cells morphology

After 3 days of culture, bone slices with cells were rinsed in PBS. Samples were fixed with glutaraldehyde in PBS, post-fixed in osmium tetroxide for 2 h, dehydrated in graded etOH series, desiccated overnight in hexamethyldizilane and then carbon-coated. Observations were done with a JEOL JSM 6301F field emission SEM.

2.6. ALP activity measurement

Enzyme activity was assayed in cell lysates by determining the release of *p*-nitrophenol (pNP) from a *p*-nitrophenol phosphate solution (pNPP, Sigma-Aldrich). Briefly, after 3 or 7 days of culture, bone slices with cells were transferred to a new plate. Only cells fixed on bone were collected after trypsin-EDTA treatment. Cells were washed twice in PBS and lysed by sonication in Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.5, 0.1% Triton-X 100. ALP activity was quantified by reaction with 2.5 mM PNPP in 0.1 M 2-amino-1-methyl-1-propanol buffer, pH 9.8, supplemented with 2 mM MgCl_2 . The reaction was stopped with NaOH 0.5 N and pNP formed was measured using a spectrophotometer at 410 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan). The results were normalized for protein content determined using a protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA). Results were expressed as percentage of ALP activity of cells grown on polystyrene. Experiments were done in triplicate with bone slices from the three femoral heads and measures were done in duplicate.

2.7. MTT-test

The number of cells on bone slices was determined after 1, 3 and 7 days of culture using MTT [3-(4,5 dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] test, a colorimetric assay derived from the method

described by Mossmann [25]. Results were normalized by the surface fraction of the slice occupied by trabecular bone previously determined by image analysis.

2.8. Statistical analysis

Statistical study was performed using SYSTAT statistical software (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA; release 11.0). All data were reported as means \pm standard error of the mean (s.e.m). Significant differences between groups were assessed by a non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis test). Pairwise comparisons were performed using Mann and Whitney' *U*-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Matrix alterations observed by light microscopy

Fig. 1 shows sections of allograft samples after Goldner's staining. Unprocessed cubes contained bone marrow in the medullar cavities, osteoid seams, osteocytes or cellular debris inside the osteocytic lacunae. The classical lamellar

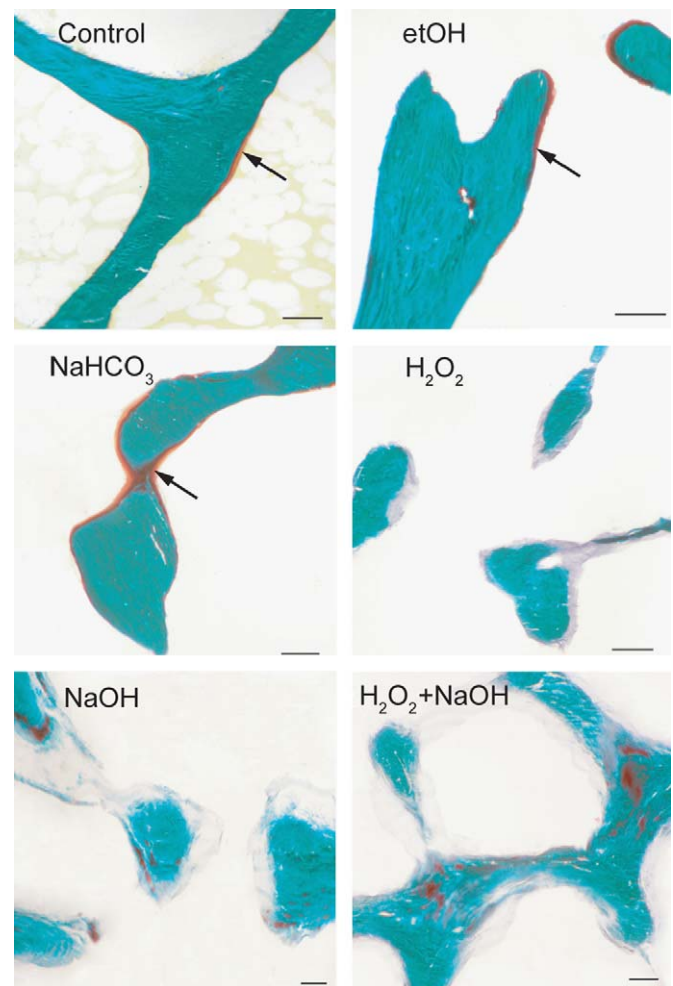


Fig. 1. Goldner stained sections of control and processed bone from the same subject. Osteoid tissue is evidenced on the unprocessed allograft (\rightarrow) after etOH and NaHCO_3 maceration. After H_2O_2 , NaOH and the combined process ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$), osteoid is eliminated and some areas of damaged matrix appear unstained. Bar = 100 μm .

texture of the bone matrix was evidenced by polarization microscopy. Washing under high pressure eliminated all medullar material. EtOH dehydration had no effect and NaHCO_3 eliminated cellular remnants without altering the matrix staining. After H_2O_2 , osteoid seams were eliminated and some matrix areas appeared unstained at the surface of bone trabeculae. Similar effects were also observed after NaOH and appeared more pronounced. Maximized alterations occurred on bone sections on samples treated by the combined reagents ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$). The unstained matrix areas were damaged by the chemical processes and bone has lost its lamellar organization. Degradation was not uniform at the surface of trabeculae probably due to differences in matrix composition in the different bone structure units. Damages were observed in the three femoral heads but at different degrees, probably depending on the matrix quality of each subject. The basic fuchsin staining showed similar results and the altered surface layers did not fluoresce under UV light. On toluidine blue stained sections, the altered areas appeared in dark blue after H_2O_2 process and unstained after NaOH . No osteocyte could be observed in the lacunae on H_2O_2 - and NaOH -treated cubes. In the fresh, EtOH and NaHCO_3 cubes, silver staining revealed argyrophilic deposits along cement lines, osteocyte canaliculi and lacunae. However, the use of H_2O_2 and NaOH (either alone or combined) completely abolished this staining from the trabecular surface to the deepest part of the trabeculae (Fig. 2).

3.2. Trabecular surface alterations

3.2.1. SEM (Fig. 3A)

On NaCl bone slices, lipid droplets were extracted from the bone matrix and bulked over the surface (data not shown). On NaHCO_3 bone slices, collagen fibers were preserved and oriented with the classical fern-like organization. The glossy appearance of the fibers corresponded to a fully calcified matrix. This process produced a clean and delipidated surface. H_2O_2 and NaOH processes (either alone or combined) were associated with considerable changes in surface morphology. After H_2O_2 , fibers were

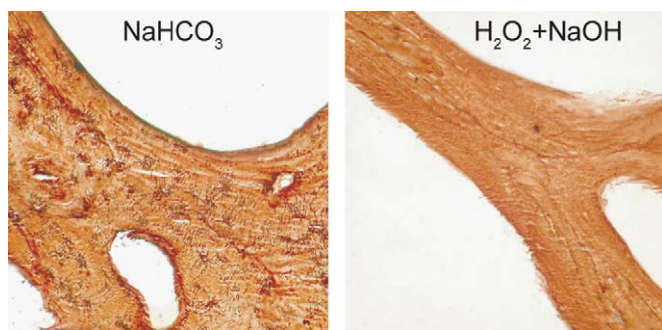


Fig. 2. Silver stained sections of processed bone from the same subject. Staining reveals argyrophilic proteins in the osteocyte lacunae and canaliculi and also in the cement lines. NaHCO_3 maceration had no effect but staining is completely abolished after $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$ treatment.

damaged and their constituent fibrils were exposed with a hairy appearance; broken fibrils suggested an alteration of the calcified phase of the matrix. After NaOH , fibrils were stuck together and associated with numerous debris. The combination of both processes ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$) produced considerably altered and rougher surfaces where the collagen fibrils could not be identified.

3.2.2. AFM (Fig. 3B)

Collagen fibrils were clearly evidenced in NaHCO_3 -treated allograft. After H_2O_2 , the trabecular surface still exhibited a fibrous aspect. However, fibrils appeared more

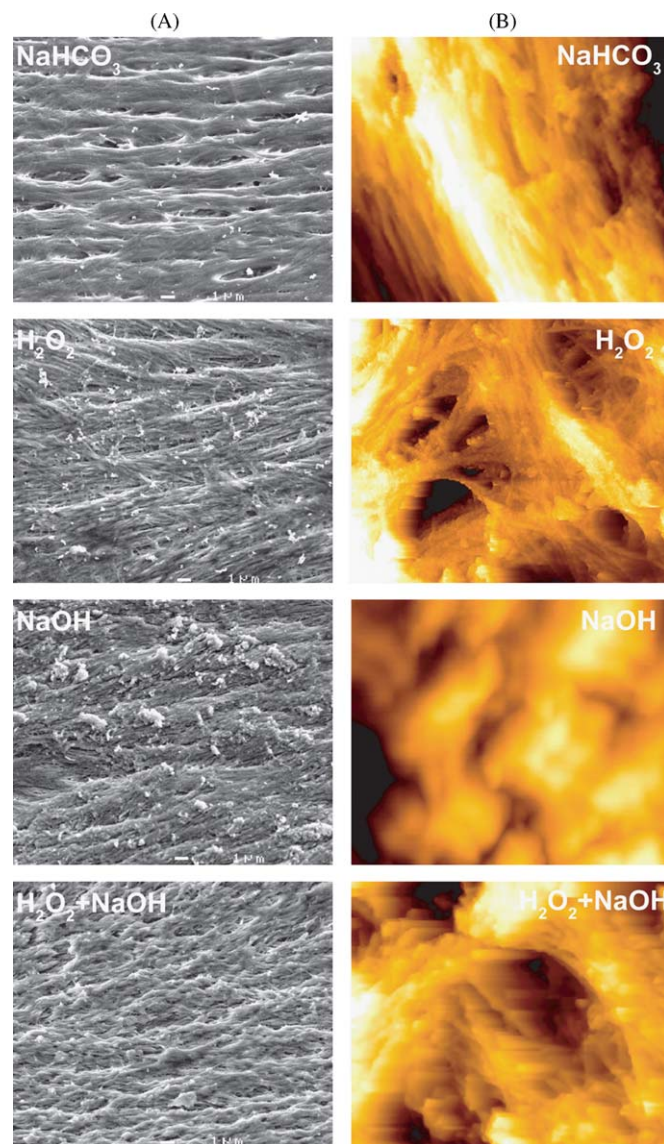


Fig. 3. (A) SEM images of bones treated with NaHCO_3 , H_2O_2 , NaOH or in combination ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$). Note collagen fibrils alterations induced by H_2O_2 , NaOH and the combined treatment ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$). (B) AFM topographic images of the surface of bone treated with NaHCO_3 , H_2O_2 , NaOH and in combination ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOH}$). Collagen fibrils appear thinner and broken after H_2O_2 , damaged and blurred after NaOH treatment.

distinct, thinner and disorganized, suggesting an alteration of the calcified phase. Changes induced by NaOH alone or combined with H₂O₂ seemed to particularly concern the organic phase. The bone matrix appeared blurred and fibrils were not apparent. The surface appeared covered by place with an amorphous layer, possibly coming from hydrolyzed remnants of the collagenous material. This aspect was not observed all over the trabecular surfaces but appeared in poorly limited areas. In other areas, collagen fibers had persisted but appeared thinner and broken.

3.3. Matrix alterations observed by TEM (Fig. 4)

Matrix was not modified by dehydration in neither etOH nor NaHCO₃. A layer of non-calcified collagen (1 μm in thickness) was observed, as expected, at the surface of trabeculae. The mineralized phase appeared dense and composed of hydroxyapatite crystals with a needle aspect. After H₂O₂, NaOH or H₂O₂ + NaOH processes, a thick amorphous layer covered the trabecular surfaces in which the banding pattern of the collagen could not be identified. Modifications of the mineral phase were also observed: NaOH induced reduction in hydroxyapatite crystal numbers and they appeared loosely packed. After H₂O₂ and H₂O₂ + NaOH, the needle shape appearance of crystals was lost at the surface; however, the presence of electron dense material remained and could correspond to a partially dissolved mineral phase.

3.4. Cell morphology (Fig. 5)

On undamaged trabecular surfaces (i.e., after NaCl, etOH or NaHCO₃) SaOS-2 cells maintained their char-

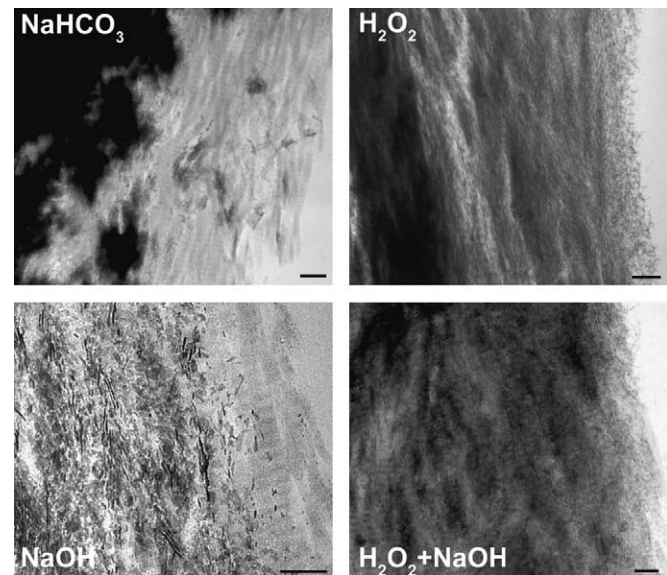


Fig. 4. TEM of bone surfaces treated by various chemical processes (NaHCO₃, H₂O₂, NaOH or in combination (H₂O₂ + NaOH)). H₂O₂ induced collagen degradation and partial dissolution of crystals. NaOH induced collagen degradation and reduction in the number of hydroxyapatite crystals. Bar = 200 nm.

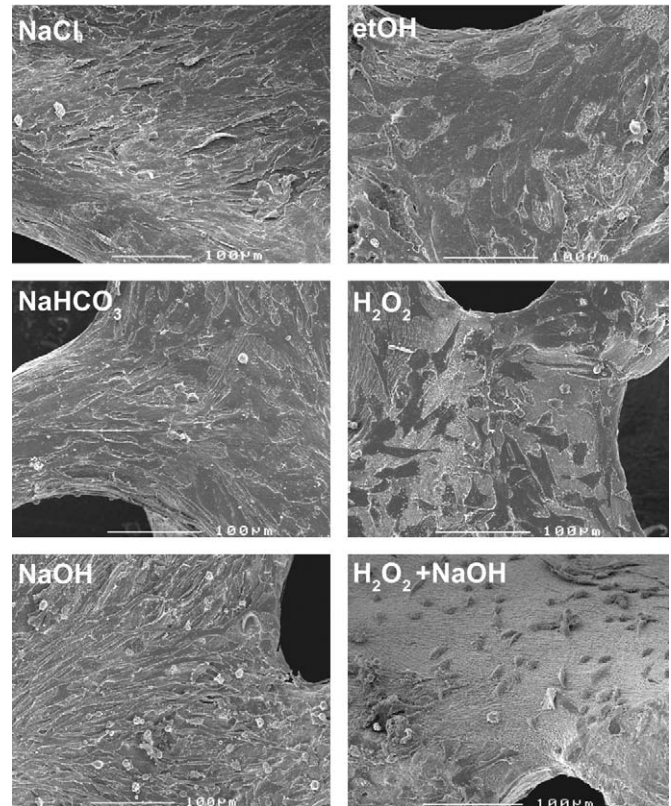


Fig. 5. SEM images of SaOS-2 cells cultured for 3 days. Cells are aligned along the collagen fibers on NaCl, etOH, NaHCO₃ processed bones. Note that cells have lost their orientation with collagen fibers after H₂O₂. After NaOH treatment, cells were extremely long and thin. Cells are rare with random orientation on H₂O₂ + NaOH slices.

acteristic spreading. Cells were nearly at confluence after 3 days of culture. They appeared aligned with the main collagen fiber direction. After H₂O₂, only a few cells were observed. They were large and flattened and had no preferential orientation along collagen fibers. After NaOH, cells were at confluence only in some areas; they appeared extremely long and thin, aligned with collagen fibers and accompanied by foci of round cells. On H₂O₂ + NaOH-treated slices, cells were scarcely distributed, globular in shape and without preferential orientation.

3.5. Cell behavior on processed allografts

3.5.1. ALP activity (Fig. 6A)

Cells cultured on NaCl, etOH and NaHCO₃ slices did not differ in terms of ALP activity (data not shown). After 3 days of culture, ALP activity of cells cultured on NaHCO₃ slices exhibited 39.7 ± 8.4% of the activity of cells grown on polystyrene. On H₂O₂ processed slices the decrease was in the same order (33.5% ± 5.5) but the two groups did not differ significantly. On NaOH and H₂O₂ + NaOH slices, ALP activity was markedly reduced (up to five-fold 13.6% ± 7.0, *p* < 0.05 and 7.5% ± 3.0, *p* < 0.05, respectively). After 7 days, ALP activity of cells on NaHCO₃ slices remained at only 87.5% ± 15.9 of the

activity of control cells. The activity was only $62.3\% \pm 23.2$ for cells grown on H_2O_2 , $44.6\% \pm 12.6$ ($p < 0.05$) on NaOH and $37.8\% \pm 16.7$ ($p < 0.05$) on $H_2O_2 + NaOH$ -treated slices.

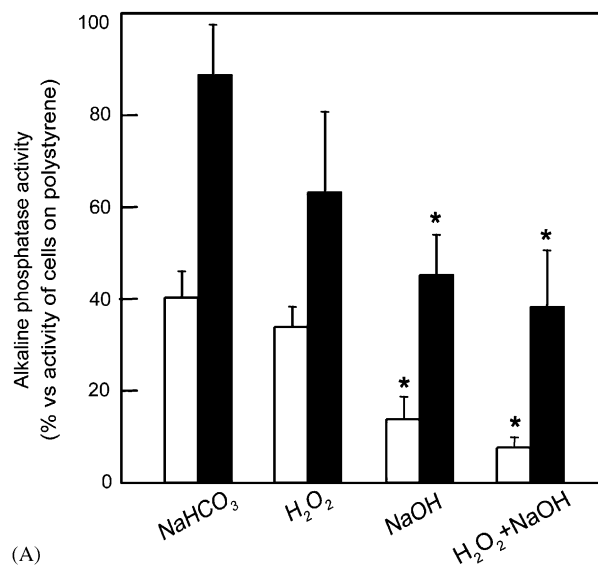
3.5.2. Cell proliferation (Fig. 6B)

Cell density determined by MTT was significantly lower on H_2O_2 , NaOH and $H_2O_2 + NaOH$ processed bones compared with NaCl, etOH and $NaHCO_3$ samples ($p < 0.05$) at days 1, 3 and 7. These results suggest that cells adhered not easily on these damaged matrices. Moreover, cell density increased with time on etOH and $NaHCO_3$ allografts while it remained unchanged on H_2O_2 , NaOH and $H_2O_2 + NaOH$ slices ($p < 0.05$).

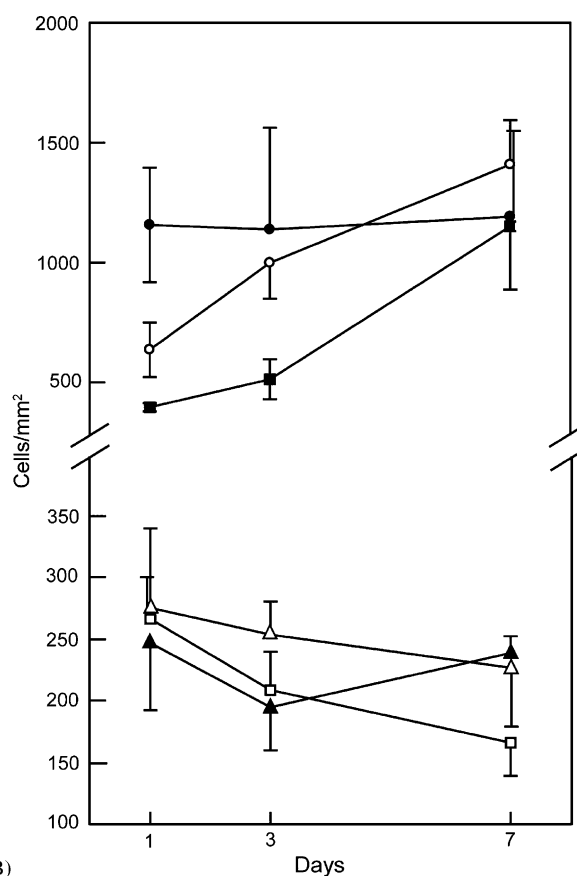
4. Discussion

The most common preparative procedures for allograft are presently freezing/thawing and γ -irradiation, which served to render non-viable medullar cells within the graft. This process may appear insufficient because cases of non-union at the host-graft junction are reported [26]. In 2003, 70% of bone allografts employed in France for a revision arthroplasty were virus-inactivated using a chemical treatment and irradiation (Activity report for 2003, Agence de la Biomédecine, France, www.agence-biomedecine.fr). Nowadays, defatting, deproteinization, and viral inactivation are acknowledged for safe and non-immunogenic bone allograft production. Consequences of these chemical processes on matrix and recipient bone cells are of interest because incorporation of the devitalized graft depends on tissue remodeling in the grafted area. In particular, bone matrix may contain constituents which regulate the recruitment and activity of osteoblasts and osteoclasts, including growth factors like TGF β [27], osteopontin [28], osteonectin and bone morphogenic proteins [29]. These proteins affect cell attachment and spreading and consequently interfere with transduced signals [30]. Proliferation and differentiation of osteoblasts depend of combination of transcription factors which are a function of the cell environment [31]. Interaction between osteoblasts and collagen is also determined by guided adhesion integrins and the RGD sequences (Arg-Gly Asp) in collagen fibers [32].

The use of a gentle oxidizing reagent like $NaHCO_3$ appears satisfactory to respect the surface morphology of bone and to maintain cytocompatibility. Collagen fibers and the calcified phase appeared preserved in SEM and TEM with $NaHCO_3$; the behavior of human osteoblast-like cells was not modified when compared to cells grown on an NaCl processed bone. $NaHCO_3$ appeared able to eliminate fat and debris without altering collagenous and non-collagenous proteins which regulate cellular adhesion, proliferation and differentiation [33]. Some non-collagenous proteins can be detected on histologic sections using a silver staining method although the exact nature of these proteins is still unknown. Their nature is under analysis in



(A)



(B)

Fig. 6. Effects of various chemical processes on cytocompatibility of SaOS-2 cells grown on treated bone. (A) ALP activity from cells cultured for 3 (white bars) and 7 days (black bars). Results are expressed in percentage of activity of control cells grown on polystyrene. Data are represented as mean \pm s.e.m from three experiments. *Significant difference ($p < 0.05$) when compared with $NaHCO_3$ samples. (B) Cell adhesion and proliferation investigated using MTT-test after 1, 3 and 7 days of culture on bone. Cell number was normalized to bone slice surface. Data are presented as means \pm SEM from four experiments. (●) NaCl; (○) etOH; (■) $NaHCO_3$; (△) H_2O_2 ; (□) NaOH; (▲) $H_2O_2 + NaOH$.

our laboratory. NaHCO₃ processed bone did not exhibit changes in the argyrophilic proteins distribution, suggesting that these matrix proteins remained intact.

Our study suggests that a process using H₂O₂ and NaOH as deproteinizing and viral-inactivating agents, have detrimental effects on the surface of human bone and consequently on the osteoblastic activity. However, we do not have data concerning the efficiency of NaHCO₃ on virus inactivation.

H₂O₂, sodium hypochlorite or urea have been used as deproteinizing agents to clean bone. It was notably used for processing of a denatured bone known as “Kiel bone”. Kiel bone was found to be unsatisfactory and to induce invasion by fibrous tissue without osteoconduction; therefore, its use in orthopedic practice has been abandoned [18]. A reduction of *in vitro* osteoclast activity after treatment of human cortical bone with hydrogen peroxide 3%, freeze-drying and irradiation has been reported [34]. This activity was restored after removal of the surface layers, supporting the notion that *in vitro* cellular activity is correlated with bone quality. Our observations of the surface of human trabecular bone treated with 35% H₂O₂ followed by dehydration have shown that a superficial collagenous layer is damaged, argyrophilic proteins have disappeared and mineral phase is altered. At physiological pH, HOO• radicals, derived from H₂O₂, can react with H₂O to product the H₃O⁺ hydronium ion and reactive oxygen species (O₂•, HO•). These newly formed cations can interact with hydroxyapatite crystals to modify their structure [35]. In addition, OH• in the presence of oxygen, degrades collagen and modifies its amino acid composition [36]. The argyrophilic proteins usually found in the osteocyte lacunae and canaliculi were eliminated by H₂O₂ throughout the whole bone matrix, suggesting that several other important matrix proteins could also have been removed. HO• radicals can partially degrade fibronectin, thus reducing bone nodule formation in rat osteoblast culture [37]. Other works have shown that collagen alterations induced by active oxygen species permitted attachment of fibroblasts but altered their spreading and proliferation rate [38]. Adhesion, spreading, proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells grown on H₂O₂ bones were markedly altered in the present study. Cells appeared large, flat and had lost their orientation along collagen fibers. Proliferation rate and ALP activity of SaOS-2 grown on H₂O₂-treated slices were reduced. Trentz et al. have studied the response of primary human osteoblasts to allogenic cancellous bone pre-treated with H₂O₂. They found no cytotoxicity and no difference in ALP RNAm compared to cells grown on polystyrene [39]. However, the ALP gene activity cannot be correlated with the enzyme activity. In this study, the decrease in ALP activity of cells cultured on H₂O₂ slices suggested a decrease in the differentiation step of these cells.

The NaOH process was developed for its viral inactivating properties [14]. However, being a denaturing agent, NaOH also exerts deleterious effects on collagenous and

non-collagenous proteins. This explains the various aspects of collagen fibers in SEM and AFM and the decrease of hydroxyapatite crystals number in TEM. It is likely that alteration of the mineral phase can induce a marked reduction of the mechanical properties of allografts. Speirs et al. [15] have found that NaOH produced a moderate but significant decrease in the structural strength and stiffness of human auditory ossicles compared to steam at 134 °C. Their results cannot be generalized because ossicles are compact bones with biomechanical functions different from the ones required for bone defects filling. In the present study, no attempt was done to characterize further the biomechanical properties of bones processed with these various protocols. Non-collagenous proteins of the matrix were altered by NaOH as described above with H₂O₂. Cells adhesion and proliferation were disturbed after NaOH, and appeared extremely long and thin, aligned with collagen fibers.

H₂O₂ (acid) and NaOH (basic) are oxidizing reagent that did not induce the same changes in surface chemistry of the bone trabeculae. This may explain the differences in cell shape and orientation noted specifically after NaOH treatment of the slices. That remodeling and osseointegration of allografts treated with strong oxidizing reagents could be compromise is questionable. Frayssinet et al. [16] have found that cancellous bone tissue defatted with supercritical CO₂ and treated with H₂O₂+NaOH presented a better integration at the histological level than non-defatted, non-processed allografts in sheep bones after 8 month. However, their study did not include a defatted non-processed group.

5. Conclusion

The use of H₂O₂ or/and NaOH induced considerable deleterious changes in collagen, non-collagenous proteins and hydroxyapatite crystals that had significant consequences on the osteoblastic attachment, spreading and activities *in vitro*. Notwithstanding the use of a limited series of bone specimens in this study, very similar results were obtained on the different bones. It is likely that the bone quality of the donors (patients with osteoarthritis of the hip) had a noticeable influence on the results as evidenced by the various extents of altered areas. NaHCO₃ produced cleaned human bones with a well-preserved surface morphology supporting the *in vitro* growth and maturation of SaOS-2 cells. However, virus and prion inactivating properties of this treatment are unknown and additional procedures remain to be used [40].

Acknowledgments

This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat—Région “Pays de la Loire”. The authors wish to thank Prof. C. Cincu for helpful discussions on the effects of H₂O₂ on collagen and mineral.

References

- [1] Butler D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* 1998;391:320–4.
- [2] Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop Rel Res* 1994;303:8–17.
- [3] Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 1996;324:66–74.
- [4] Eastlund T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant* 1995;4:455–77.
- [5] Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:854–8.
- [6] Li CM, Ho YR, Liu YC. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. *J Formos Med Assoc* 2001;100:350–1.
- [7] Lomas R, Drummond O, Kearney JN. Processing of whole femoral head allografts: a method for improving clinical efficacy and safety. *Cell Tissue Bank* 2000;1:193–200.
- [8] Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 1992;63:979–83.
- [9] Swenson CL, Arnoczky SP. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:323–32.
- [10] Moreau MF, Gallois Y, Baslé MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2000;21:369–76.
- [11] Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Baslé MF, Rebel A. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials* 1993;14:507–12.
- [12] VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* 2005;23:1059–64.
- [13] Fages J, Marty A, Delga C, Condoret JS, Combes D, Frayssinet P. Use of supercritical CO₂ for bone delipidation. *Biomaterials* 1994;15:650–6.
- [14] Ernst DR, Race RE. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 1993;41:193–201.
- [15] Speirs AD, Hotz MA, Oxland TR, Hausler R, Nolte LP. Biomechanical properties of sterilized human auditory ossicles. *J Biomech* 1999;32:485–91.
- [16] Frayssinet P, Rouquet N, Mathon D, Autefage A, Fages J. Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO₂ implanted in sheep bones. *Biomaterials* 1998;19:2247–53.
- [17] Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004;25:987–94.
- [18] McMurray GN. The evaluation of Kiel bone in spinal fusions. *J Bone Joint Surg Br* 1982;64:101–4.
- [19] Seite P, Otten P, Kurt AM. Non-union after a two-level anterior cervical decompression and fusion with Surgibone. *J Clin Neurosci* 1998;5:444–7.
- [20] Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999;360:71–86.
- [21] Anastasescou M, Cornu O, Banse X, Konig J, Hassoun A, Delloye C. Ethanol treatment of tendon allografts: a potential HIV inactivating procedure. *Int Orthop* 1998;22:252–4.
- [22] Chappard D, Retailleau N, Filmon R, Baslé MF, Rebel A. Nuclear organiser regions (AgNORs) staining on undecalcified bone embedded in resin: light and TEM methodologies. *J Histotechnol* 1996;19:27–32.
- [23] Boyde A, Jones SJ. Back-scattered electron imaging of skeletal tissues. *Metab Bone Dis Rel Res* 1983;5:145–50.
- [24] Hassenkam T, Fantner GE, Cutroni JA, Weaver JC, Morse DE, Hansma PK. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. *Bone* 2004;35:4–10.
- [25] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [26] Hornicek FJ, Gebhardt MC, Tomford WW, Sorger JI, Zavatta M, Menzner JP, et al. Factors affecting nonunion of the allograft–host junction. *Clin Orthop Rel Res* 2001;382:87–98.
- [27] Aspenberg P, Tagil M, Kristensson C, Lidin S. Bone graft proteins influence osteoconduction. A titanium chamber study in rats. *Acta Orthop Scand* 1996;67:377–82.
- [28] Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4473–5.
- [29] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233–41.
- [30] Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993;120:577–85.
- [31] Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8:147–59.
- [32] Baslé MF, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D. Shape and orientation of osteoblast-like cells (Saos-2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *J Biomed Mater Res* 1998;40:350–7.
- [33] Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003;72:2–4.
- [34] Kluger R, Bouhon W, Freudenberger H, Kroner A, Engel A, Hoffmann O. Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. *Bone* 2003;32:291–6.
- [35] Ergun C, Webster TJ, Bizios R, Doremus RH. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure. *J Biomed Mater Res* 2002;59:305–11.
- [36] Monboisse JC, Borel JP. Oxidative damage to collagen. *Exs* 1992;62:323–7.
- [37] Suzuki H, Hayakawa M, Kobayashi K, Takiguchi H, Abiko Y. H₂O₂-derived free radicals treated fibronectin substratum reduces the bone nodule formation of rat calvarial osteoblast. *Mech Ageing Dev* 1997;98:113–25.
- [38] Ohshima M, Jung SK, Yasuda T, Sakano Y, Fujimoto D. Active oxygen-induced modification alters properties of collagen as a substratum for fibroblasts. *Matrix* 1993;13:187–94.
- [39] Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials* 2003;24:3417–26.
- [40] Mould DL, Dawson AM, Smith W. Scrapie in mice. The stability of the agent to various suspending media, Ph and solvent extraction. *Res Vet Sci* 1965;36:151–4.

ARTICLE 2

**Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells
for the repair of critical bone defects:
An experimental study in mice**

Dumas A., Moreau M.F., Ghérardi R.K., Baslé M.F., Chappard D.

Soumis à Journal of Biomedical Material Research, part A: JBMR-A-07-0905

La réparation des pertes osseuses de taille critique représente toujours à l'heure actuelle un challenge pour la médecine régénérative. Les thérapeutiques usuelles de chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale ont montré leurs limites. L'autogreffe est limitée par les volumes pouvant-être prélevés chez le patient, insuffisants pour combler des déficits de grande taille. Les allogreffes sont disponibles en plus grands volumes, mais l'absence de potentiel ostéogénique par l'absence de cellules ostéoformatrices augmente grandement le temps d'intégration du greffon et le nombre de non-unions. Il en est de même pour les biomatériaux qui peuvent également présenter des limites mécaniques à leur utilisation en grand volume. La découverte des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de leur multipotentialité a permis le développement de l'ingénierie tissulaire pour la réparation du tissu osseux (Kassem 2004). Cette stratégie consiste à combiner un biomatériau, des cellules ostéogéniques et/ou des facteurs de croissance (Niklason 2000). De nombreuses combinaisons sont possibles et une construction hybride matrice/cellules optimale pour la réparation de pertes osseuses de grande taille reste à découvrir.

Lors de cette étude, nous avons testé les capacités de régénération osseuse, dans un modèle murin de craniotomie critique, d'une construction combinant une matrice osseuse xénogénique et des cellules stromales de moëlle osseuse (BMSC) allogéniques. La matrice osseuse a été préparée à partir de la spongieuse secondaire de condyles tibiaux bovins et purifiée selon le procédé au bicarbonate de sodium (NaHCO_3) décrit dans l'article 1. Cette matrice nous semble un biomatériau de choix pour l'ingénierie tissulaire car : (1) elle est disponible en grande quantité et peut-être produite industriellement, (2) elle possède des propriétés mécaniques proches de celles de l'os au niveau du site de greffe, (3) elle est cytocompatible, non inflammatoire et (4) elle est ostéoconductrice par sa composition et sa microarchitecture naturelles. Les cellules utilisées sont issues de la moëlle osseuse de souris transgéniques pour la Green Fluorescent Protein (GFP) (lignée C57Bl/6TgN-(actEGFP)OsbY01) (Okabe *et coll.* 1997). Le transgène codant pour la GFP étant intégré dans le génome des souris, ainsi toutes les cellules nucléées de ces souris expriment constitutivement la GFP dans leur cytoplasme. Ce modèle de souris a permis d'utiliser la GFP comme marqueur « naturel » des cellules transplantées, dont l'observation *in situ* ne nécessite aucune technique de détection.

Le protocole d'élaboration des constructions utilisées dans cette étude est schématisé dans la **figure 15**. Les BMSC ont été sélectionnées par leur propriété d'adhésion à un support (boîte de culture) et ont été amplifiées dans un milieu de culture standard pendant 14 jours. Les BMSC ont été déposées sur les xénogreffes purifiées. Les constructions hybrides ainsi formées sont maintenues en culture pendant 14 jours afin de permettre l'amplification des cellules à la surface de la xénogreffe et la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Deux conditions de culture ont été testées, deux groupes ont été formés :

- Groupe G-BMSC : la construction matrice/cellule est cultivée dans un milieu standard.
- Groupe G-Ob : la construction est cultivée en présence d'acide ascorbique 2-phosphate, de β -glycérophosphate et de dexaméthasone, constituants induisant la différenciation ostéoblastique des BMSC (Grigoriadis *et coll.* 1988).

Les cellules cultivées sur les xénogreffes dans le milieu ostéogénique présentent, au moment de l'implantation, une activité phosphatase alcaline plus élevée que les cellules de la construction G-BMSC, témoin d'une différenciation ostéoblastique.

Le potentiel ostéogénique de ces deux constructions sera comparé à celui de la xénogreffe seule, implantée sans cellules (groupe G).

Le modèle de déficit osseux au niveau du crâne de souris a été élaboré pour cette étude. Le dispositif expérimental est illustré **figure 16**. Le trou est réalisé à l'aide d'un trépan à bords rodés et diamantés de 4 mm de diamètre externe. La trépanation est faite à la vitesse de rotation minimale sous irrigation constante de sérum physiologique. La perceuse est fixe et orientée de manière à ce que le trépan soit bien perpendiculaire à l'os pariétal. La souris est fixée dans un cadre stéréotaxique placé sur un élévateur. La souris est montée grâce à l'élévateur jusqu'à trépanation de l'os sur toute son épaisseur (environ 250 μ m) en évitant d'endommager la dure mère (**Figure 17**). Après la mise en place du greffon (4 mm de diamètre et 300 μ m d'épaisseur), la peau est recousue par une suture non résorbable.

Souris C57Bl/6TgN-(actEGFP)Osby01

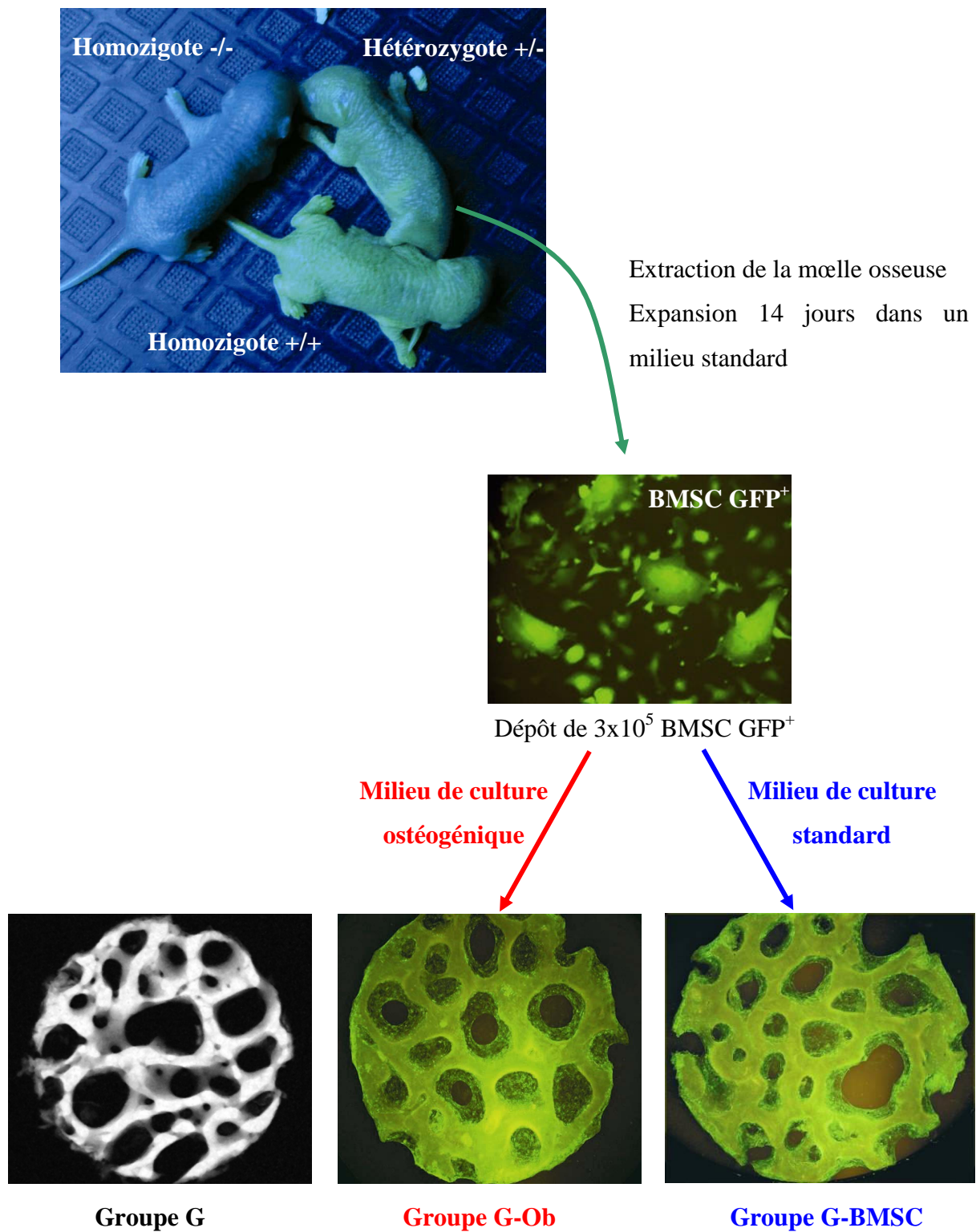


Figure 15 : Protocole d'élaboration *in vitro* des constructions matrice/cellules pour la réparation de lacunes au niveau du crâne de souris.

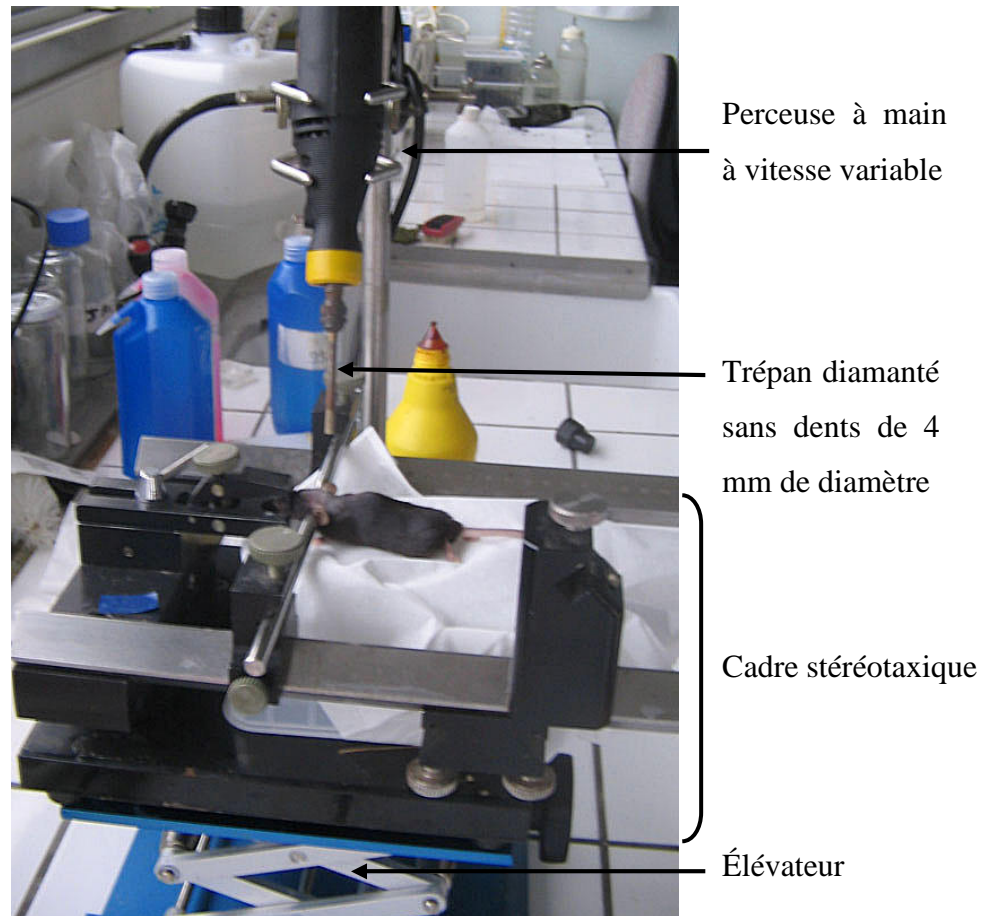


Figure 16: Photographie du dispositif expérimental pour la création du défaut de taille critique au niveau du crâne de la souris.

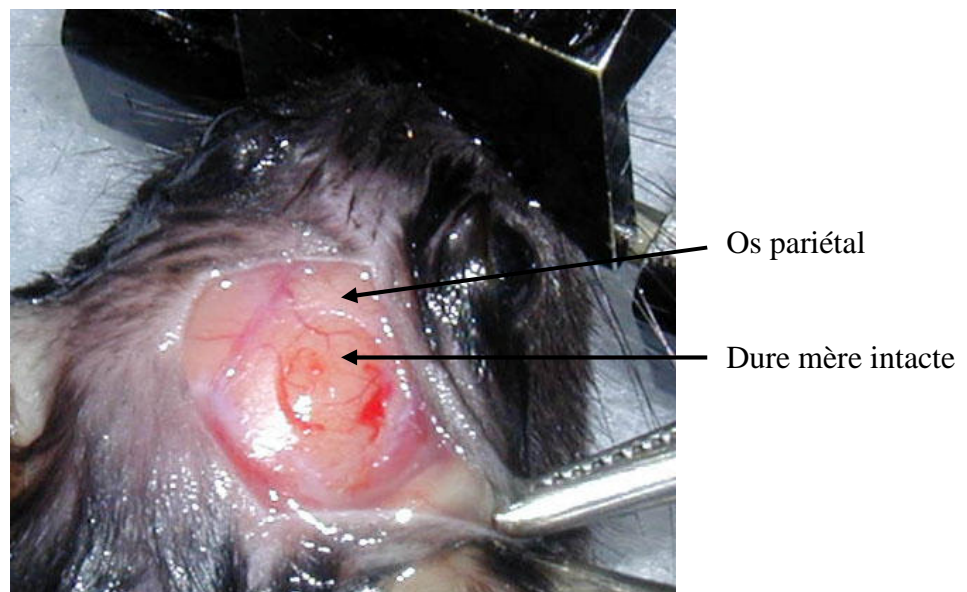


Figure 17 : Photographie du défaut osseux réalisé au niveau du crâne de la souris.

Les animaux ont été euthanasiés 2 ou 8 semaines après implantation. Les crânes ont été examinés par radiographie à rayons X et histologie. Seuls les greffons restés en place au niveau du trou ont été analysés.

Les analyses radiographiques ont permis de visualiser et de quantifier le pourcentage de comblement des défauts par de l'os minéralisé. La xéno greffe à elle seule permet un comblement de 56% en moyenne au moment de l'implantation. L'ostéoformation induite par la xéno greffe est principalement observée au niveau des marges du défaut et progresse le long des travées du greffon. La quantité d'os formée ne devient significative qu'après 2 semaines d'implantation. L'implantation de cellules cultivées sur la xéno greffe a, dans 65% des greffes réalisées, accéléré fortement la formation osseuse, visible dès 2 semaines après implantation et jusqu'au centre du greffon. Le taux de comblement atteint 76% en moyenne pour le groupe G-BMSC à 8 semaines ($p < 0.05$ vs. Groupe G) avec un maximum à 92% et 70% pour le groupe G-Ob. Les résultats obtenus avec les constructions hybrides n'ont pas augmenté de manière significative entre 2 et 8 semaines d'implantation. Les observations histologiques ont montré le remplacement partiel du woven bone observé à 2 semaines par de l'os lamellaire à 8 semaines (**Figure 18**). Les analyses radiographiques ne permettent pas de distinguer l'évolution de la xéno greffe et de l'os nouvellement formé.

L'analyse histomorphométrique des coupes des défauts osseux comblés permet de mesurer distinctement les volumes osseux de la xéno greffe et de l'os nouvellement formé (**Figure 19**). Les travées xénogéniques sont facilement identifiables car elles présentent au moins un bord droit (coupé) et des ostéoplastes vides. (**Figure 18**). Ces analyses complémentaires ont révélé que le volume d'os nouvellement formé augmente entre 2 et 8 semaines pour le groupe G-Ob et est en fait légèrement plus important que pour le groupe G-BMSC (**Figure 20**). Le volume de la xéno greffe est resté inchangé 8 semaines après implantation pour tous les groupes. Contrairement aux données de la littérature, l'induction de la différenciation ostéogénique des cellules avant l'implantation n'a pas augmenté de manière significative la formation osseuse ni en terme de vitesse ni en quantité d'os déposé.

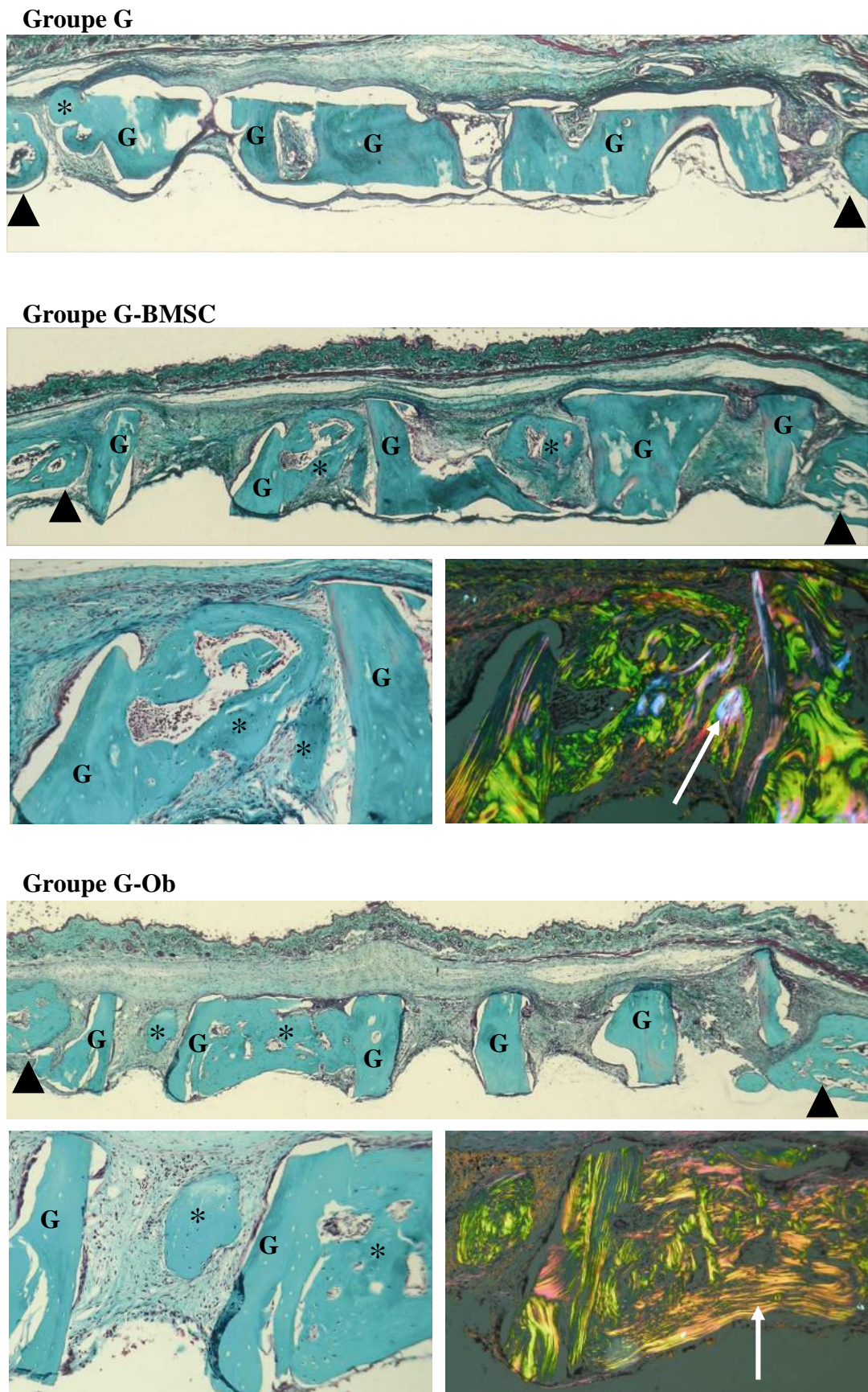
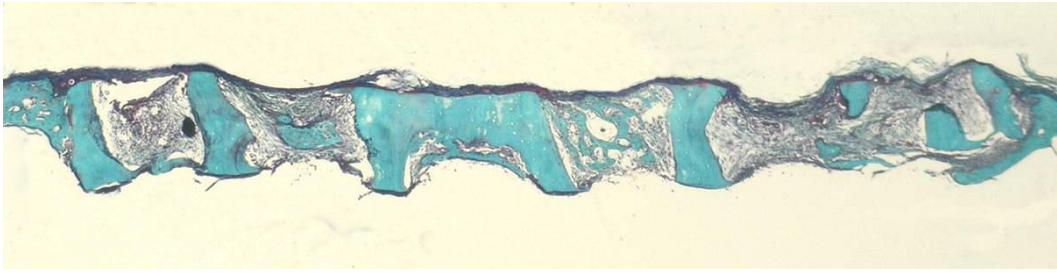
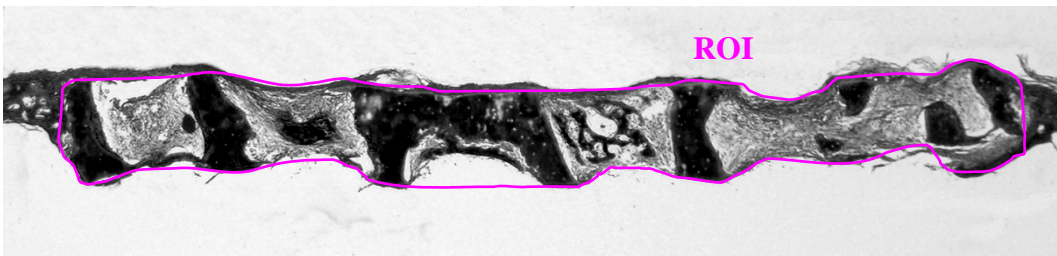


Figure 18: Analyses histologiques des greffons 8 semaines après leur implantation. Coloration au trichrome de Masson. ▲ : marges du défaut ; * : os nouvellement formé ; G : xéno greffe ; → : os lamellaire.



Photographie numérique en mode colorimétrique RVB d'une coupe histologique de site de greffe colorée au trichrome de masson.



Sélection de la couche rouge permettant d'accentuer le contraste des verts. Dans le logiciel CTan (Skyscan), délimitation de la région d'intérêt (ROI).



Seuillage et binéarisation de l'image. Calcul de la surface blanche par rapport à la surface totale de la ROI.

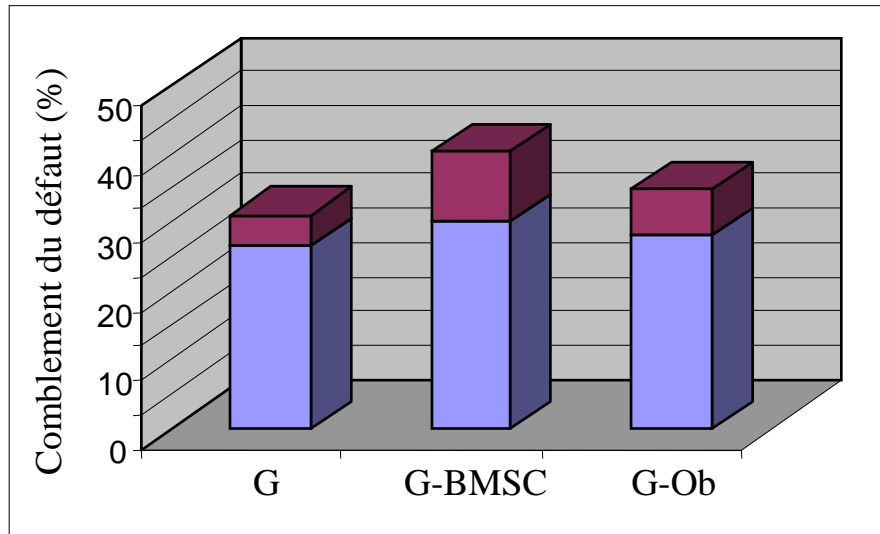
$$B.Ar/T.Ar = \text{surface blanche/surface totale de la ROI.}$$



Les calculs sont réitérés avec l'image dont l'os nouvellement formé a été effacé. Ces calculs sont effectués sur 10 coupes couvrant l'ensemble du greffon.

Figure 19 : Méthode d'analyse histomorphométrique pour la mesure des volumes osseux greffés et néoformés.

2 semaines après implantation



8 semaines après implantation

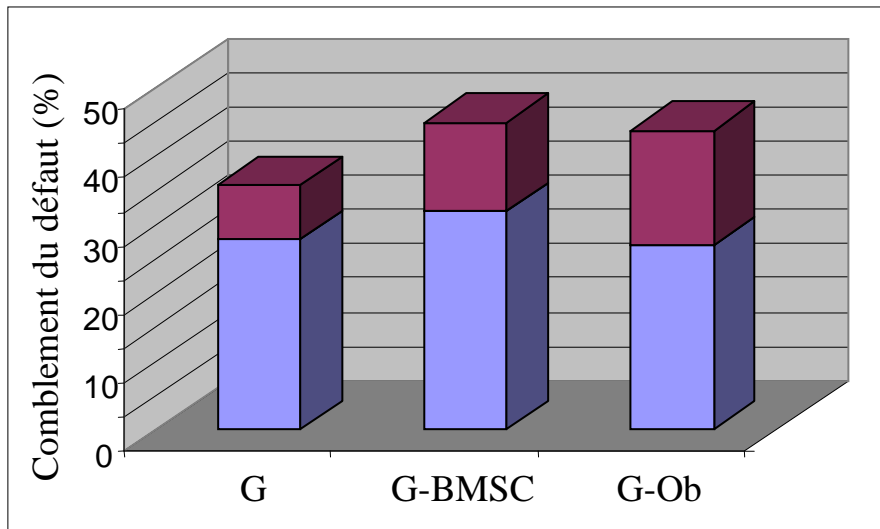


Figure 20 : Quantification de la régénération osseuse par histomorphométrie.

La présence de cellules sur la xéno greffe au moment de l'implantation a fortement accéléré la régénération osseuse au niveau du défaut. Ont-elles directement participé à la formation osseuse ? Le modèle de cellules GFP⁺ nous a permis de suivre le devenir des cellules implantées. Quelques cellules GFP⁺ ont été observées au niveau du site de greffe 2 semaines après l'implantation mais aucune à 8 semaines. Peu de cellules survivent à l'implantation et elles semblent ne pas proliférer *in situ*. A 2 semaines, elles sont localisées le long des travées xénogéniques, dans le tissu conjonctif, mais aucune cellule implantée n'a été incorporée dans la matrice osseuse néoformée. Ces résultats suggèrent que l'action des cellules implantées sur la formation osseuse serait indirecte, par la sécrétion de facteurs ostéogéniques stimulant le recrutement, la différenciation et l'activité des ostéoprogéniteurs locaux de l'hôte par exemple.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer les potentiels thérapeutiques de l'ingénierie tissulaire combinant une matrice xénogénique et des BMSC pour la réparation de pertes osseuses de taille critique en chirurgie maxillo-faciale. Néanmoins, nous n'avons pas obtenu de réparation totale du déficit en 8 semaines et peu d'évolution entre 2 et 8 semaines. Nous pensons que la souris n'est pas le modèle animal adapté pour l'utilisation d'une matrice osseuse bovine. La taille des travées xénogéniques paraissent trop grandes pour ce modèle et semblent constituer des barrières de la totalité de l'épaisseur du crâne de souris freinant les possibilités de migration cellulaire notamment.

**Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for
the repair of critical bone defects:
An experimental study in mice**

Aline Dumas^a, Marie-Françoise Moreau^a, Romain K Ghérardi^b,
Michel F. Baslé^a, and Daniel Chappard^{a*}

^a INSERM, U 922 - LHEA, Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex, FRANCE

^b INSERM, EMI 0011, Faculté de Médecine, 94000 CRETEIL, FRANCE

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.
INSERM, U 922
Faculté de Médecine,
49045 ANGERS Cedex - FRANCE

Tel: (33) 241 73 58 64

Fax : (33) 241 73 58 86

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

Key words: Tissue engineering, bone marrow stromal cells, osteoblast, xenograft, bone defect, GFP

Abstract

Tissue engineering of autologous bone combined with osteoprogenitor cells is a suitable strategy for filling large bone defects. The aim of the present study was to evaluate the osteogenicity of a xenogenic bone graft cultured with allogenic bone marrow stromal cells (BMSC) in a mouse critical size craniotomy. Bovine trabecular bone grafts were made free of bone marrow cells or debris, and delipidated. BMSC were harvested from C57BL/6-Tg(ACTbEGFP)1Osb/J mice (GFP⁺ cells) and were cultured 14 days on bone grafts in control or osteogenic medium. Engineered grafts were implanted in calvarial defect in C57BL/6 mice. Four groups were studied: graft with BMSC differentiated in osteoblasts (G-Ob), graft with BMSC (G-BMSC), graft without cells (G) and no graft. Calvariae were studied 2 and 8 weeks after implantation by radiographic and histomorphometric analyses. G group: the bone ingrowth was limited to the edges of the defect. The center of the graft was filled by a fibrovascular connective tissue. G-BMSC or G-Ob groups: bone formation occurred early in the center of the defect and did not increase between 2 and 8 weeks; the newly formed woven bone was partially replaced by lamellar bone. The preoperative osteoblastic differentiation of BMSC did not allow faster and better bone regeneration. After 2 weeks, GFP⁺ cells were observed around the grafted bone but no GFP⁺ osteocyte was present in the newly formed bone. No GFP⁺ cell was noted after 8 weeks. However, pre-implantation culture of the biomaterial with allogenic BMSC greatly enhanced the bone regeneration.

Introduction

Even if autologous bone graft remains the most suitable treatment for bone defect, its use is limited by an insufficient supply and significant additional surgical morbidity [1]. Engineering of bone grafts combining various scaffolds, cells and bioactive factors, is a recently proposed approach that aims at mimicking as much as possible an autograft [2]. The success of the repair is to obtain a tissue replacement that promotes and preserves the required mechanical, structural and biological properties of the patient's bone. The main challenge is the design of the most favorable osteoconductive and osteoinductive matrix [3]. At that time, the matrix that ideally reproduces biomechanical, microarchitectural, biological features of bone is bone from another origin. Bone allografts and xenografts have been proposed as an alternative to autograft [4,5,6]. Bovine bone provides large volumes of cancellous matrix with suitable microarchitecture and osteoconductive properties. Problems associated with bone allografts or xenografts consist in processing difficulties to make them clean, non immunogenic, safe while retaining their osteoconductive properties. In addition, clinical results are by far less satisfactory than when using autologous bone. Combining allogenic or xenogenic bone tissues with bone cells from the donor may help to overcome the problems related to donor site morbidity and size limitations. Tissue engineering is an emerging interdisciplinary field that seeks to prepare new biomaterials by "applying the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function" [2]. Several kinds of synthetic osteoconductive materials, calcium-phosphate ceramics in majority, have been considered as bone substitutes [7,8]. However, due to their poor

biomechanical properties they are not suitable in weight-bearing areas and bone allografts still represented the most significant part of the market in the USA [9]. The combination of bone matrix with osteogenic cells would confer a better osteogenicity. Bone marrow stromal cells (BMSC) contain osteoblast progenitors and can be used for bone tissue engineering because of their osteogenic properties and the facilities to isolate and expand them from the bone marrow [10,11]. Different strategies have been elaborated by investigators to optimize bone repair: cells can be cultured on the scaffold before implantation [12,13] or seeded at the time of implantation [14]. In addition, various cell differentiation statuses have been used. In preclinical studies, it is of interest to evaluate the fate and contribution of grafted cells in the healing of a bone defect.

Different cell markers have been proposed to identify donor cells in the grafted site [14,15,16,17]. Their detection requires immunocytochemical or *in situ* hybridization techniques. The green fluorescent protein (GFP) and its variants, such as enhanced-GFP, are useful cell markers which have been popularized with the development of GFP transgenic animals [18,19]. Grafted GFP⁺ cells are traceable in recipient animals because GFP (i) does not naturally exist in mammalian species, (ii) is undiluted during cell division, (iii) is easily detected by fluorescent microscopy. It has been shown that GFP⁺ stem cells from transgenic mice retained the ability to undergo osteogenic differentiation [20], thus allowing their use in experimental tissue engineering studies.

The aim of this study was to compare the efficiency of allogenic BMSC cultured on a xenogenic bone graft to repair a critical-sized craniotomy in mice. GFP⁺ BMSC allowed the study of their roles in the bone formation process.

Materials and methods

Preparation of xenogenic bone grafts

Xenogenic grafts were prepared from trabecular bone of bovine tibia kept frozen at -20°C. They were thawed at room temperature and blocks of cancellous bone were prepared from the secondary spongiosa. Transverse slices (approximately 0.6 mm in thickness) were made with a precision saw (Accutom-2, Struers, Copenhagen, Denmark) and grinded to a final thickness of 0.3 mm by sandpapering (grit 1000, Struers). The cleaning and purification process were used as previously described [21,22]. Briefly, bone slices were soaked in sodium hydrogenocarbonate 5% in distilled water at 50°C for 24 h (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) to remove cells and organic materials, extensively defatted in pure acetone and dehydrated in pure ethanol. Discs (4 mm in diameter) were prepared from the slices with a punch. They were sterilized by UV light for 24 h before cell culture or implantation.

Mouse bone marrow stromal cells isolation and culture

Six to 8 week-old C57BL/6TgN-(actEGFP)Osby01 mice generously provided by Prof. R. Ghérardi (INSERM, EMI 0011, Créteil - France), were used to harvest bone marrow. This transgenic mouse line has an "enhanced" GFP cDNA under the control of a chicken β -actin promoter and cytomegalovirus enhancer. This confers a green fluorescence to all tissues under UV light (with the exception of erythrocytes and hair) [19]. The Animal Care and Use committee at the University of Angers approved all procedures. Bone marrow from the femoral, tibial, and humeral medullary cavities was flushed with Dubbleco's-modified Eagle's medium supplemented with 2 mM

glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (DMEM, Eurobio, Les Ulis, France) and filtered through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France). The entire marrow content was plated into two 75 cm² culture flasks (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing DMEM, supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Seromed Biochrom, Berlin, Germany). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Confluent layers of adherent cells were formed in 14-16 days and were harvested using trypsin-EDTA (Eurobio) for 15 min at 37°C and scraping. All cells were GFP⁺ as evidence under UV microscopy.

Cell seeding on xenogenic bone

Discs of xenogenic bone were incubated in 50 μ l of culture medium 20% FCS in a 96-well plate 24h before cell seeding. A suspension of 3x10⁵ GFP⁺ BMSC in 200 μ l was deposited on each disc. They were transferred into new wells on the next day and cultured in a control medium (DMEM with 15% FCS) or in an osteogenic medium consisting in control medium supplemented with 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate and 10⁻⁸ M dexamethasone [23]. Culture was maintained 14 days before implantation.

Mouse calvarial defects

Seventy recipient C57BL/6NHsd mice (7-8 weeks old) were purchased from Harlan (Gannat, France). Surgery was performed under anaesthesia achieved by intraperitoneal injections of xylazine 5 mg/kg (Rompun[®] 2%, Bayer, Leverkusen, Germany) and ketamine 100 mg/Kg (Ketalar[®], Pfizer, Zurich, Switzerland). Mice were placed in a stereotaxic frame. A midline skin incision was made, the underlying periosteum was removed and a 4-mm full thickness calvarial defect was created with a

diamond-tipped coring tool (Starlite, Rosemont, PA, USA) in the right side under constant irrigation with 0.9 % NaCl. The dura matter was kept as intact as possible. Grafts were rinsed in PBS pH 7.4 and used to fill the defect. Skin was closed with 3-0 silk suture (Ethicon, Issy les Moulineaux, France). The operated mice were divided into 4 experimental groups that received the following grafts: (1) xenogenic bone graft cultured with BMSC in osteogenic medium (G-Ob), (2) xenogenic bone graft cultured with BMSC in control medium (G-BMSC), (3) graft alone (G) or (4) no implant (unfilled). Eight mice did not survive. Animals were sacrificed 2 or 8 weeks post-surgery, so at least 6 animals per group and per time post-surgery were studied (55 calvariae were processed for further analysis). Calvariae were removed with scissors and fixed in paraformaldehyde 4% in PBS for 48h at 4°C.

Scanning Electronic Microscopy

After 1 and 14 days of culture, bone discs with cells were fixed with 4% glutaraldehyde in PBS for 1 h 30 at 4°C, post-fixed in osmium tetroxide (1% in distilled water) for 2 h, dehydrated in a graded ethanol series, critical-point dried under CO₂ and carbon-coated. Observations were done with a JEOL JSM 6301F field emission scanning electron microscope with an accelerating 3 kV voltage.

Cell number and differentiation

After 14 days of culture on xenograft in control or osteogenic medium, cells were harvested by trypsin-EDTA treatment; vigorous washes with PBS ensured that no cell remained in the xenograft as seen under an inverted microscope. The number of cells was determined with a Malassez's cell after exclusion of dead cells with trypan blue. Cells were lysed by sonication in Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.5, 0.1% Triton X 100.

Alkaline phosphatase (ALP) activity was quantified by reaction with 2.5 mM paranitrophenyl phosphate in 0.1 M 2-amino-1-methyl-1-propanol buffer, pH 9.8, supplemented with 2 mM MgCl₂. The reaction was stopped with NaOH 0.5 N and paranitrophenol formed was measured at 410 nm on a spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Results were normalized for protein content, determined using a protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA). Nine assays were done in each culture condition.

Radiographic analysis

Digital radiographs of the dissected calvariae were taken at x 6 magnification with a Faxitron machine at 26 kV (Faxitron Edimex, Angers, France). The percentage of mineralized bone within the defect was measured by image analysis (Image J software, NIH, USA). Briefly, a circle selection was used to define the defect area in term of pixels number. After thresholding to select white pixels corresponding to bone, the percentage of bone was calculated. Radiographs of non implanted discs were taken as control for measuring bone area at the time of implantation (N = 6).

Histologic and histomorphometric procedures

Calvariae were decalcified for 7 days in EDTA 15% pH 7.4. They were protected from sun light during all the procedure. They were dehydrated in graded ethanol solutions, embedded in paraffin, and sectioned (5 µm thick). Slides for histomorphometric and fluorescence analysis were prepared from semiserial sections every 300 µm i.e., 10 to 12 slides to cover the whole defect. Sections were stained with Masson's trichrome. Microphotographs of the overall defect were taken at a x25 magnification, binarized and the whole defect space was considered as the region of

interest. The nomenclature used hereafter follows the recommendations of the Histomorphometric committee of the American Society for Bone and Mineral Research [24]. T.Ar and B.Ar (resp. surface areas of the region of interest and bone) were measured with CTan software (release 1.5; Skyscan, Aartselaar, Belgium). The newly formed bone B^+ was easily identified from the xenogenic bone B^x due to the presence of osteocytes in the lacunae. Bone volume was measured separately for newly apposed and for grafted bone (resp. $B^+.Ar/T.Ar$ and $B^x.Ar/T.Ar$).

Fluorescence observations and immunohistochemistry of GFP

For the localization of GFP⁺ grafted cells, slides were stained with DAPI dilactate (Sigma), mounted in Fluorescent mounting medium (DakoCytomation, Trappes, France) and examined under fluorescent microscopy (LEITZ DMR, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France). In addition, GFP was detected by immunohistochemistry. After antigen retrieval by incubation for 20 min in 95°C acid citrate buffer, endogenous peroxydase was inactivated by incubation with 3% H₂O₂ for 5 min. Rabbit polyclonal antibodies against GFP (1/1000, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were incubated with the sections for 5 min. The secondary antibody used was a biotinylated polyclonal goat anti-rabbit antibody revealed by peroxydase-conjugated streptavidin (Dako). Peroxydase activity was revealed by the diaminobenzidine reaction according to the manufacturer's instructions; sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Entellan.

Statistical analysis

Statistical study was performed using SYSTAT statistical software (release 11.0). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Normal

distribution of data was assessed by controlling the skewness and kurtosis coefficients (positive and close to 0). Significant differences between groups were assessed by analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-hoc test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

In vitro results

One day after seeding, cells adherent to xenogenic bone exhibited different morphologies with flat and elongated cells or round ones (Fig. 1A). They were evenly distributed on sawed and intact trabecular surfaces. Under fluorescence microscopy, cells appeared to have covered the whole graft surface after 3 days; at day 14, multiple layers of cells had formed (Figs. 1C and D). Cells entrapped within a thin collagen scaffold tended to fill the cancellous spaces (Figs. 1B and C). No differences could be distinguishable between xenogenic grafts cultured in control or osteogenic medium.

Cells grown on xenografts had differentiated into osteoblastic cells (as evidenced by a significant increase in ALP activity) after 14 days in the osteogenic medium (Fig. 2A). The number of cells did not significantly differ between both culture mediums (Fig. 2B).

In vivo X-ray results

No surgical complications nor signs of infection were observed in this study. Radiographs of each group are shown in Fig. 3 and the amounts of bone are presented in table 1. No bone formation occurred in unfilled defects (Figs. 3A and B). A limited

marginal bone ingrowth was noticeable in the G group, 2 weeks after implantation and progressed further centripetally along the trabeculae (Figs. 3C and D). The close contact of the graft with the defect margins promoted osteoconduction. Newly formed bone was observed in 7 samples out of 10 of the G group at 8 weeks.

The amount of bone obtained in the G-BMSC group was significantly increased compared to the G group (+23% at 2 weeks and +16% at 8 weeks). Radiographs showed that newly mineralized bone was present at the center of the defect (Fig. 3E). The bone filling remained incomplete after 8 weeks (Fig. 3F). Osteogenesis was minimal for 2 grafts out of 7 for the G-BMSC group at 2 weeks and 3 out of 7 at 8 weeks.

In the G-Ob group, the amount of bone was not significantly different from G-BMSC and G groups. Radiographs appeared very similar to those of the G-BMSC group with mineralized bone at the center of the defect (Figs. 3G and H). Osteogenesis was minimal for 3 grafts out of 6 for the G-Ob group at 2 weeks and 1 out of 6 at 8 weeks.

Histologic and histomorphometric analysis

Bone formation developed in all samples without an endochondral phase. Osteogenesis occurred at the surface and extended between the xenogenic bone trabeculae. Some osteogenic foci developed along the lower side of the graft (toward the dura matter) but never along the upper side (under the skin). The respective proportions of grafted and newly formed bone area appear in table 2. $B^x.Ar/T.Ar$ was not significantly different between all groups.

1. The G Group (Fig. 4): Two weeks after implantation, the bone ingrowth was limited to the edges of the defect. The center of the graft was filled by a loose fibrovascular connective tissue. After 8 weeks, the amount of bone was significantly

increased and the spaces were filled with a denser connective tissue. Bone regeneration was incomplete and did not completely anchor the graft at the defect margin. A contiguous periosteal layer was observed along the upper side of the graft. Some multinuclear cells resembling osteoclasts were found at the surface of trabeculae.

2. The G-BMSC Group (Fig. 5): BMSC significantly increased osteogenesis leading to the development of a plexiform network of thin trabeculae at 2 weeks after implantation. The newly formed bone appeared anchored at the surface of the grafted bone and extended in the cancellous space. It was composed of woven bone as evidenced under polarized light (Fig. 5C). The connective tissue was well vascularized, with an isotropic distribution of fibroblasts and without foci of inflammatory cells. After 8 weeks of healing, the peripheral anchorage of the graft remained incomplete on its margins. The new bone was compact and composed of packets of lamellar bone together with areas of woven bone (Fig. 5F). Well differentiated marrow cavities were filled with a densely packed connective tissue containing adipocytes. Xenogenic bone surfaces were covered by a layer of flattened cells; some multinuclear cells were occasionally observed. $B^+.Ar/T.Ar$ did not significantly increase upon time of implantation.

3. The G-Ob group (Fig. 6): The connective tissue was obviously more anisotropic after 2 weeks of implantation and dense sheets of collagen fibers were observed. Multinuclear cells were found much present along the xenogenic bone surfaces. A significant increase in $B^+.Ar/T.Ar$ was noted at 8 weeks. Packets of new lamellar bone were evident. Xenogenic bone surfaces were covered by a unicellular layer suggesting lining cells.

Tracing grafted cells

GFP⁺ cells were present in the defect area after 2 weeks of implantation but not after 8 weeks whether cells were differentiated or not. GFP⁺ cell number was similar in both groups. They were located along the trabecular surfaces of the bone graft or loosely distributed in the connective tissue (Fig.7A, B). No GFP⁺ osteocyte could be observed in the newly formed bone. There was no GFP⁺ cell in the surrounding tissues at distance from the graft (skin, calvaria, brain). Immunodetection of GFP confirmed fluorescence observations: GFP⁺ cells were rare and present near the graft (Fig. 7C) and in the area of bone formation but not as osteocytes (Fig. 7D).

Discussion

The co-implantation of cells on an osteoconductive scaffold has already been proposed to repair large defects in animal models [14,16,25] and in humans [26,27]. The final goal of this approach is to develop engineered grafts with a high osteogenic potential allowing a reduced healing period. In the present study performed in a mouse calvarial defect, we investigated the osteogenicity of a xenogenic bone graft cultured with mouse BMSC, whether differentiated in osteoblast or not. Bovine bone blocks have been successfully used as xenografts to repair bony defects in human, because they have mechanical properties, porosity and pore interconnectivity very similar to human bone [28]. These microarchitectural features of the biomaterial are considered as key factors in tissue engineering because they increase cell ingrowth and vascularization of the neo-tissue [29,30]. Xenogenic bovine bone is known to be biocompatible and

osteoconductive in mice, rabbits and humans [31,32]. In addition, it is completely resorbed at long term by the remodeling process.

In this study, it allowed new bone formation in the critical size defect, due to osteoblastic cells migrating from the adjacent bone marrow cavities and host periosteum [33]. Osteoconduction was not sufficient enough to have new bone formed in the center of the graft at 8 weeks. The preoperative culture of syngenic BMSC onto the graft greatly improved osseointegration and filling of the defect. The success of cell-based treatment of bone defect depends on the biomaterial itself but also of additional factors like:

(1) The source of cells [34]. The autogenic or allogenic BMSC are effectively used for tissue engineering because of their clinically feasible isolation, their *in vitro* proliferation capacity and their multilineage differentiation potential [35].

(2) The amount of cells. The higher the number of transplanted cells, the better the osteogenesis [36]. All seeded cells cannot survive after implantation and the number of grafted cells decreases with time [37,38]. In this study, multiple cell layers were formed on the graft surfaces after 14 days of culture, producing a large amount of cells. Similarly, Xia et al., have found multiple layers of BMSC on deproteinised bone after 21 days of culture in contrast with synthetic hydroxyapatite covered by a single layer of cells. Four weeks after subcutaneous implantation, they found implanted cells only in deproteinised bone [39].

(3) The culture on the biomaterial before implantation [13]. This pre-implantation culture allows colonization and homogenous distribution of cells onto the material surface and deposition of an extracellular fibrous matrix. As shown by others, this strategy has given better results than when cells were seeded at the time of implantation [11,12,13,40]. The extracellular matrix laid down on the graft contains

bone proteins, adherence proteins and growth factors that favor osteogenicity. These factors could provoke the local recruitment and differentiation of the receiver osteoprogenitor cells. The duration of the cell culture before seeding them onto the biomaterial has been stressed to be a critical factor in their ability to regenerate bone. Castano-Izquierdo *et al.*, have found that implants seeded with cells cultured for only 4 days had an higher amount of bone formation than those cultured for longer periods [41].

(4) The differentiation status of cells at the time of implantation. According to previous studies, a graft cultured with BMSC in an osteogenic medium showed faster bone formation (within 1 week) [17,40]. The osteogenic potency of such engineered biomaterials was compared with the same materials enriched with cells at the time of implantation. In our study, we compared the efficiency of the grafts cultured either with undifferentiated BMSC or differentiated osteoblastic cells. Both cultured grafts (G-BMSC and G-Ob groups) were osteogenic 2 weeks after implantation. We failed to identify any effect of cell differentiation on bone formation either in term of speed and amount of bone deposited.

Bone formation induced after implantation of the G-BMSC and G-Ob grafts did not increase between 2 and 8 weeks. The newly formed woven bone at 2 weeks was partially replaced by lamellar bone at 8 weeks. The defect was not completely filled after 8 weeks in this study whereas other authors have obtained a complete repair with allogenic BMSC and a gelatin sponge in the same model [14]. Thickness of the parietal calvaria does not exceed 300 μm . The xenogenic bone graft, designed for this model, formed full thick blocks as seen in transversal sections. These bone blocks may act as a lateral barrier. The osteoconductive surface of the graft was thus limited. This

biomaterial, combined with osteogenic cells, will be investigated in larger animals with tissue volumes suitable for clinical application in reconstructive surgery.

The use of cells from GFP transgenic mice allowed tracking the grafted cells on histological sections. The conservation of GFP fluorescence needs special technical cares such as an aqueous mounting medium and undecalcified embedding methods usually used in bone studies are not compatible. Detection of GFP after decalcification is controversial. Gentle decalcification with buffered EDTA allowed conservation of the fluorescence, in opposition with acid decalcification [42]. Some grafted cells survived after implantation up to 2 weeks but not after 8 weeks. Their contribution to the osteogenic process is evident but this contribution is probably indirect because no GFP⁺ osteocyte could be observed. Results concerning the survival and localization of the grafted cells are very different in the literature. Similar findings than ours have been presented and showed that the grafted cell number decreases with time [37,38,43]. In contrast, Cowan et al., showed that donor cells constituted up to 99% of osteocytes in newly formed bone, 12 weeks after implantation in a mouse model [16]. The GFP⁺ cells from GFP transgenic mice have been previously used by others to track cells after bone marrow transplantation in wild type mice. GFP⁺ cells survived several months after transplantation and were found to integrate organs like muscle [44], brain [45] and kidney [46].

In conclusion, this study shows that pre-implantation culture of a biomaterial with allogenic BMSC greatly enhanced the repair of a critical size calvarial defect in mice. Osteogenic differentiation of BMSC did not result in a faster and better tissue repair. This cell-based strategy could be optimized particularly by enhancing cell osteogenicity and survival.

Acknowledgments

This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat – Région “Pays de la Loire” and BIOREGOS. Authors wish to thank Dr F. Chrétien (INSERM, EMI 0011, Créteil, France) for providing us the GFP transgenic mice and the SCIAM (Service Commun d’Imagerie et d’Analyses Microscopiques) of the University of Medicine of Angers.

References

1. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991;2:187-208.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
3. Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:64-75.
4. Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:23-33.
5. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:72-76.
6. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:454-464.
7. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 2004;25:443-450.
8. Hartman EH, Vehof JW, Spauwen PH, Jansen JA. Ectopic bone formation in rats: the importance of the carrier. *Biomaterials* 2005;26:1829-1835.
9. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:98-103.
10. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997;63:1059-1069.
11. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD. Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J Biomed Mater Res* 2004;69B:113-120.
12. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005;37:688-698.
13. Mendes SC, Sleijster M, Van Den Muysenberg A, De Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:575-581.
14. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998;66:1272-1278.
15. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Relat Res* 1991;274-283.
16. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004;22:560-567.
17. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:913-927.

18. Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:288-295.
19. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407:313-319.
20. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:871-877.
21. Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2000;21:369-376.
22. Dumas A, Gaudin-Audrain C, Mabilieu G, Massin P, Hubert L, Basle MF, Chappard D. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials* 2006;27:4204-4211.
23. Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem* 1998;71:55-62.
24. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FG, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2:595-610.
25. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959-963.
26. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-770.
27. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-386.
28. Chappard D, Guggenbuhl P, Legrand E, Basle MF, Audran M. Texture analysis of X-ray radiographs is correlated with bone histomorphometry. *J Bone Miner Metab* 2005;23:24-29.
29. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121:317-324.
30. Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000;21:1291-1298.
31. Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Basle MF, Rebel A. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials* 1993;14:507-512.
32. Levai JP, Boisgard S. Acetabular reconstruction in total hip revision using a bone graft substitute. Early clinical and radiographic results. *Clin Orthop Relat Res* 1996;108-114.
33. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;S7-21.

34. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002;89:338-351.
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
36. Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23:49-53.
37. Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000;21:1345-1352.
38. Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Straeter J, Mobest D, Horch RE, Stark GB, Schaefer DJ. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med* 2006;10:695-707.
39. Xia Z, Ye H, Locklin RM, Ferguson DJ, Cui Z, Triffitt JT. Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005;26:5790-5800.
40. Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S, Ohta T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 2000;69:128-134.
41. Castano-Izquierdo H, Alvarez-Barreto J, van den Dolder J, Jansen JA, Mikos AG, Sikavitsas VI. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:129-138.
42. Tada M, Shinohara Y, Kato I, Hiraga K, Aizawa T, Demura M, Mori Y, Shinoda H, Mizuguchi M, Kawano K. Preparation and Observation of Fresh-frozen Sections of the Green Fluorescent Protein Transgenic Mouse Head. *Acta Histochem Cytochem* 2006;39:31-34.
43. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 2006;27:1071-1080.
44. Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-Browne G, Gherardi RK. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol* 2004;164:773-779.
45. Irons H, Lind JG, Wakade CG, Yu G, Hadman M, Carroll J, Hess DC, Borlongan CV. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. *Cell transplantation* 2004;13:283-294.
46. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T, Ohno T. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1401-1409.

Figures captions

- Fig. 1. BMSC from GFP transgenic mice on xenogenic bone graft. (A) 24h after seeding observed in SEM. (B, C and D) 14 days in osteogenic medium observed in SEM (B) or fluorescence microscopy (C, x40 and D, x100).
- Fig. 2. (A) Alkaline phosphatase activity of BMSC and (B) their number on xenogenic bone grafts at the time of implantation (i.e., after a 14 days culture in control (black bars) or osteogenic conditions (white bars)). NS, non significant.
- Fig. 3. Radiographs of mouse calvarial defects 2 weeks (A, C, E, G) and 8 weeks after surgery (B, D, F, H). (A, B) unfilled. (C, D) implantation of xenogenic bone graft alone. (E, F) implantation of xenogenic bone graft cultivated with BMSC. (G, H) implantation of xenogenic bone graft cultivated with BMSC in osteogenic medium. Note that the grafted cells (BMSC or Ob) are osteogenic as early as 2 weeks after implantation, filling central areas of the defect. White arrowheads: peripheral anchorage of the graft on calvaria margins.
- Fig. 4. Histological analysis of calvarial defects with implantation of xenogenic bone graft (G group). Sections were stained with Masson's trichrome. The bone ingrowth was limited to the edges of the defect. (A, B and C) The connective tissue was loose at 2 weeks, fibrovascular with no foci of inflammatory cells. Magnification: 25x (A) and 100x (B and C). (D, E and F) By 8 weeks, a continuous periosteal layer was observed along the upper side of the graft. Magnification: 25x (D) and 100x (E and F). Arrowheads: defect margins; G: grafted bone; asterisk: newly formed bone.
- Fig. 5. Histological analysis of calvarial defects with implantation of xenogenic bone graft cultured with BMSC from GFP transgenic mice (G-BMSC group). Sections were stained with Masson's trichrome. (A, B and C) 2 weeks after surgery: newly formed thin trabeculae present at the center of the defect. Magnification: 25x (A) and 100x (B and C). (D, E and F) 8 weeks after

implantation: xenogenic bone surfaces were covered by a unicellular layer suggesting lining cells. Magnification: 25x (D) and 100x (E and F). (C and F), photographs in polarized light showing woven bone or lamellar (\rightarrow) bone. Arrowheads: defect margin; *G*: grafted bone; asterisk: newly formed bone.

Fig. 6. Histological analysis of calvarial defects with implantation of xenogenic bone graft cultured with BMSC differentiated in osteoblasts (G-Ob group). Sections were stained with Masson's trichrome. (A, B and C) 2 weeks after surgery: note the unicellular layer covering the graft and the dense and oriented connective tissue. (C and F), photographs in polarized light showing woven bone or lamellar (\rightarrow) bone. Arrowheads: defect margin; *G*: grafted bone; asterisk: newly formed bone.

Fig. 7. Fluorescent microscopy of the G-BMSC group at 2 weeks post surgery. (A) GFP⁺ cells (\rightarrow) located along the bone graft. (B) GFP⁺ cells (\rightarrow) located in the connective tissue. (C and D) Observations confirmed by immunohistochemical detection of the GFP.

Figure 1

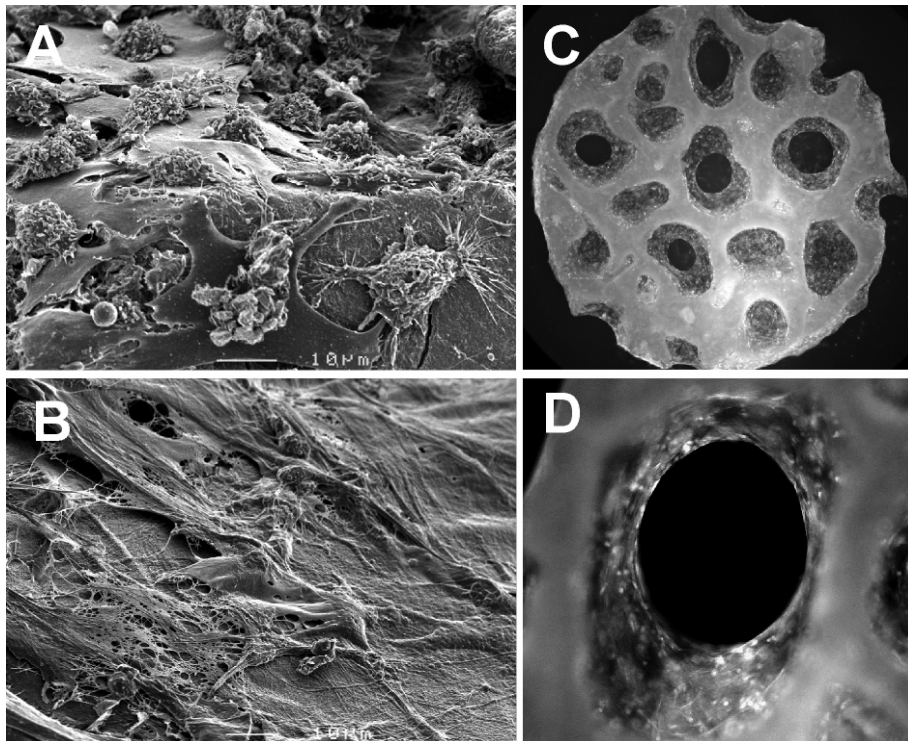


Figure 2

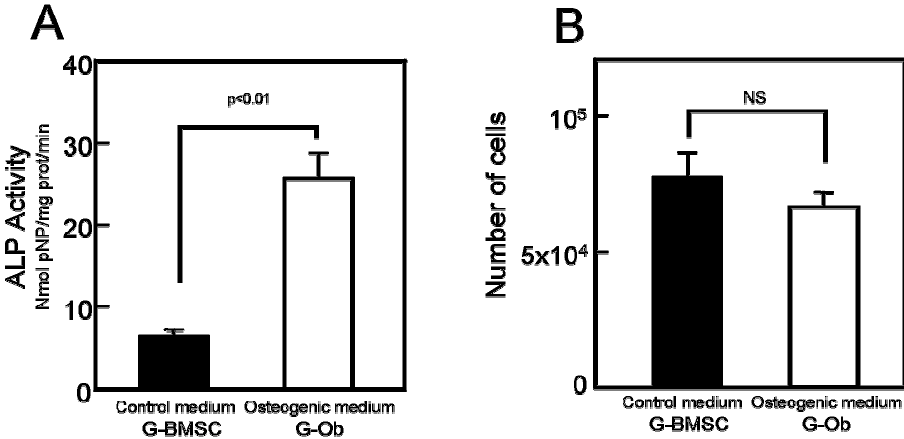


Figure 3

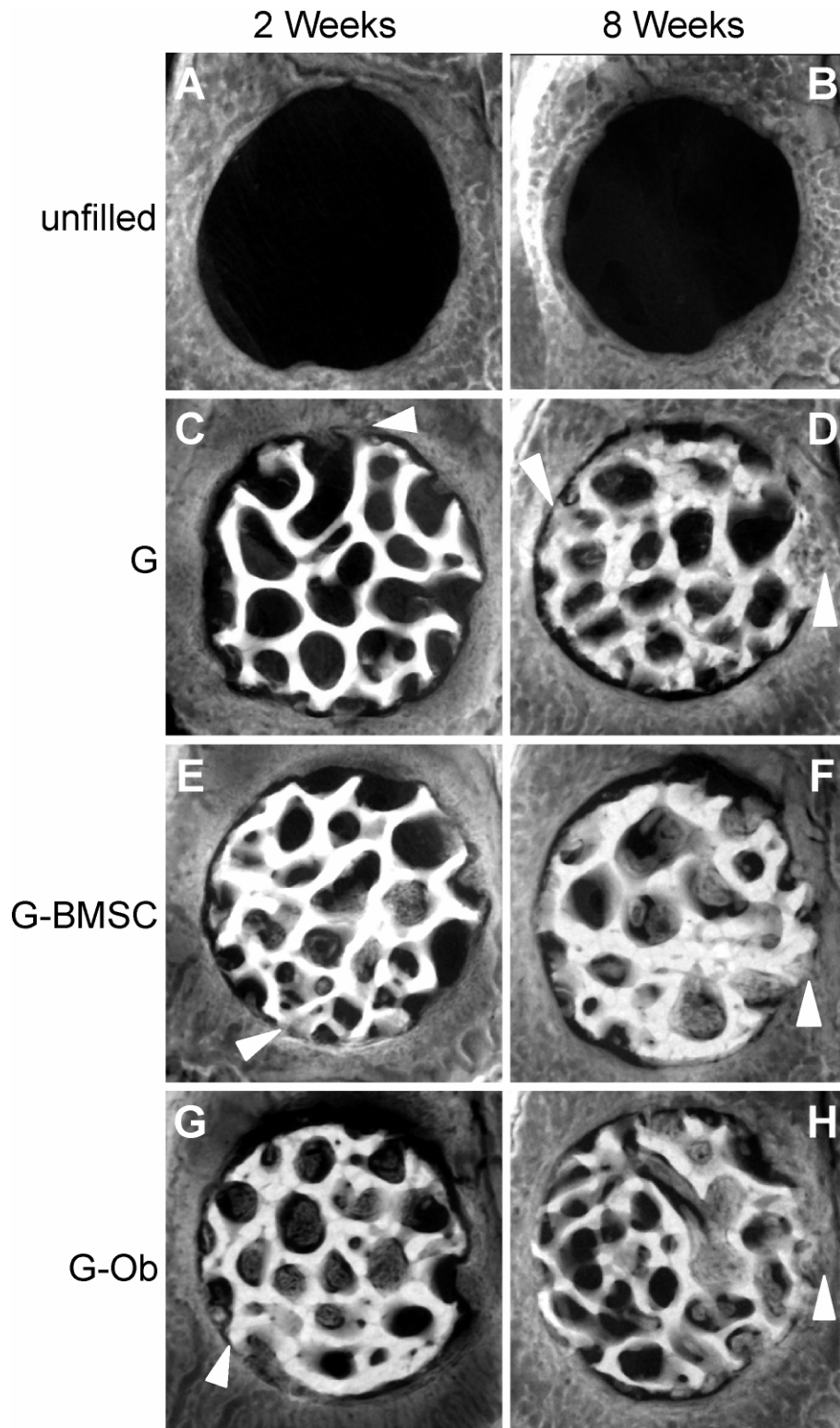


Figure 4

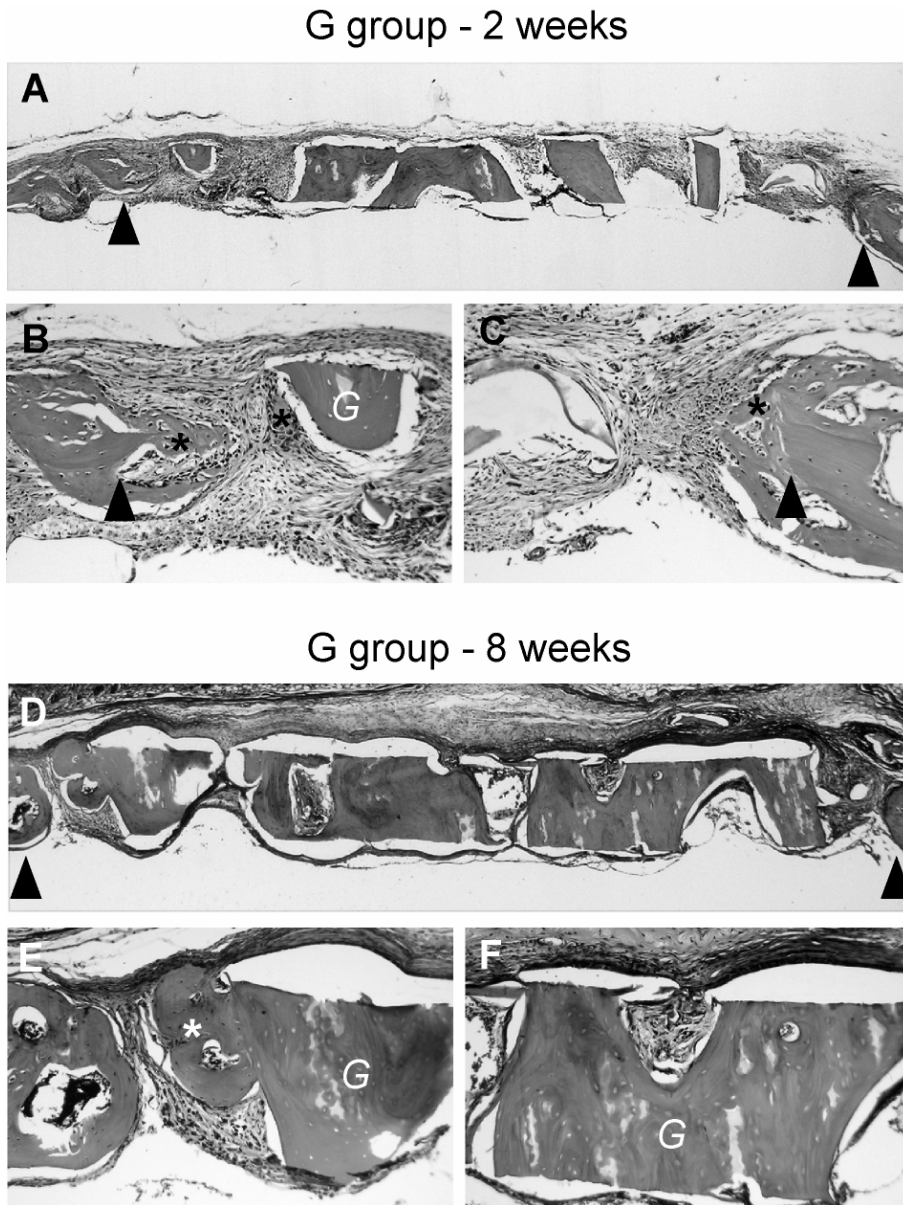
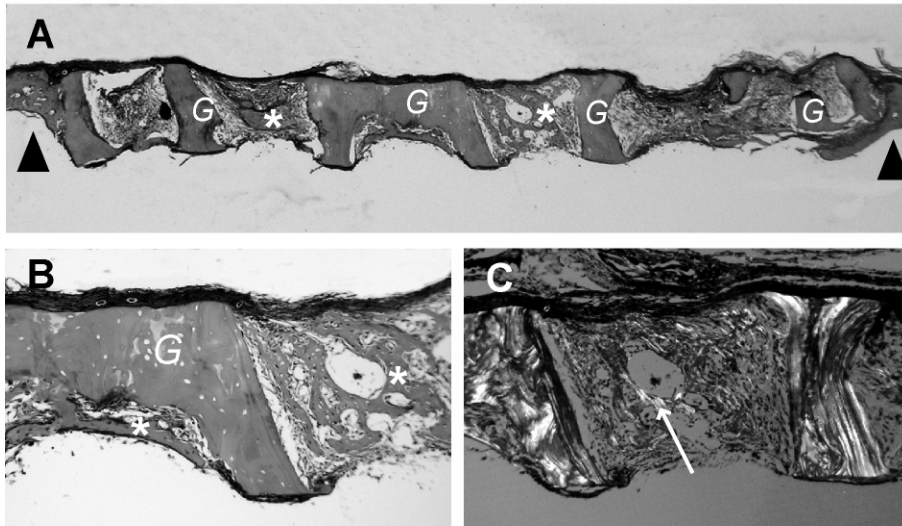


Figure 5

G-BMSC group - 2 weeks



G-BMSC group - 8 weeks

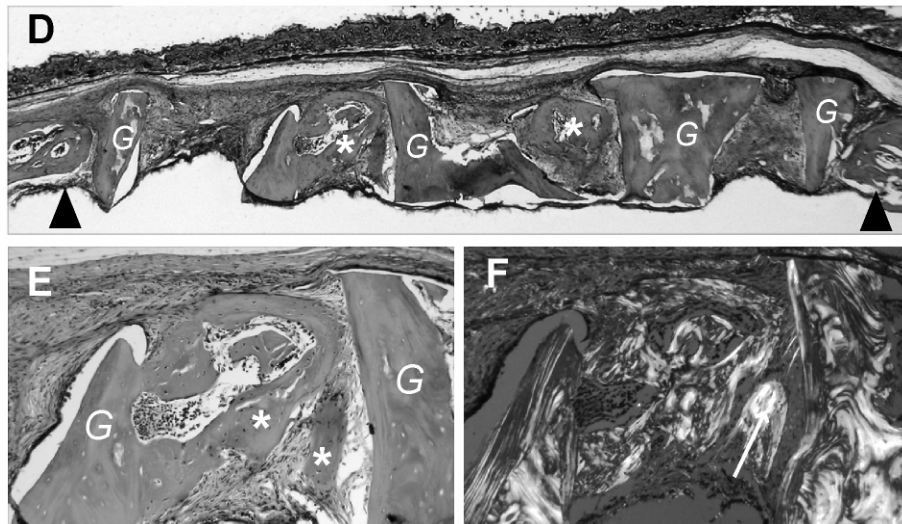
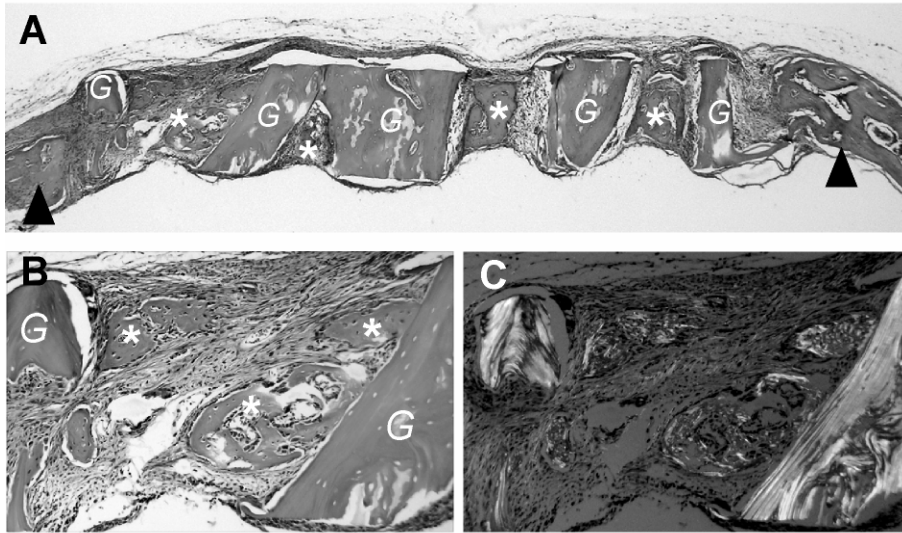


Figure 6

G-Ob group - 2 weeks



G-Ob group - 8 weeks

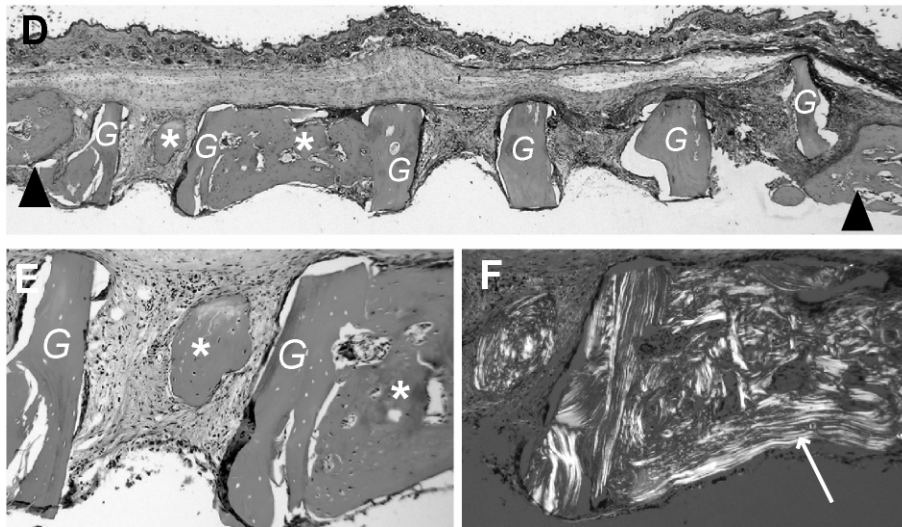
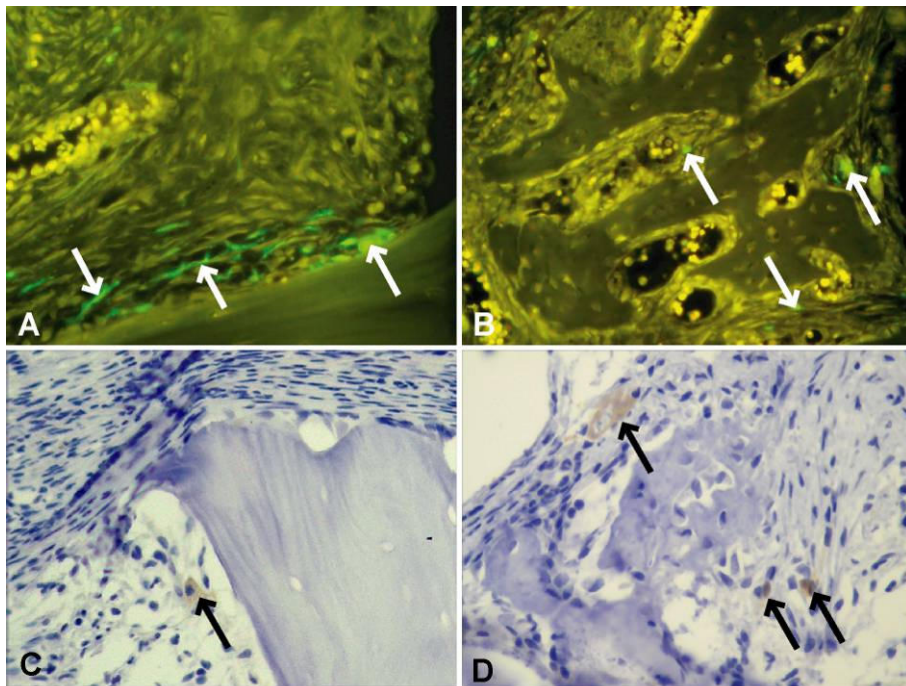


Figure 7



ARTICLE 3

Isolation of osteoprogenitors from murine bone marrow by a single negative selection

Dumas A., Moreau M.F., Guillet C., Baslé M.F., Chappard D.

Soumis à BBRC

L'ingénierie du tissu osseux fait l'objet de nombreuses études précliniques afin d'évaluer l'efficacité de différentes combinaisons cellules/biomatériau/facteurs. Les principales cellules ostéogéniques utilisées sont les CSM de la moëlle osseuse sélectionnées par leur propriété d'adhésion aux boîtes de culture cellulaire. Alors que la fraction adhérente de la moëlle osseuse humaine est enrichie de manière satisfaisante en CSM, la fraction adhérente de la moëlle osseuse de souris est largement contaminée en cellules hématopoïétiques (Van Vlasselaer *et coll.* 1994; Tropel *et coll.* 2004). Cette hétérogénéité est visible par les différentes morphologies des cellules en culture.

Nous avons souhaité enrichir la population cellulaire murine en cellules ostéogéniques dans l'optique d'améliorer les possibilités de d'apposition osseuse sur les biomatériaux lors de leur culture avec les cellules, avant leur implantation. Pour cela nous avons choisi, d'éliminer les cellules hématopoïétiques de la fraction adhérente par leur expression du CD11b, marqueur de surface non exprimé par les cellules stromales. Ce marqueur est une sous unité (chaîne αM) des intégrines, protéines membranaires permettant l'adhésion cellules/cellules et cellules/matrice. L'immunodéplétion des cellules CD11b⁻ a déjà été décrite dans la littérature pour l'enrichissement de la fraction adhérente de la moëlle osseuse de souris en CSM, que ce marqueur soit utilisé seul ou associé à d'autres antigènes (Phinney *et coll.* 1999; Tropel *et coll.* 2004).

L'immunodéplétion a été réalisée grâce à un trieur de cellules (FACS Aria, BD Biosciences) au service commun de cytométrie en flux de l'Université d'Angers. Le principe de cette technique est illustré **figure 21**. La ou les molécules à détecter doivent être fluorescentes. Pour cela, elles sont la plupart du temps détectées grâce à un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome. Les cellules marquées sont aspirées dans un jet sous forme de goutte à goutte et passées ainsi une à une devant un laser d'excitation de longueur d'onde adaptée au fluorochrome utilisé et analysées selon leur taille, leur granulosité (complexité du cytoplasme) et la fluorescence émise. Ainsi plusieurs populations cellulaires peuvent être définies selon les différents paramètres choisis (fluorescence positive ou négative par exemple). Les cellules sélectionnées, devant être triées sont, après analyse, chargées positivement et/ou négativement afin d'être déviées lors de leur passage devant des plaques déflectrices et récupérées dans des tubes séparés. Les cellules triées, peuvent être remises en culture. Nous avons utilisé un anticorps polyclonal dirigé contre le CD11b et couplé à la phycoérythrine (PE). La population de cellules stromales récupérée après le tri est la population CD11b⁻.

FACSaria

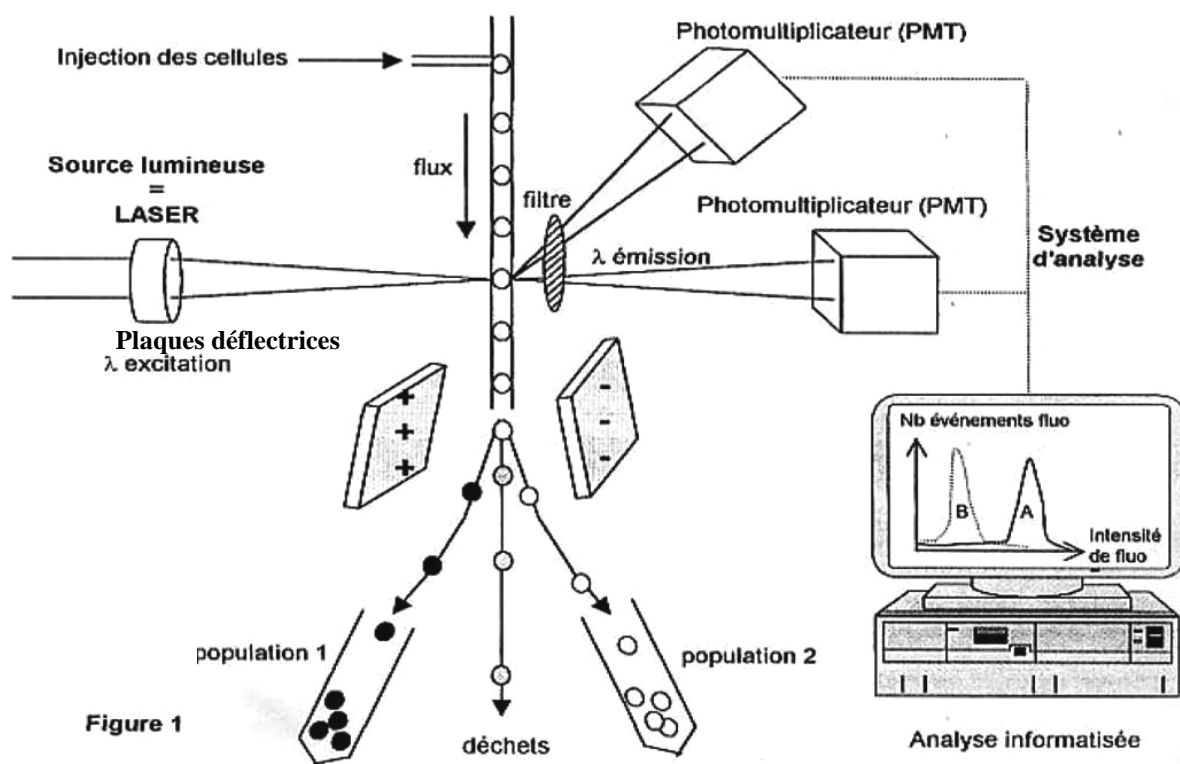


Figure 1

Figure 21 : Photo et principe du FACS.

Le marquage réalisé montre que la fraction adhérente de la moëlle osseuse de souris est contaminée à 91,8 % par des cellules hématopoïétiques exprimant le CD11b après 14 jours de culture primaire (**Figure 22**). Après le tri, la population cellulaire remise en culture est constituée à 96 % de cellules CD11b⁻.

Nous avons ainsi montré que l'immunodéplétion des cellules CD11b⁺ permettait non seulement d'éliminer les cellules hématopoïétiques contaminantes mais également de sélectionner, dans la population CD11b⁻, des progéniteurs ostéoblastiques exprimant AlkP. Il existe ainsi une corrélation linéaire entre le nombre de cellules CD11b⁻ détectées et triées par FACS parmi la fraction médullaire adhérente totale et le nombre de cellules AlkP⁺ comptées après coloration cytoenzymologique. Lorsque le pourcentage de cellules CD11b⁻ moyen est de 8,35 %, le nombre de cellules AlkP⁺ est de 6,3 %. La proportion de cellules AlkP⁺ augmente à 56 % en moyenne dans la fraction adhérente CD11b⁻. Ces résultats sont illustrés **figure 23**. Certaines expériences réalisées avec les cellules de moëlle osseuse du modèle de souris transgéniques pour la GFP, ont permis d'obtenir des images où la GFP sert de contre-coloration pour toutes les cellules, permettant de facilement distinguer les cellules AlkP⁻ (vertes) des cellules AlkP⁺ (rouges). Les cellules AlkP⁺ sont de grandes cellules très étalées, retrouvées après le tri. La population cellulaire CD11b⁻ est homogène en taille et morphologie

La fraction cellulaire CD11b⁻ récupérée après le tri par FACS contenant plus d'ostéoprogéniteurs doit synthétiser une matrice extracellulaire minéralisée plus vite que la population totale. Cette hypothèse a été confirmée par la culture des deux fractions cellulaires à la même densité pendant 21 jours dans un milieu de culture supplémenté en acide ascorbique et β -glycérophosphate.

Nous avons ainsi proposé une méthode de fractionnement cellulaire permettant d'isoler de la moëlle osseuse de souris une population enrichie en ostéoprogéniteurs matures exprimant AlkP qui, peuvent se différencier en ostéoblastes en l'absence de stimulation exogène par des glucocorticoïdes (Aubin 1999). La population cellulaire obtenue et décrite dans cet article, par son potentiel ostéogénique, apparaît intéressante pour la thérapie cellulaire du tissu osseux.

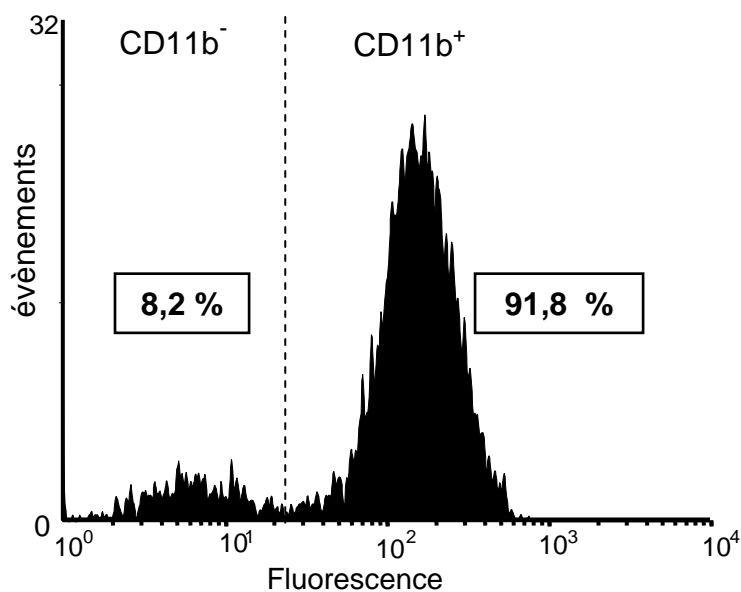


Figure 22 : Histogramme représentant l'ensemble des cellules adhérentes de la moelle osseuse de souris analysées par FACS selon le marquage du CD11b.

Ce marquage révèle 2 populations distinctes. La population négative, triée, représentant 8,2 % des cellules analysées.

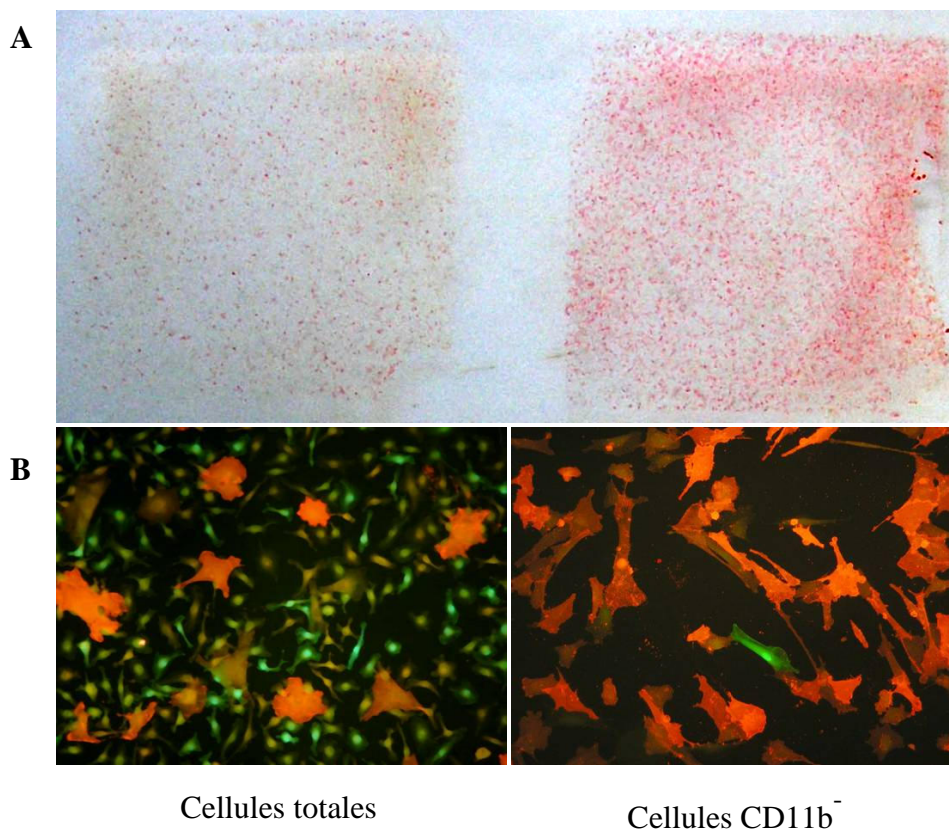


Figure 23 : Coloration cytoenzymologique de l'AlkP des cellules adhérentes de moelle osseuse de souris transgéniques pour la GFP, non triées (totales) ou après sélection des cellules CD11b⁻, observées en lumière transmise (A) ou en fluorescence (B).

Les cellules AlkP⁺ apparaissent en rouge et les cellules AlkP⁻ ne sont pas colorées ou fluorescent en vert.

Isolation of osteoprogenitors from murine bone marrow by selection of CD11b negative cells.

A. Dumas¹, M.F. Moreau¹, C. Guillet², M.F. Baslé¹, D. Chappard^{1*}

¹ INSERM, U922 "Remodelage osseux et biomatériaux", LHEA - Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex - FRANCE.

² SCCAN, Service Commun de cytométrie et d'analyse nucléotidique, IFR 132, CHU d'Angers, 49933 ANGERS Cedex 9 – France.

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.
INSERM, U922
LHEA - Faculté de Médecine,
49045 ANGERS Cedex - FRANCE

Tel: (33) 241 73 58 64

Fax: (33) 241 73 58 86

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

Key words: Osteoprogenitor, immunodepletion, CD11b, alkaline phosphatase, osteoblast precursor.

ABSTRACT

Selection of cells having the most osteogenic potential is a strategy used in bone tissue engineering. Preclinical studies using murine bone marrow cells must consider the large amount of hematopoietic cells in the adherent fraction. The aim of this study was to enrich a murine bone marrow cell population with osteoprogenitors using a simple and reliable method.

Bone marrow from C57Bl/6 mice was extracted and cells which adhered onto plastic were expanded in primary culture for 14 days. Immunolabeling of the CD11b surface antigen was performed and the CD11b⁻ cell fraction was isolated by FACS.

Selection of CD11b⁻ cells increased the number of alkaline phosphatase (AlkP) positive cells from the plastic adherent fraction from 6.3 % \pm 0.8 to 56 % \pm 3.3 with a 7 fold increase in AlkP activity. An osteogenic population was obtained with improved capacities to produce a mineralized extracellular matrix *in vitro*, independently of the presence of glucocorticoids in the culture medium.

INTRODUCTION

Bone marrow contains a large variety of stem cells comprising multipotent and restricted progenitors. The bone marrow stroma contains cells which have the capacity to form bone when transplanted *in vivo* in diffusion chambers. They are usually described as “plastic-adherent cells” or “colony forming unit-fibroblasts” (CFU-F) [1], or are also referred to as mesenchymal stem cells (MSC) [2; 3]. Several preclinical and clinical studies have suggested that transplantation of progenitors in aspirated bone marrow has value in bone-healing applications [4; 5]. However, methods using whole bone marrow are limited by the low number of osteogenic donor cells that can be harvested from the patient. For large bone defects or non-union fractures, it may be insufficient to obtain a complete repair and recovery of the skeletal function [6]. Methods may be required to increase the population of osteogenic cells through *ex vivo* expansion techniques [7; 8]. Culture-expanded marrow-derived MSC have been shown to repair segmental bone defects in animal models [9; 10]. It is now evident that such plastic adherent cells are not exclusively stem cells and osteoprogenitors [11; 12]. A prolonged culture time of MSC seems sufficient to increase the number of osteoprogenitors in human and rat [13]. On the contrary, isolation of murine osteoprogenitors from bone marrow necessitates the removal of contaminant adherent hematopoietic cells [14]. Various protocols have been developed to circumvent this problem, including immuno-selection or -depletion of cells based on specific cell surface markers [12; 15; 16; 17].

The aim of this study was to enrich the murine plastic adherent cell population in stromal cells by removing adherent hematopoietic cells that expressed the CD11b antigen. In the mouse, CD11b (Mac-1 α ; integrin α_M chain) is expressed on

monocytes/macrophages and to a lower extent on granulocytes, natural killer cells and a subset of dendritic cells. We found that the selection of plastic adherent CD11b⁻ cells correlated with the selection of MSC expressing alkaline phosphatase (AlkP⁺ cells), an osteoblastic marker [18].

MATERIAL AND METHODS

Mouse bone marrow stromal cells isolation and culture

Six to 8 week-old C57BL/6NHsd (Harlan, Gannat, France) were used to harvest bone marrow. The Animal Care and Use committee at the University of Angers approved all procedures. Bone marrow from the femoral, tibial, and humeral medullary cavities was flushed with Dubbleco's-modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Eurobio, Les Ulis, France) and filtered through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France). The entire marrow content was plated into two 75 cm² culture flasks (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing DMEM, supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Seromed Biochrom, Berlin, Germany). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Confluent layers of adherent cells were formed in 14-16 days and were harvested for immunodepletion and subculture using trypsin-EDTA (for 15 min at 37°C) and scraping.

Immunolabeling, cell sorting and subculture

For a single cell sorting assay, cultured bone marrow cells from two mice were pooled to be immunolabeled. Trypsinized cells washed with phosphate buffer saline (PBS), were incubated for 30 minutes with phycoerythrin (PE)-conjugated IgG2b rat anti-mouse CD11b (Milteney Biotec, Paris, France) on ice. Isotype controls were run in parallel using the same concentration. After washing twice with PBS containing 1% FCS, cells were filtered through a 70 μm cell strainer (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France) and analyzed on a fluorescent activating cell sorter (FACS Aria, BD Biosciences) for measurements of cell size (forward scatter) and complexity or granularity (side scatter). The CD11b negative population (CD11b⁻ cells), selected by their non-fluorescence, were sorted with sterile PBS in the sheath fluid and recovered in a separated tube containing 500 μl of FCS. Cells were maintained under rotation and at 4°C during the sort. 50,000 CD11b⁻ or unsorted cells were seeded on glass slides in 24 wells plates (day 0) and subcultured for 21 days in the culture medium used for the primary culture supplemented with ascorbic acid-2 phosphate 100 μM and β -glycerophosphate 10 mM (both from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Alkaline phosphatase (AlkP) cytochemical staining

Twenty hours after seeding (day 1), cells were incubated 20 minutes with Naphtol AS-MX 0.5 % (w/v) and Fast Red TR 1 % (Sigma) in Tris-HCl, 0.2 M, pH 8.9. A red precipitate, which is fluorescent under green light (540 nm), appeared at the site of AlkP activity. After washing with PBS, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and counterstained with Harris' hematoxylin. Observations were done under transmitted and fluorescent light using a LEITZ DMR-B microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) with a N2.1 filter cube (515-560 nm excitation filter and 590 nm suppression filter). Microphotographs were taken and analyzed using the cell counter

pluggin of the Image J software (NIH, USA) to evaluate the percentage of AlkP positive cells (fluorescent). Analyses were done on 6 different experiments.

AlkP activity Assay

Cells were lysed by sonication in Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.5, 0.1% Triton X 100. AlkP activity was quantified by reaction with 2.5 mM paranitrophenyl phosphate in 0.1 M 2-amino-1-methyl-1-propanol buffer, pH 9.8, supplemented with 2 mM MgCl₂. The reaction was stopped with NaOH 0.5 N and paranitrophenol (pNP) formed was measured at 410 nm on a spectrophotometer (Shimadsu, Kyoto, Japan). Results were normalized for protein content, determined using a protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA). Samples from 10 experiments were analyzed.

Extracellular mineralization assay

At day 21 of subculture in medium supplemented with ascorbic acid and β -glycerophosphate, unsorted and CD11b- cell layers were incubated 2 hours in 1 ml of a solution of calcein in DMEM (25 μ g/ml, Sigma) to reveal extracellular mineralization. After 2 washes with PBS, slides were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and observed under fluorescent microscopy with a I3 filter cube (550-490 nm excitation filter and 515 nm suppression filter).

Statistical analysis

Statistical study was performed using SYSTAT statistical software (release 11.0). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences between groups were assessed by pairwise comparisons of variance (non parametric Mann and Whitney *U* test). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

FACS analysis of plastic adherent cells (Fig. 1)

After 14 days of primary culture, the CD11b⁻ population represented 8.35 % ± 0.72 of the plastic adherent cells. They were clearly distinguishable from positive cells by the fluorescence parameter, allowing CD11b⁻ cell sorting (fig. 1B). Sorted population was more than 96 % negative for the CD11b (Fig. 1C). Positive and negative populations differed neither in size nor in granularity, according to the FACS analysis.

Bone marrow CD11b⁻ cell population

One day after cell sorting and seeding, AlkP activity revealed by cytochemistry (Fig. 2A) showed a marked heterogeneity of the unsorted cell population. AlkP⁺ cells (red stained and fluorescent) were exclusively represented by large flat cells. They were counted and expressed as a percentage of all cells (Fig. 2B). In unsorted cells, 6.3 % ± 0.8 were AlkP⁺. The immunodepletion of CD11b⁺ cells considerably enriched the population in AlkP⁺ cells (56 % ± 3.3 were AlkP⁺) and all appeared with a widespread shape. The biochemical AlkP activity was 19.7 ± 3.9 nmol of pNP formed/mg of protein/min for the unsorted cells and was 7 fold increased after immunodepletion (140.2 ± 25.3 for the CD11b⁻ cells) (Fig. 2C).

When the experiment were repeated, the percentage of CD11b⁻ cells (determined by FACS) and AlkP⁺ cells (counted after a 1 day culture) appeared highly correlated ($r = 0.908$) (Fig. 3).

Functional characterization

Both unsorted and CD11b⁻ cell populations were seeded at relatively high density and subcultured during 21 days in presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate to produce extra cellular mineralization. The unsorted cells remained in layer; nodules were small and scarcely disposed and only a few of them appeared mineralized (Fig. 4A). On the contrary, CD11b⁻ cells tended to aggregate and formed large nodules covering most of the culture surface with prominent mineralized areas (Figs. 4B and 4C).

DISCUSSION

Cells derived from the marrow stroma represent a spectrum of differentiation levels in the osteogenic lineage ranging from MSC, early and late osteoprogenitors to mature osteoblasts, responsible for synthesis, deposition and mineralization of the extracellular matrix of bone [1; 19; 20]. Mouse strains, either wild type or genetically altered, provide effective experimental models to study both the cell biology and to evaluate the therapeutic potential of bone marrow-derived cells. Engineering strategies for bone repair exist but technical difficulties of isolating and expanding mouse stromal cells have limited the number of experimentations. Since results are dependent of the osteogenic properties of used cells, isolation of progenitors from murine bone marrow must be investigated [10; 21].

This study describes an easy and reliable method to enrich murine MSC in osteoprogenitors. CD11b immunodepletion allowed selection of AlkP⁺ cells. CD11b is a cell adhesion molecule (CAM), which mediate signals regulating intracellular processes [22; 23]. It is in majority expressed on granulo-monocytic cells but is also described at a relatively low level on murine cells from the marrow stromal cell line MBA-15 [24].

Previous studies have shown that most round cells in murine plastic adherent cultures express CD11b [14]. These cells were identified as lymphohematopoietic cells according to their co-expression of CD45. CD11b has been used for depletion of granulo-monocytic cells from C57Bl/6 mouse adherent bone marrow cells [16]. The resultant fibroblastic cell population CD11b⁻ was subsequently grown on fibronectin-coated dishes in presence of growth factors and exhibited a MSC phenotype according to their differentiation along osteoblastic, adipocytic and chondrocytic pathways. The cell isolation strategy developed in the present study was less sophisticated. No additional growth factors known to increase the immunogenic properties of cells [25] were used and the experimental cost was reduced. CAMs seem to be powerful surface antigen to select fibroblastic cells. The CD49a protein (α 1-integrin subunit) has been used alone for a direct enrichment of bone marrow cells in CFU-f in rat, mouse and human [26; 27]. The murine bone marrow contained more CD49a⁺ cells than in rat or human, but also more contaminant hematopoietic cells (CD45⁺). Selection of CD49a⁺ cells from murine bone marrow appeared not sufficiently efficient for isolation of MSC. In the present study, selection of CD11b⁻ cells showed significant enrichment in AlkP⁺ cells. AlkP was not expressed by MSC. Its expression is associated with osteoblastic differentiation and formation of the bone extracellular matrix [19; 28]. AlkP⁺ cells formed mineralized nodules in culture without addition of dexamethasone. Early and late osteoprogenitors differently respond to exogenous glucocorticoids stimulation. Early AlkP⁻ progenitors are dependent of dexamethasone whereas mature AlkP⁺ osteoprogenitors formed mineralized nodules *in vitro* in absence of dexamethasone [29; 30; 31]. Our results in C57Bl/6 mice confirmed the bone forming capacities *in vitro* of CD11b⁻ AlkP⁺ bone marrow adherent cells without dexamethasone. Because they

clearly proliferate in culture, CD11b⁻ AlkP⁺ cells were not osteoblasts but mature osteoprogenitors.

Limitation of the use of such isolated osteoprogenitors for bone forming experiments is their low frequency in the plastic adherent fraction, after 14 days of primary culture. In the present work, the fraction of CD11b⁺ cells constituted 91.8 % of the adherent cell population; thus nonhematopoietic cells represented only 8.2 %. The contamination rate vary extensively between bone marrow cultures of different mouse strains, influencing their proliferation rate and differentiation potentials [32]. Phinney *et al.*, had compared heterogeneity of plastic adherent culture from 5 mouse strains [14]. Culture from bone marrow of C57BL/6 mice was the most contaminated by CD11b⁺ and CD45⁺ cells. The yield of the CD11b⁻ immunodepletion could be enhanced with another mouse strain like FVB/N, whose nonhematopoietic cells constitute up to 20 % of the adherent cell population.

In conclusion, mature osteoprogenitors can be isolated from murine plastic adherent bone marrow cells by negative selection using the surface antigen CD11b. The negative fraction was greatly enriched in osteogenic cells that were able to form mineralized nodules without dexamethasone stimulation. This immunodepletion method provided an osteogenic cell population, suitable for bone engineering experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat – Région “Pays de la Loire”, INSERM and Bioregos.

REFERENCES

- [1] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20 (1987) 263-72.
- [2] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P.G. Robey, Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19 (2001) 180-92.
- [3] D.J. Prockop, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 (1997) 71-4.
- [4] P. Hernigou, A. Poignard, F. Beaujean, and H. Rouard, Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87 (2005) 1430-7.
- [5] J.R. Werntz, J.M. Lane, A.H. Burstein, R. Justin, R. Klein, and E. Tomin, Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res* 14 (1996) 85-93.
- [6] G.F. Muschler, C. Nakamoto, and L.G. Griffith, Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (2004) 1541-58.
- [7] J.E. Dennis, K. Esterly, A. Awadallah, C.R. Parrish, G.M. Poynter, and K.L. Goltry, Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells* 25 (2007) 2575-82.
- [8] P. Bianco, and P. Gheron Robey, Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105 (2000) 1663-8.
- [9] S. Kadiyala, R.G. Young, M.A. Thiede, and S.P. Bruder, Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 6 (1997) 125-34.
- [10] J. Ringe, C. Kaps, G.R. Burmester, and M. Sittinger, Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 89 (2002) 338-51.
- [11] H. Ohgushi, and A.I. Caplan, Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 48 (1999) 913-27.

- [12] M. Baddoo, K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G.C. Kopen, and D.G. Phinney, Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89 (2003) 1235-49.
- [13] M. Kassem, Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 6 (2004) 369-74.
- [14] D.G. Phinney, G. Kopen, R.L. Isaacson, and D.J. Prockop, Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72 (1999) 570-85.
- [15] P. Van Vlasselaer, N. Falla, H. Snoeck, and E. Mathieu, Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 84 (1994) 753-63.
- [16] P. Tropel, D. Noel, N. Platet, P. Legrand, A.L. Benabid, and F. Berger, Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295 (2004) 395-406.
- [17] M. Shiota, T. Heike, M. Haruyama, S. Baba, A. Tsuchiya, H. Fujino, H. Kobayashi, T. Kato, K. Umeda, M. Yoshimoto, and T. Nakahata, Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp Cell Res* 313 (2007) 1008-23.
- [18] T. Komori, Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99 (2006) 1233-9.
- [19] J.E. Aubin, Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31 (1998) 73-82.
- [20] M. Owen, and A.J. Friedenstein, Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136 (1988) 42-60.
- [21] T. Yoshikawa, H. Ohgushi, H. Nakajima, E. Yamada, K. Ichijima, S. Tamai, and T. Ohta, In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69 (2000) 128-34.
- [22] I. Shur, M. Zilberman, D. Benayahu, and S. Einav, Adhesion molecule expression by osteogenic cells cultured on various biodegradable scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 75 (2005) 870-6.
- [23] E. Hebert, Endogenous lectins as cell surface transducers. *Biosci Rep* 20 (2000) 213-37.

- [24] R. Marom, I. Shur, R. Solomon, and D. Benayahu, Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 202 (2005) 41-8.
- [25] M.C. Kruyt, W.J. Dhert, C. Oner, C.A. van Blitterswijk, A.J. Verbout, and J.D. de Bruijn, Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J Biomed Mater Res* 69B (2004) 113-20.
- [26] F. Gindraux, Z. Selmani, L. Obert, S. Davani, P. Tiberghien, P. Herve, and F. Deschaseaux, Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule. *Cell Tissue Res* 327 (2007) 471-83.
- [27] D.A. Rider, T. Nalathamby, V. Nurcombe, and S.M. Cool, Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *J Mol Histol* 38 (2007) 449-58.
- [28] T.A. Owen, M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, M.S. Tassinari, M.B. Kennedy, S. Pockwinse, J.B. Lian, and G.S. Stein, Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143 (1990) 420-30.
- [29] K. Turksen, and J.E. Aubin, Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 114 (1991) 373-84.
- [30] J.E. Aubin, Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 72 (1999) 396-410.
- [31] H. Atmani, D. Chappard, and M.F. Baslé, Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 89 (2003) 364-72.
- [32] A. Peister, J.A. Mellad, B.L. Larson, B.M. Hall, L.F. Gibson, and D.J. Prockop, Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103 (2004) 1662-8.

LEGENDS OF FIGURES:

Fig. 1: FACS analysis of plastic adherent murine marrow cells prior to (A, isotype control and B) and after immunodepletion (C). CD11b⁻ cells are in red. Only 8.2 % of plastic adherent bone marrow cells were CD11b⁻. This percentage reached 98 % after immunodepletion.

Fig. 2: (A) Microphotographs of unsorted (a and b) and CD11b⁻ cells (c and d), at day 1 of subculture after cytochemical staining of the AlkP. Same cultures were observed at x100 magnification under transmitted (a and c) and fluorescent light (b and d). Note the selection of large flattened and AlkP⁺ cells in the CD11b⁻ population.

(B) Number of AlkP⁺ cells among the unsorted or CD11b⁻ cell populations, at day 1 of subculture, counted after cytochemical staining.

(C) AlkP activity assay of unsorted and CD11b⁻ cell populations at day 1 of subculture.

Fig. 3: Correlation between percentage of CD11b⁻ cells analyzed by FACS and percentage of AlkP⁺ cells color after seeding. The immunodepletion of CD11b⁺ cells from the plastic adherent populations allowed enriching them in AlkP⁺ cells.

Fig. 4: Calcein labeling of calcium deposits in unsorted (A, at magnification x100) and CD11b⁻ cell populations (B, at magnification x25 and C, at magnification x100), after 21 days of subculture in medium containing ascorbic acid and β-glycerophosphate.

Figure 1

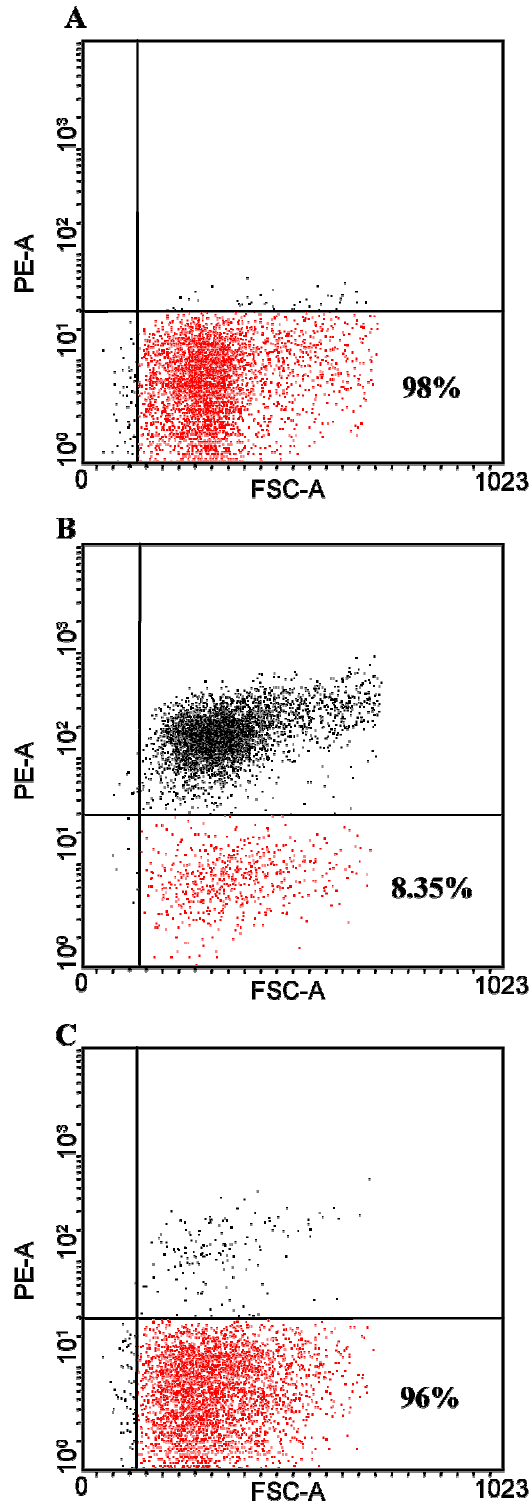


Figure 2

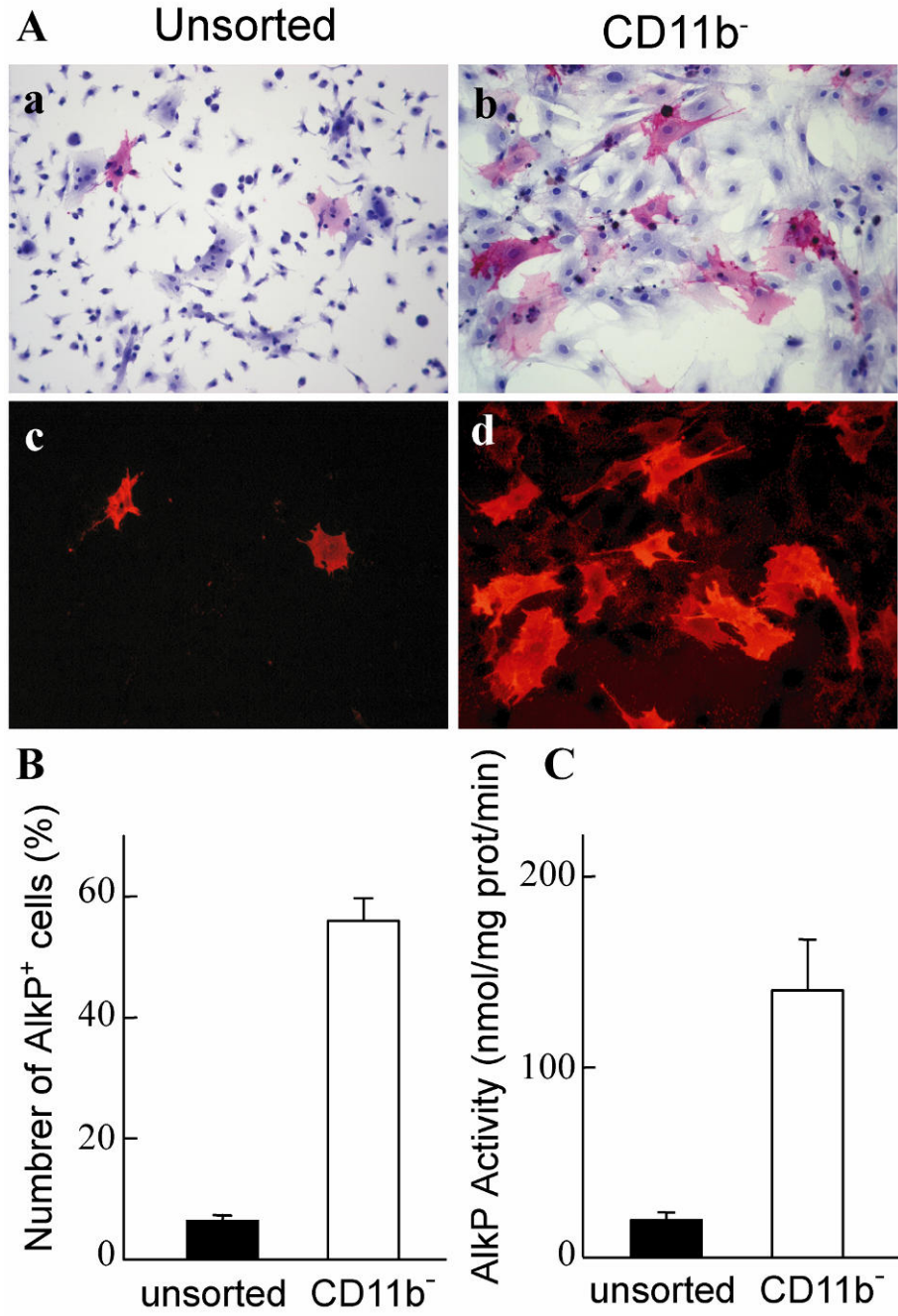


Figure 3

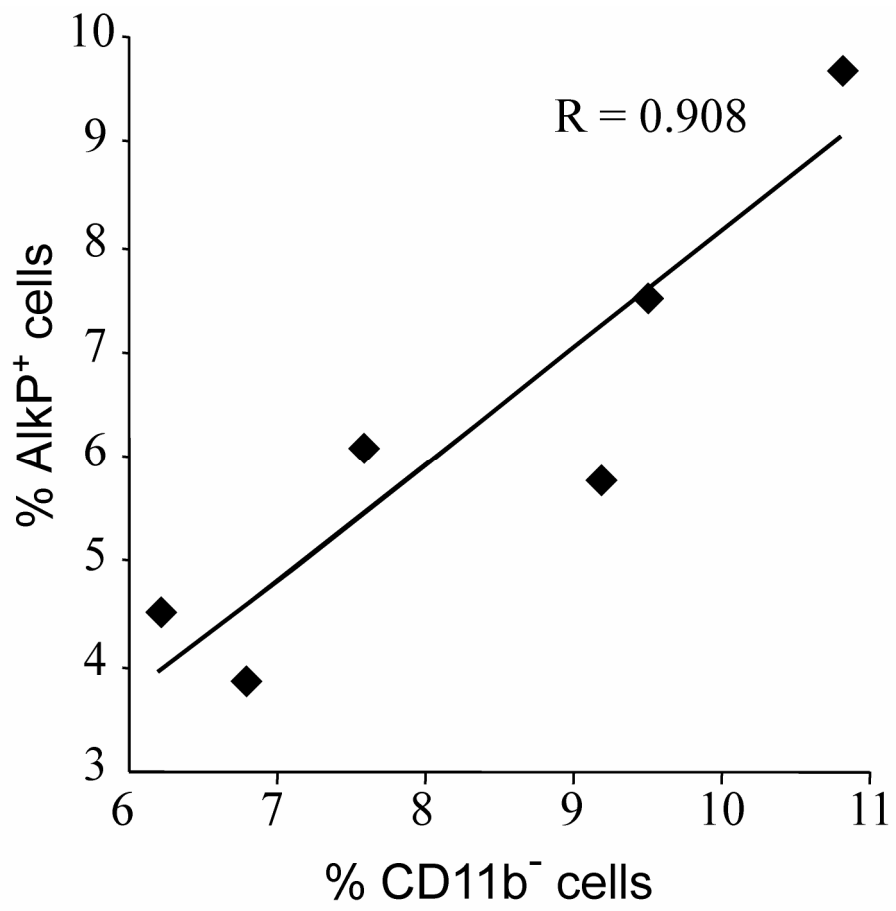
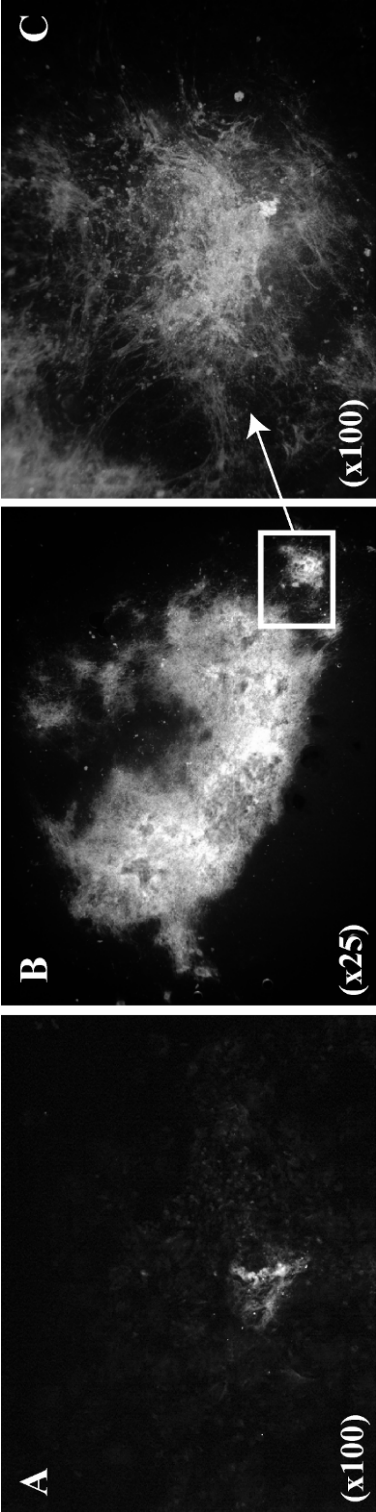


Figure 4



ARTICLE 4

Bone mass and microarchitecture of irradiated and bone marrow-transplanted mice: influences of the donor strain.

Dumas A., Brigitte M., Moreau M.F., Chrétien F., Ghérardi R.K., Baslé M.F., Chappard D.

Accepté par osteoporosis international avec des révisions majeures:
OI-2007-12-0608

Les applications thérapeutiques de la transplantation de cellules de moëlle osseuse n'ont cessées de se multiplier depuis les années 1970 (Armitage 1994). Mais elle reste une thérapeutique lourde pour le patient avec de nombreuses complications connues dont l'ostéoporose. La transplantation de moëlle osseuse induit une perte osseuse de 5 à 15% dans les 6 premiers mois après la transplantation (Cohen et Shane 2003). Cette perte osseuse est attribuée en grande partie aux traitements relatifs au conditionnement des patients et à la prévention des rejets dont les immunosuppresseurs et les glucocorticoïdes. L'irradiation corporelle totale est souvent associée à la chimiothérapie avant la transplantation pour permettre une immuno- et myélosuppression, la création de l'espace médullaire utile à l'installation du greffon et la réduction de la masse des cellules tumorales (Aristei et Tabilio 1999). Des effets délétères des radiations ionisantes sur l'ostéogénèse et la vascularisation ont été démontrés (Hopewell 2003) mais l'exacte contribution de l'irradiation corporelle totale dans la perte osseuse chez les receveurs est inconnue.

Dans cette étude nous avons étudié les variations de masse osseuse et de microarchitecture de souris irradiées à dose létale (9 Gy) et transplantées avec des cellules de moëlle osseuse. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du laboratoire INSERM, EMI 0011 de l'Université Paris XII, dirigée par le Professeur Romain Ghérardi. Cette équipe a effectué les expérimentations chez l'animal. Nous avons réalisé les analyses microtomographiques et histologiques.

Un des objectifs de l'étude était de comprendre l'implication des cellules transplantées dans le remodelage osseux du receveur. Pour cela les cellules de moëlle osseuse utilisées pour les transplantations ont été extraites des souris transgéniques (C57Bl/6TgN-(actEGFP)Osby01) nommées souris GFP, exprimant dans toutes leurs cellules la GFP. L'observation de la GFP sur des coupes histologiques permet de déterminer la localisation et le devenir des cellules transplantées. Les souris receveuses sont les C57Bl/6 (nommées souris B6) car se sont les souris utiliser pour l'élaboration des souris GFP (**Figure 24**). La masse osseuse et la microarchitecture des souris transplantées (souris T^{GFP}B6) ont été étudiés 1, 3 et 6 mois post-transplantation et comparées aux paramètres contrôles des souris B6 (receveuses) et GFP (donneuses) aux âges correspondant soit 10 semaines (M1), 18 semaines (M3) et 32 semaines (M6).

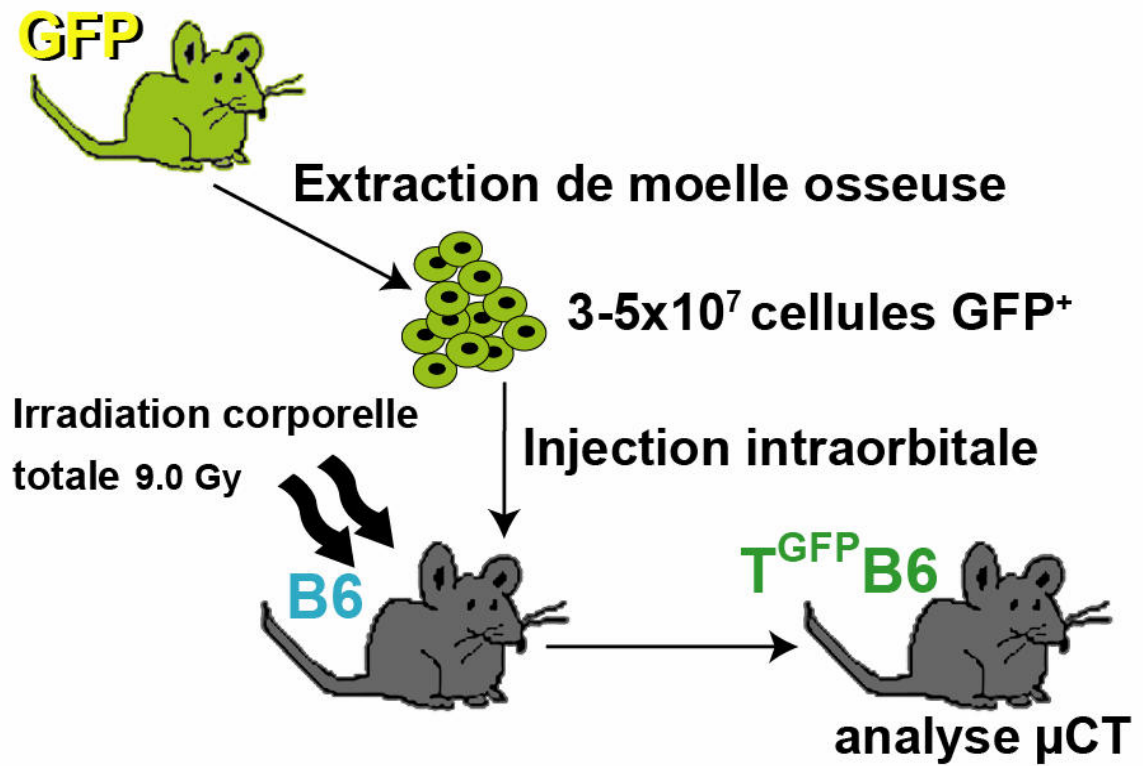


Figure 24 : Schéma du protocole expérimental de transplantation de moelle osseuse chez la souris.

Les analyses par microtomographie X ont été réalisées au niveau des condyles fémoraux. L'ensemble des résultats sont représentés **figure 25** pour les caractéristiques trabéculaires et **figure 26** pour les caractéristiques corticales.

Dans un premier temps nous avons observé des différences significatives de certains paramètres microarchitecturaux entre les lignées **B6 et GFP**, pourtant de même fond génétique. Les différences apparaissent à partir de M3 soit 18 semaines de vie. Les souris GFP ont une diaphyse fémorale de plus petit diamètre avec une corticale plus épaisse que celle de souris B6. Avec le vieillissement, les souris GFP présentent également moins de travées que les souris B6 ($p < 0.05$), et un réseau trabéculaire réorganisé majoritairement en piliers. La seule caractéristique distincte entre les deux lignées de souris est l'expression de la GFP. Les différents phénotypes osseux peuvent être dus (1) aux effets de l'intégration du transgène dans le génome ou (2) aux effets de la GFP elle-même. Le phénotype des souris hétérozygotes pour le transgène est décrit comme normal mais les conséquences de l'intégration et de l'expression du transgène ne sont pas anodines puisque le phénotype homozygote est non viable. De plus, une étude récente a démontré l'augmentation de l'expression de l'interleukine-6, cytokine intervenant dans le remodelage osseux, dans des myoblastes transfectés avec le gène de la GFP, et que cette augmentation est dose-dépendante (Mak *et coll.* 2007).

L'étude par microtomographie X des fémurs des souris **T^{GFP}B6** a révélé que l'irradiation corporelle totale et la transplantation de moëlle osseuse induise une perte osseuse de plus de 50% dès le premier mois suivant la transplantation et atteint 86% à M6. Le nombre de travées est très fortement diminué dès M1 mais leur épaisseur ne diminue qu'à M6. Cette perte osseuse est associée à un épaississement de la corticale fémorale significative à M6. Les cellules transplantées n'ont pas permis l'augmentation, la restauration de la masse osseuse. Pourtant, des cellules GFP⁺ du donneur se sont localisées au niveau des tissus osseux, comme montré par les études histologiques en microscopie à fluorescence (**Figure 27**). Elles sont présentes dans la moëlle osseuse (cellules hématopoïétiques, mégaryocytes), le long des travées (cellules bordantes et cellules de type ostéoclastique), dans les couches cellulaires endostées et périostées. La transplantation de cellules de moëlle osseuse totale a permis la reconstitution du compartiment hématopoïétique mais également stromal. Aucun ostéocyte GFP⁺ n'a été

observé dans les matrices osseuses trabéculaires et corticales, suggérant aucune activité ostéoblastique des cellules transplantées. Outre l'augmentation de l'épaisseur des corticales spécifique aux souris T^{GFP}B6, toutes les caractéristiques corticales ainsi que l'organisation en plaques et piliers (SMI) du réseau trabéculaire de ces souris changent par rapport au phénotype B6 pour tendre vers le phénotype des souris GFP. Les cellules du donneur, localisées au niveau du tissu osseux, reconstituent un nouveau microenvironnement et contribuent ainsi indirectement au remodelage post-transplantation. Des résultats semblables ont été obtenus par Ueda *et coll* après transplantation de moelle osseuse en site intra-osseux (Ueda *et coll.* 2007).

En conclusion, l'irradiation corporelle totale semble avoir une part importante dans l'ostéoporose induite après une transplantation de moelle osseuse. L'utilisation du modèle de souris transgéniques pour la GFP a permis de confirmer la greffe de cellules hématopoïétiques et stromales au niveau des os après transplantation systémique de moelle osseuse totale. Si les cellules transplantées dans notre étude n'ont pas présenté d'activité ostéoblastique, elles ont permis la reconstitution d'un microenvironnement ayant influencé le remodelage osseux des souris transplantées.

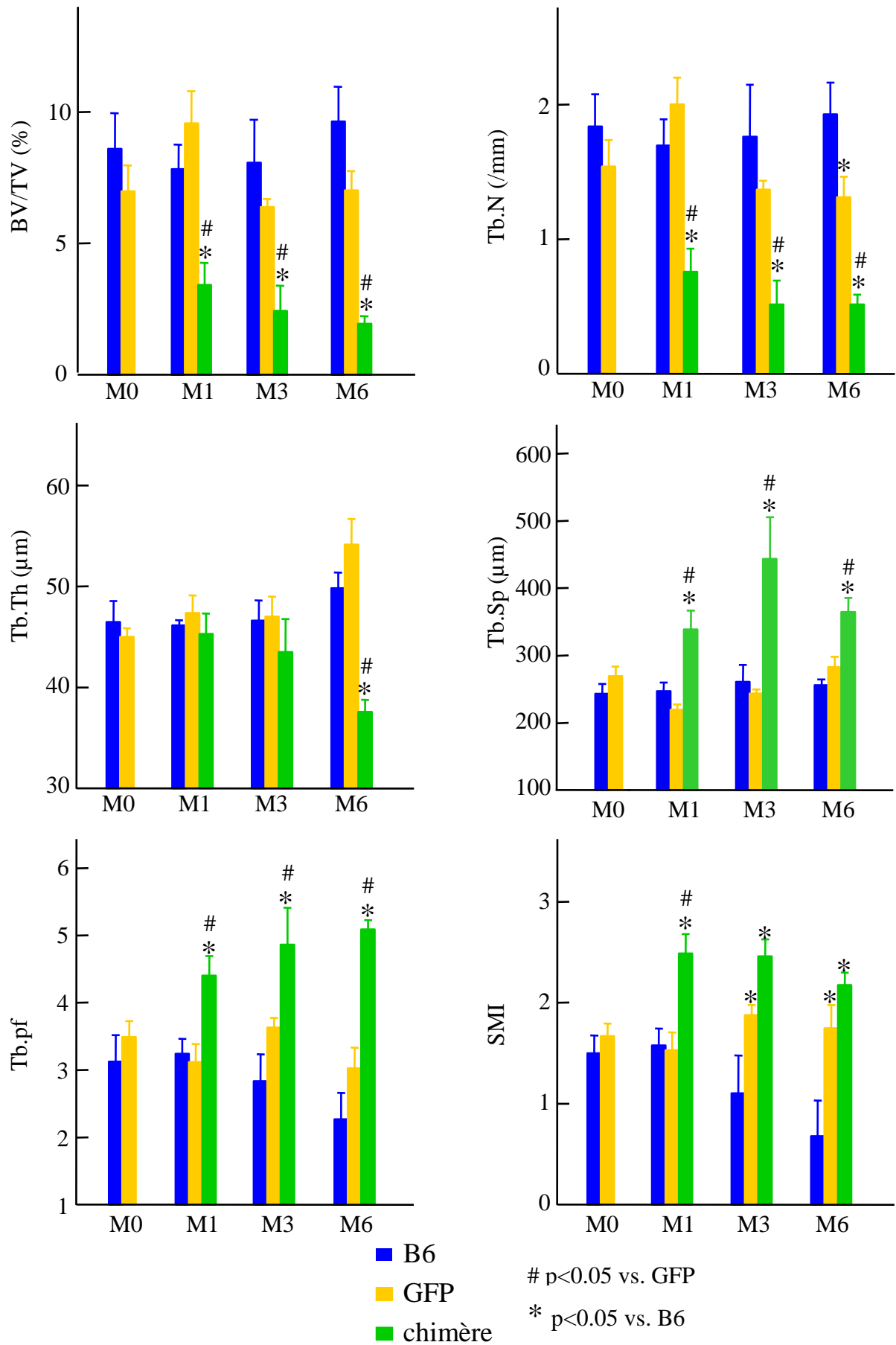


Figure 25 : Masses osseuses et paramètres tridimensionnels du réseau trabéculaire mesurés par microtomographie à rayons X.

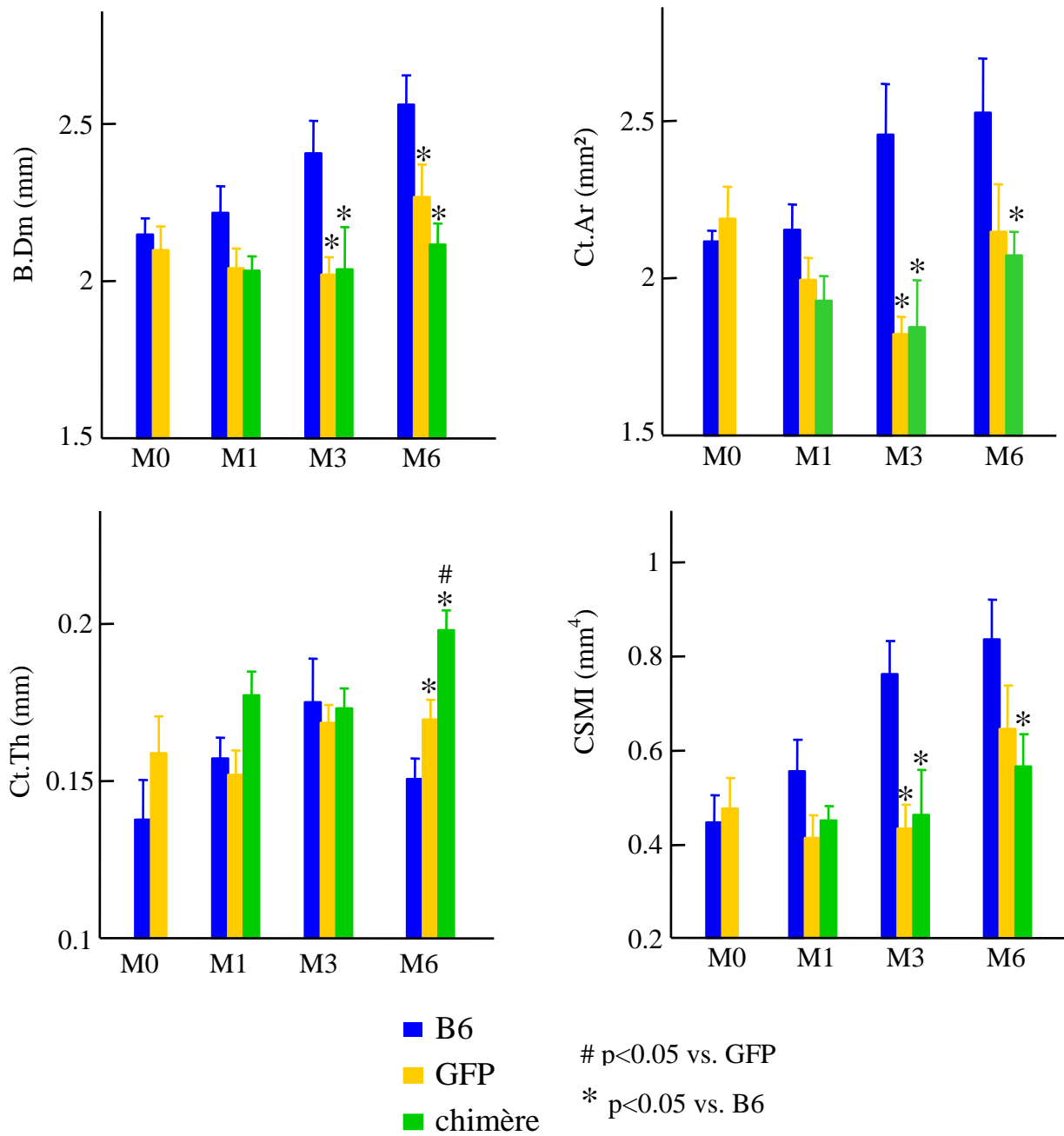


Figure 26 : Caractéristiques de l'os cortical des diaphyses fémorales mesurées par microtomographie à rayons X.

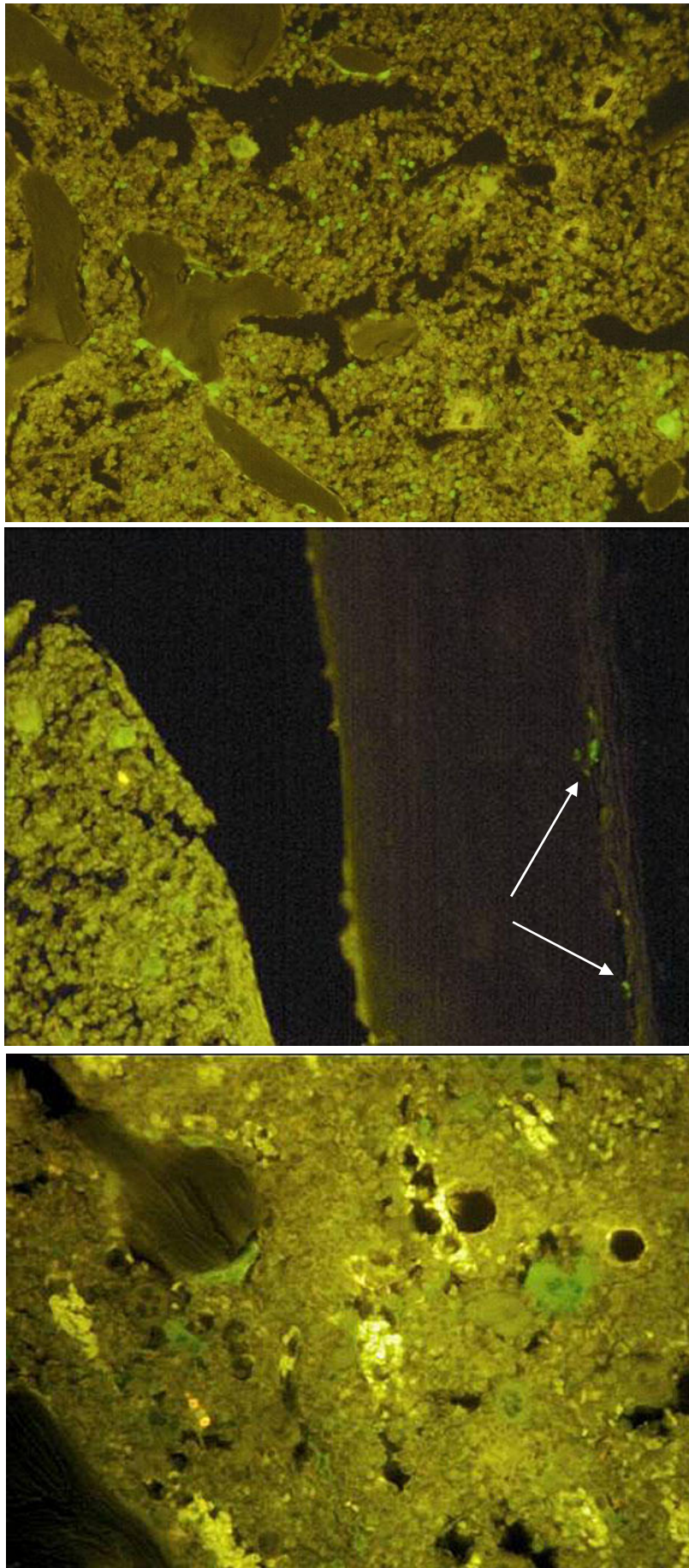


Figure 27 : Photographies de microscopie à fluorescence montrant la localisation des cellules GFP^+ au niveau des fémurs des souris $T^{GFP}B6$.

Bone mass and microarchitecture of irradiated and bone marrow-transplanted mice: influences of the donor strain.

A. Dumas¹, M. Brigitte², M.F. Moreau¹, F. Chrétien², M.F. Baslé¹, D. Chappard^{1*}

¹ INSERM, U922 “Remodelage osseux et biomatériaux”, LHEA - Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex -FRANCE.

² INSERM, EMI 0011 “Interactions cellulaires dans le système neuromusculaire”, Faculté de Médecine, 94000 CRETEIL -FRANCE.

Mini abstract: Total body irradiation and bone marrow transplantation induced dramatic trabecular bone loss and cortical thickening in mice. Transplanted cells were engrafted in bone marrow, along trabeculae and in periosteal and endosteal envelopes. No osteocyte was of donor origin. Bone microarchitecture of transplanted mice changed to tend toward the donor phenotype.

Key words: Bone marrow transplantation, microCT, GFP, osteoporosis, cell engraftment

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.

Tel: (33) 241 73 58 64

INSERM, U922

LHEA-Faculté de Médecine,

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

49045 ANGERS Cedex - FRANCE

NO disclosure

ABSTRACT

Introduction: Osteopenia and osteoporosis are complications of bone marrow transplants (BMT) attributed to related chemotherapies. However, the specific influence of total body irradiation (TBI) is unknown.

Methods: We investigated the effects of TBI and BMT, on bone mass and microarchitecture by microCT. Eighteen C57Bl/6 (B6) mice received lethal TBI had a BMT with marrow cells from GFP-transgenic-C57Bl/6 (GFP) mice. Transplanted ($T^{GFP}B6$), B6 and GFP mice were euthanized 1, 3 and 6-months after BMT or at related age.

Results: $T^{GFP}B6$ presented a dramatic bone loss compared to B6 and did not restore their trabecular bone mass with time, despite a cortical thickening 6-months after BMT. With aging, GFP mice have less trabeculae, thicker cortices but a narrower femoral shaft than B6. From 3-months after BMT, cortical characteristics of $T^{GFP}B6$ differed statistically from B6 and were identical to those of GFP. GFP^+ cells were located along trabecular surfaces and in periosteal and endosteal envelopes but no osteocyte expressed GFP.

Conclusion: Our findings suggest that engrafted cells did not restore the irradiation-induced trabecular bone loss, but reconstituted a marrow microenvironment and bone remodeling similar to those of the donor. The effects of irradiation and graft on bone remodeling differed between the bone envelopes.

INTRODUCTION

Bone marrow transplantation (BMT) has been used to treat various hematological diseases, such as aplastic anemia and leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease, multiple myeloma and is now tried in immunodeficiencies, solid tumors (neuroblastoma, breast cancer...), genetic and metabolic disorders and autoimmune diseases (Crohn's disease, lupus erythematosus, rheumatoid arthritis...) [1, 2]. BMT has also been suggested to cure skeletal-related diseases, known to be stem cell disorders, such as osteogenesis imperfecta [3], Hurler's syndrome and metachromatic leukodystrophy [4]. Total body irradiation (TBI) has been proposed for pre-transplant conditioning of recipients grafted with allogeneic BMT, in combination with chemotherapy [5]. The conditioning allows to create space in bone marrow for cells engraftment, to prevent rejection of grafted cells and eradication of immune memory and tumor cells [6]. Patients undergoing allogeneic BMT develop osteoporosis with a 5-15% loss in bone mineral density (BMD) at the lumbar spine and the femoral neck during the first 6 post-transplant months [7-9]. The pathogenesis of post-transplantation osteoporosis is multifactorial and incompletely understood but was largely attributed to the pre-transplant and post-transplant regimens that include high doses of glucocorticoids and immunosuppressive agents (such as ciclosporine A or tacrolimus). These drugs have specific adverse effects upon skeletal integrity, leading to rapid bone loss and consequently, an increased risk of fractures [10, 11]. TBI being usually combined with chemotherapy, it is difficult to evaluate its exact contribution to bone loss. Numerous studies in animals, and *in vitro* models have shown deleterious effects of ionizing radiation on osteogenesis and vasculature [11-13]. After cessation of the post-transplant regimen, bone mass is reduced and bone remodeling is altered more than

6 years after BMT, even if countermeasures have been used (hormone replacement or bisphosphonates) [14, 15]. The implication of engrafted cells in post-transplant remodeling, compared to recipient cells is poorly known.

In the present study, we have studied the variations in bone mass and microarchitecture of irradiated and transplanted mice compared to those of age-matched C57BL/6 (recipients) and GFP-transgenic-C57BL/6 (donors) mice.

MATERIAL AND METHODS

Mouse strain

Six-weeks-old C57BL/6 male mice (B6 mice) were transplanted with bone marrow-derived cells from GFP transgenic mice (C57BL/6TgN-(actEGFP)Osby01) (thereafter referred as the GFP mice) in which the GFP transgene is expressed in the cytoplasm, under the control of a nontissue-specific promoter (chicken β -actin with cytomegalovirus enhancer) [16]. This confers a green fluorescence to all tissues under UV light (with the exception of erythrocytes and hair). B6 and GFP mice were housed in a level 2 biosafety animal facility and received food and water *ad libitum*. Before manipulations, animals were anesthetized using an intraperitoneal injection of chloral hydrate. This study was conducted in accordance with the European Community guidelines for animal care (Journal Officiel des Communautés Européennes, L358, December 18, 1986).

Bone marrow transplantation

BM extraction and BMT were made as previously described [17]. Briefly, GFP⁺ bone marrow cells were obtained by flushing femurs of GFP mice with Dulbecco's modified

Eagle's medium (Invitrogen, Paisley, UK), and washed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen). Retro-orbital injection of 3 to 5 x 10⁷ cells in 0.1 ml of mouse serum and PBS (1:1), was done in 9.0-Gy-irradiated B6 mice (⁶⁰Co γ -rays within 1 day before BMT). Transplanted T^{GFP}B6 mice received 10 mg/kg/day ciprofloxacin for 4 weeks to prevent infection during the aplastic phase. They were sacrificed 1, 3 or 6 months after BMT (Fig. 1). B6 and GFP mice were euthanized at M0, M1, M3 and M6 and served as age-matched controls of recipients and donor mice, respectively.

Flow Cytometry Analysis

To quantify the amount of engraftment, the peripheral blood mononuclear cells of T^{GFP}B6 mice were analyzed before sacrifice by flow cytometry using a XL cytometer (Beckman-Coulter, Hiialeah, FL). Leukocytes were gated on, and GFP fluorescence was measured under the fluorescein isothiocyanate (FITC) channel. All analyses and quantitation were performed using the System II software from Beckman-Coulter.

X-ray microtomography (microCT)

MicroCT was performed on the distal femur with a Skyscan 1072 X-ray computed microtomograph (Skyscan, Kontich, Belgium). Bone samples were analyzed with a resolution of 5.25 μ m per pixel with the cone beam procedure. 3D models were generated with the ANT software (release 2.4; Skyscan) and virtual sectioning was performed. The 3D measurements were obtained with the CTan software (release 1.6 – Skyscan). For each samples, 300 section images (1.5 mm) were selected from 1.1 mm under the growth cartilage and correspond to the secondary spongiosa. Trabecular bone volume (BV/TV, in %), trabecular number (Tb.N, in /mm), trabecular separation

(Tb.Sp, in μm), trabecular thickness (Tb.Th, in μm), trabecular bone pattern factor (Tb.Pf) and the structure model index (SMI) were calculated.

Measurements on cortical bone were performed on a 2D cross section image taken 2.6 mm under the growth cartilage. Images were analyzed with image J software (release 1.34s –NIH – USA). After segmentation, three measurements were obtained: cortical area (Ct.Ar, in mm^2), mean cortical thickness (Ct.Th, in μm) and maximal outer diameter (B.Dm, in μm). The cross-sectional moment of inertia (CSMI) was calculated using the assumption that bone are cylindrical: $\text{CSMI} = (\pi/64) \times (\text{B.Dm}^4 - (\text{B.Dm} - 2\text{Ct.Th})^4)$ [18].

Histology

At the time of sacrifice, mice were anesthetized and transcardially perfused with PBS and 4% buffered paraformaldehyde. Hind limb were dissected and post-fixed in 4% paraformaldehyde. The right femurs were decalcified in EDTA 15% pH 7.4 for 7 days with bath change every 2-3 days. They were dehydrated in graded ethanol solutions, embedded in paraffin, and longitudinally sectioned (5 μm thick). Slides were stained with DAPI dilactate (Sigma), mounted in a fluorescence mounting medium (DakoCytomation, Trappes, France) and GFP was revealed under fluorescence microscopy with a specific cube for FITC (LEITZ DMR, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

Statistical analysis

Statistical study was done with SYSTAT statistical software (release 11.0). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Normal distribution of data was assessed by controlling the skewness and kurtosis (positive and close to 0). Significant differences between groups were assessed by analysis of variance

(ANOVA) with the Bonfferoni post-hoc test when $N \geq 6$ or by a non parametric ANOVA (Kruskal-Wallis test) with Mann and Whitney' U test for pairwise comparisons, when $N < 6$ in a group. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Trabecular bone mass and microarchitecture (table 1, Fig. 2)

Comparison of B6 and GFP mouse strains

B6 (recipients) and GFP (donors) mice had the same trabecular bone mass until M3, (i.e., at the age of 18 weeks). From this time point, the relative composition of the trabecular network in term of rods and plates significantly differed between both strains and GFP mice had more rods, as evidenced by an increased SMI. At M6 in GFP mice, BV/TV was 27% lower than in B6 mice, with a significantly reduction in Tb.N. With aging, Tb.Th of GFP mice increased, but no change occurred in B6 mice.

Bone changes in T^{GFP} B6 mice after BMT

From one month after transplantation, T^{GFP} B6 mice presented a dramatic bone loss (-56% vs. B6), with significant reduction in Tb.N, Tb.Sp and Tb.P_f, reflecting the resorption of whole trabeculae. The bone volume and trabecular parameters did not increased with time. Tb.Th remained unchanged at M1 and M3 but significantly decreased at M6. SMI of T^{GFP} B6 mice was significantly increased vs. B6 mice as early as M1 and was not significantly different from GFP mice at M3 and M6. This corresponded to a marked conversion of plate trabeculae into pillars.

Cortical bone mass (table 2, Fig. 3)

Comparison of B6 and GFP mouse strains

Both strains of mice had identical cortical bone characteristic at M1 (10 weeks old). Significant differences appeared at M3 (i.e. at the age of 18 weeks). B.Dm, Ct.Ar and CSMI of GFP mice were lower ($p < 0.05$). For B6 mice, B.Dm and CSMI increased with aging. On the contrary, cortical parameters of GFP mice remained unchanged with time. At M6, GFP mice presented a narrower femoral shaft with a significantly thicker cortex than B6.

Cortical bone changes in T^{GFP} B6 mice after BMT

Changes in cortical bone appeared at M3 after BMT. B.Dm, Ct.Ar and CSMI became statistically lower than those of age-matched B6 mice and identical to those of GFP mice. An increase of Ct.Th (+32% vs. B6 and + 19% vs. GFP) was evidenced in T^{GFP} B6 mice at M6.

Engraftment of GFP⁺ cells in T^{GFP} B6 mice (Figure 4)

All B6 mice transplanted with GFP⁺ bone marrow cells had a proportion of GFP⁺ peripheral blood mononucleated cells >95% as compared to donor values.

Donor cells homed to the bone after BMT. GFP⁺ cells were found in the epiphysis, metaphysis and along the secondary trabecular surfaces of the distal femur at M1, M3 and M6. No relevant difference in location and number of GFP⁺ cells between the 3 time points was observed. Transplanted cells resident in the bone marrow were megakaryocytes, hematopoietic cells but also flattened cells along the trabeculae (lining cells), endosteal and periosteal cells. No osteocyte expressed the GFP, neither in trabecular nor cortical bone.

DISCUSSION

Transplant-related osteoporosis or osteopenia is a multifactorial disease in which the relative roles of chemotherapy and irradiation are not completely understood. We evaluated the bone mass and microarchitecture changes after BMT in mice being lethally irradiated, without additional treatment. T^{GFP}B6 presented a >50% loss of bone mass one month after BMT. Transplanted cells did not allow the preservation (or recovery) of trabecular bone mass 6 months post-transplantation.

In patients, bone loss occurs during the first 6 months [19, 20], as assessed by bone markers showing an increase in resorption and a decreased formation [21]. Long-term changes of BMD and metabolism of allogeneic BMT survivors differ according to investigators. In studies with a long follow-up period (5 to 6 years after BMT), patients exhibited osteopenia ($-1 < \text{BMD} < 0$), suggesting a limited recovery of bone mass with time [14, 15]. The recovery capacities were dependent on the associated treatment used to prevent the graft versus host disease, and the use of additional countermeasures [10, 11]. In our study, a significant increase in cortical thickness was concomitant with trabecular bone loss in T^{GFP}B6 mice. Cortical thickening appeared as a paradoxical mechanism. Myelosuppression was due to total body irradiation, without chemotherapy. The effects of irradiation on bone remodeling might not be the same in the different envelopes. Ionizing radiation has deleterious effects on hematopoietic cells and also on marrow stromal cells [22, 23]. They especially induce direct impairment of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSC) *in vitro* [12]. In recipient patients, the number of BMSC is dramatically reduced up to 12 years after transplantation. BMSC were co-transplanted with hematopoietic stem cells during whole BMT but did not sufficiently proliferate in recipient bone marrow: majority of residual BMSC remains of host origin [24]. Nevertheless, BMSC are known to migrate

and localize to the bone marrow after intravenous infusion in human [25, 26] and mouse [27, 28]. T^{GFP}B6 mice had donor cells from hematopoietic and mesenchymal lineages (periosteal, endosteal and lining cells), identified by their cytoplasmic green fluorescence due their GFP content [16]. No GFP⁺ osteocyte from the donor mice could be evidenced in T^{GFP}B6 mice. This result is in accordance with Wang *et al.* who described bone lining cells engraftment, but no evidence of osteoblastic activity and incorporation into the bone matrix of donor cells [29]. Differentiation of donor cells into osteocytes, after systemic infusion of various cell populations, was described in other studies at a very low frequency [28, 30, 31]: Nilsson *et al.* have measured only 3/1000 osteocytes of donor origin in nonablated mice [32]. Detection of rare donor-derived osteocytes necessitates the observation of a very high number of histological sections. Direct and indirect effects of irradiation on recipients BMSC, cumulated with limited engraftment and proliferation of donor BMSC could explain the weak contribution of BMT to bone matrix production.

GFP transgenic mice have been largely used as donors for BMT because GFP⁺ cells can be directly traced in recipients, for long time, in fresh, frozen and fixed tissues [17, 33-37]. GFP mice have C57BL/6 genetic background, justifying the use of C57BL/6 mice as wild-type controls and recipients. Only heterozygous animals for the transgene were used because homozygous die within the first two weeks following birth, putatively due to transgene integration site effects. Our study revealed that transgenic and wild-type B6 mice had different bone mass and microarchitecture: bone loss was accelerated upon aging in GFP mice with a decrease in cortical femoral bone. These differences could be due to the transgene integration site effects, as suggested in homozygous mice, although this site is still unknown. Differences observed in transgenic mice could also be due to direct effects of GFP itself. Some reports have suggested toxic effects of GFP in a

variety of cell types [38, 39]. Furthermore, Mak *et al.* have found an upregulation of interleukin-6 (IL-6) expression in myoblasts that overexpressed GFP [40]. IL-6 promotes osteoclast maturation and activation. It also affects osteoblasts: transgenic mice overexpressing IL-6 have osteopenia with severe alterations in cortical and trabecular bone microarchitecture [41].

Cortical bone changes in T^{GFP}B6 mice appeared from 3 months after BMT and tended toward a GFP phenotype, with marked reduction in diaphyseal diameter and cortical area. Other studies have found similar changes of the recipient phenotype toward the donor phenotype after cell transplantation [42, 43]. These findings indicate that engrafted cells can reconstitute the hematopoietic system and the bone marrow microenvironment, thus influencing bone remodeling.

In summary, the graft of hematopoietic and stromal cells in the bone marrow of irradiated mice did not prevent post-transplant trabecular bone loss. Cortical bone characteristics of transplanted mice tended toward the donor phenotype, suggesting that bone marrow microenvironment had been reconstituted by the transplanted cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat – Région “Pays de la Loire”, INSERM and Bioregos.

REFERENCES

1. Armitage J.O. (1994) Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330:827-838
2. Sullivan K.M., Parkman R., Walters M.C. (2000) Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 319-338
3. Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L., Koo W.W., Fitzpatrick L.A., Neel M.D., Mccarville M.E., Orchard P.J., Pyeritz R.E., Brenner M.K. (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97:1227-1231
4. Koc O.N., Day J., Nieder M., Gerson S.L., Lazarus H.M., Krivit W. (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30:215-222
5. Aristei C., Tabilio A. (1999) Total-body irradiation in the conditioning regimens for autologous stem cell transplantation in lymphoproliferative diseases. *Oncologist* 4:386-397
6. Vriesendorp H.M. (2003) Aims of conditioning. *Exp Hematol* 31:844-854
7. Cohen A., Shane E. (2003) Osteoporosis after solid organ and bone marrow transplantation. *Osteoporos Int* 14:617-630
8. Kang M.I., Lee W.Y., Oh K.W., Han J.H., Song K.H., Cha B.Y., Lee K.W., Son H.Y., Kang S.K., Kim C.C. (2000) The short-term changes of bone mineral metabolism following bone marrow transplantation. *Bone* 26:275-279
9. Schulte C., Beelen D.W., Schaefer U.W., Mann K. (2000) Bone loss in long-term survivors after transplantation of hematopoietic stem cells: a prospective study. *Osteoporos Int* 11:344-353
10. Weilbaecher K.N. (2000) Mechanisms of osteoporosis after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 6:165-174
11. Ebeling P.R., Thomas D.M., Erbas B., Hopper J.L., Szer J., Grigg A.P. (1999) Mechanisms of bone loss following allogeneic and autologous hemopoietic stem cell transplantation. *J Bone Miner Res* 14:342-350

12. Li J., Kwong D.L., Chan G.C. (2007) The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplant* 11:379-387
13. Arnold M., Stas P., Kummermehr J., Schultz-Hector S., Trott K.R. (1998) Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiother Oncol* 48:259-265
14. Kerschlan-Schindl K., Mitterbauer M., Fureder W., Kudlacek S., Grampp S., Bieglmayer C., Fialka-Moser V., Pietschmann P., Kalhs P. (2004) Bone metabolism in patients more than five years after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34:491-496
15. Kananen K., Volin L., Tahtela R., Laitinen K., Ruutu T., Valimaki M.J. (2002) Recovery of bone mass and normalization of bone turnover in long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:33-39
16. Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319
17. Dreyfus P.A., Chretien F., Chazaud B., Kirova Y., Caramelle P., Garcia L., Butler-Browne G., Gherardi R.K. (2004) Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol* 164:773-779
18. Libouban H., Blouin S., Moreau M.F., Basle M.F., Audran M., Chappard D. (2007) Effects of risedronate in a rat model of osteopenia due to orchidectomy and disuse: Densitometric, histomorphometric and microtomographic studies. *Micron*
19. Gandhi M.K., Lekamwasam S., Inman I., Kaptoge S., Sizer L., Love S., Bearcroft P.W., Milligan T.P., Price C.P., Marcus R.E., Compston J.E. (2003) Significant and persistent loss of bone mineral density in the femoral neck after haematopoietic stem cell transplantation: long-term follow-up of a prospective study. *Br J Haematol* 121:462-468
20. Buchs N., Helg C., Collao C., Chapuis B., Slosman D., Bonjour J.P., Rizzoli R. (2001) Allogeneic bone marrow transplantation is associated with a preferential femoral neck bone loss. *Osteoporos Int* 12:880-886
21. Baek K.H., Lee W.Y., Oh K.W., Kim H.S., Han J.H., Kang M.I., Cha B.Y., Lee K.W., Son H.Y., Kang S.K., Kim C.C. (2004) Changes in the serum growth

- factors and osteoprotegerin after bone marrow transplantation: impact on bone and mineral metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1246-1254
22. Galotto M., Berisso G., Delfino L., Podesta M., Ottaggio L., Dallorso S., Dufour C., Ferrara G.B., Abbondandolo A., Dini G., Bacigalupo A., Cancedda R., Quarto R. (1999) Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27:1460-1466
 23. Hopewell J.W. (2003) Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 41:208-211
 24. Dickhut A., Schwerdtfeger R., Kuklick L., Ritter M., Thiede C., Neubauer A., Brendel C. (2005) Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84:722-727
 25. Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N., Nelson M., Patil S., Hardy W., Sturgeon C., Hewett T., Chung T., Stock W., Sher D., Weissman S., Ferrer K., Mosca J., Deans R., Moseley A., Hoffman R. (2001) Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29:244-255
 26. Mosca J.D., Hendricks J.K., Buyaner D., Davis-Sproul J., Chuang L.C., Majumdar M.K., Chopra R., Barry F., Murphy M., Thiede M.A., Junker U., Rigg R.J., Forestell S.P., Bohnlein E., Storb R., Sandmaier B.M. (2000) Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop Relat Res* S71-90
 27. Pereira R.F., O'hara M.D., Laptev A.V., Halford K.W., Pollard M.D., Class R., Simon D., Livezey K., Prockop D.J. (1998) Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1142-1147
 28. Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E., Hofmann T.J., Persons D.A., Horwitz E.M. (2004) Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11761-11766
 29. Wang L., Liu Y., Kalajzic Z., Jiang X., Rowe D.W. (2005) Heterogeneity of engrafted bone-lining cells after systemic and local transplantation. *Blood* 106:3650-3657
 30. Olmsted-Davis E.A., Gugala Z., Camargo F., Gannon F.H., Jackson K., Kienstra K.A., Shine H.D., Lindsey R.W., Hirschi K.K., Goodell M.A., Brenner M.K.,

- Davis A.R. (2003) Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15877-15882
31. Hou Z., Nguyen Q., Frenkel B., Nilsson S.K., Milne M., Van Wijnen A.J., Stein J.L., Quesenberry P., Lian J.B., Stein G.S. (1999) Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells: implications for skeletal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7294-7299
 32. Nilsson S.K., Dooner M.S., Weier H.U., Frenkel B., Lian J.B., Stein G.S., Quesenberry P.J. (1999) Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. *J Exp Med* 189:729-734
 33. Imasawa T., Utsunomiya Y., Kawamura T., Zhong Y., Nagasawa R., Okabe M., Maruyama N., Hosoya T., Ohno T. (2001) The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12:1401-1409
 34. Fukuda K., Fujita J. (2005) Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 68:1940-1943
 35. Ono K., Takii T., Onozaki K., Ikawa M., Okabe M., Sawada M. (1999) Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochem Biophys Res Commun* 262:610-614
 36. Hayakawa J., Migita M., Ueda T., Shimada T., Fukunaga Y. (2003) Generation of a chimeric mouse reconstituted with green fluorescent protein-positive bone marrow cells: a useful model for studying the behavior of bone marrow cells in regeneration in vivo. *Int J Hematol* 77:456-462
 37. Peranteau W.H., Hayashi S., Hsieh M., Shaaban A.F., Flake A.W. (2002) High-level allogeneic chimerism achieved by prenatal tolerance induction and postnatal nonmyeloablative bone marrow transplantation. *Blood* 100:2225-2234
 38. Liu H.S., Jan M.S., Chou C.K., Chen P.H., Ke N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 260:712-717
 39. Yang W.S., Ko J.K., Park S.O., Choi H.Y., Kim Y.N., Kim C.W. (2005) C-terminal region of Bfl-1 induces cell death that accompanies caspase activation when fused with GFP. *J Cell Biochem* 94:1234-1247

40. Mak G.W., Wong C.H., Tsui S.K. (2007) Green fluorescent protein induces the secretion of inflammatory cytokine interleukin-6 in muscle cells. *Anal Biochem* 362:296-298
41. De Benedetti F., Rucci N., Del Fattore A., Peruzzi B., Paro R., Longo M., Vivarelli M., Muratori F., Berni S., Ballanti P., Ferrari S., Teti A. (2006) Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 54:3551-3563
42. Bianco P., Kuznetsov S.A., Riminucci M., Fisher L.W., Spiegel A.M., Robey P.G. (1998) Reproduction of human fibrous dysplasia of bone in immunocompromised mice by transplanted mosaics of normal and Gsalpha-mutated skeletal progenitor cells. *J Clin Invest* 101:1737-1744
43. Ueda Y., Inaba M., Takada K., Fukui J., Sakaguchi Y., Tsuda M., Omae M., Kushida T., Iida H., Ikehara S. (2007) Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. *Stem Cells* 25:1356-1363

Table 1: MicroCT measurements

		M0	M1	<i>p</i> <0.05	M3	<i>p</i> <0.05	M6	<i>p</i> <0.05
BV/TV								
	B6	8.60 ± 1.13	7.82 ± 0.86		8.07 ± 1.47		9.64 ± 1.15	
	GFP	6.97 ± 0.91	9.56 ± 1.11		6.38 ± 0.28		7.02 ± 0.66	
	T ^{GFP} B6		3.42 ± 0.74 *		2.42 ± 0.86 *		1.93 ± 0.27 *	
Tb.N								
	B6	1.83 ± 0.19	1.69 ± 0.18		1.75 ± 0.34		1.92 ± 0.20	
	GFP	1.53 ± 0.18	1.99 ± 0.18		1.36 ± 0.06		1.30 ± 0.13	
	T ^{GFP} B6		0.75 ± 0.15 *		0.50 ± 0.16 *		0.51 ± 0.06 *	
Tb.Th								
	B6	46 ± 2	46 ± 0.5		46 ± 2		50 ± 1	
	GFP	45 ± 1	47 ± 2		47 ± 2		54 ± 2	a, c
	T ^{GFP} B6		45.2 ± 2		43 ± 3		37 ± 1 *	
Tb.Sp								
	B6	243 ± 11	247 ± 11		260 ± 22		255 ± 7	
	GFP	269 ± 13	219 ± 6		243 ± 5		282 ± 14	
	T ^{GFP} B6		338 ± 25 *		443 ± 56 *		364 ± 18 *	
Tb.P_f								
	B6	3.12 ± 0.33	3.24 ± 0.20		2.83 ± 0.36		2.26 ± 0.43	
	GFP	3.49 ± 0.22	3.11 ± 0.24		3.63 ± 0.13		3.02 ± 0.28	
	T ^{GFP} B6		4.40 ± 0.26 *		4.86 ± 0.49 *		5.09 ± 0.12 *	
SMI								
	B6	2.25 ± 0.07	2.28 ± 0.07		2.05 ± 0.16		1.83 ± 0.15	
	GFP	2.33 ± 0.05	2.26 ± 0.08		2.43 ± 0.04		2.37 ± 0.10	
	T ^{GFP} B6		2.74 ± 0.08 *		2.72 ± 0.07		2.58 ± 0.05	

The gray boxes indicate a significant difference vs. B6 with *p*<0.05.

* *p*<0.05 vs. GFP

a: *p*<0.05 vs. M0 for the same group

c: *p*<0.05 vs. M3 for the same group

Table 2: Cortical measurements of femoral diaphysis.

		M0	M1	<i>p</i> <0.05	M3	<i>p</i> <0.05	M6	<i>p</i> <0.05
B.Dm	B6	2.14 ± 0.04	2.21 ± 0.07		2.40 ± 0.09		2.56 ± 0.08	^{a, b}
	GFP	2.09 ± 0.07	2.04 ± 0.05		2.02 ± 0.05		2.26 ± 0.09	
	T ^{GFP} B6		2.03 ± 0.04		2.03 ± 0.12		1.11 ± 0.06	
Ct.Th	B6	137 ± 10	157 ± 6		175 ± 12		150 ± 5	
	GFP	158 ± 10	152 ± 7		168 ± 5		169 ± 5	
	T ^{GFP} B6		177 ± 6		173 ± 5		198 ± 5	^{*, c}
Ct.Ar	B6	2.11 ± 0.02	2.15 ± 0.07		2.45 ± 0.14		2.52 ± 0.15	
	GFP	2.19 ± 0.09	1.99 ± 0.06		1.82 ± 0.05		2.14 ± 0.13	
	T ^{GFP} B6		1.92 ± 0.07		1.84 ± 0.13		2.07 ± 0.06	
CSMI	B6	0.44 ± 0.04	0.55 ± 0.06		0.76 ± 0.06	^a	0.83 ± 0.07	^{a, b}
	GFP	0.47 ± 0.06	0.41 ± 0.04		0.43 ± 0.04		0.64 ± 0.08	
	T ^{GFP} B6		0.44 ± 0.02		0.46 ± 0.08		0.56 ± 0.06	

The gray boxes indicate a significant difference vs. B6 with *p*<0.05.

* *p*<0.05 vs. GFP

a: *p*<0.05 vs. M0 for the same group

b: *p*<0.05 vs. M1 for the same group

c: *p*<0.05 vs. M3 for the same group

Legends of Figures:

Fig. 1: Flowchart of the study. At M0, 6 weeks old B6 mice were lethally irradiated and transplanted with bone marrow cells extracted from GFP mice. Transplanted mice ($T^{GFP}B6$) were euthanized 1 (M1), 3 (M3) or 6 (M6) months after transplantation. B6 and GFP mice, sacrificed at same time points, were age-matched controls of recipient and donor strains respectively.

Fig. 2: 3D models obtained with microCT of the distal femur at M6. (A) B6, (B) GFP and (C) $T^{GFP}B6$ mice. Cortical bone is in light grey and trabeculae are darker.

Fig. 3: 2D cross section images of femoral diaphysis obtained by microCT 2.6 mm under the growth cartilage at M3 (A, B, C) and M6 (D, E, F) of B6 (A, D), GFP (B, E) and $T^{GFP}B6$ (C, F) mice.

Fig. 4: Engraftment of GFP^+ cells. Femurs were embedded decalcified in paraffin. Sections were directly observed for GFP fluorescence (A, C, D, F, G, I) or counterstained with DAPI (B, E, H) as a nuclear stain. Photographs of trabecular (A, D, G) and cortical (B, C, E, F, H, I) regions. The hematopoietic tissue and especially red blood cells were yellow autofluorescent whereas GFP emitted a green fluorescence. Arrow: GFP^+ periosteal cell in $T^{GFP}B6$ mice (I) and the corresponding nuclear (H). Bar = 100 μm .

Figure 1

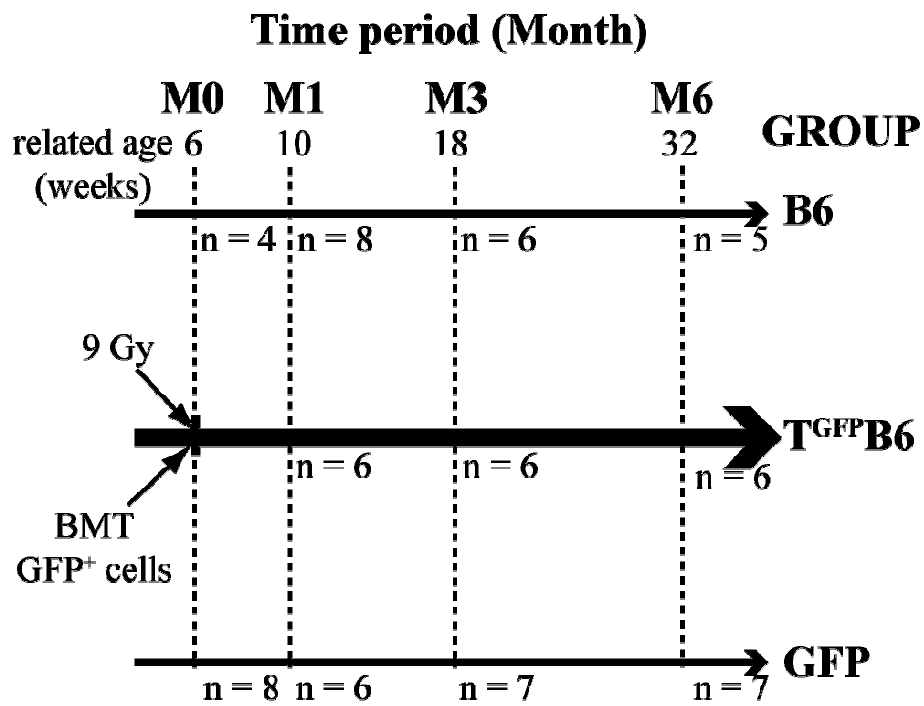


Figure 2

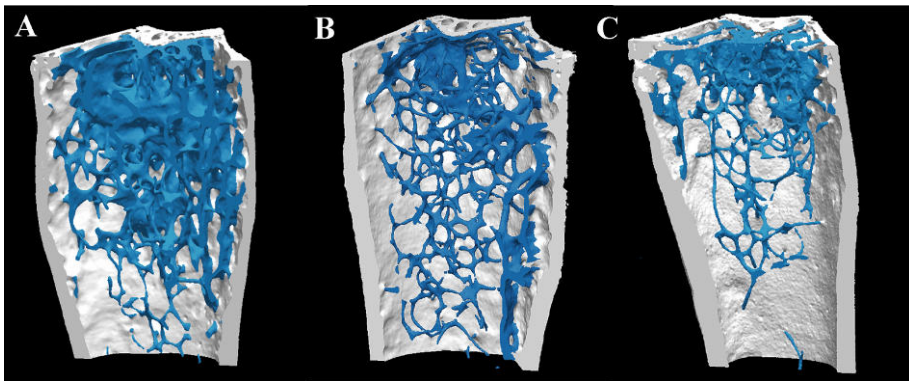


Figure 3

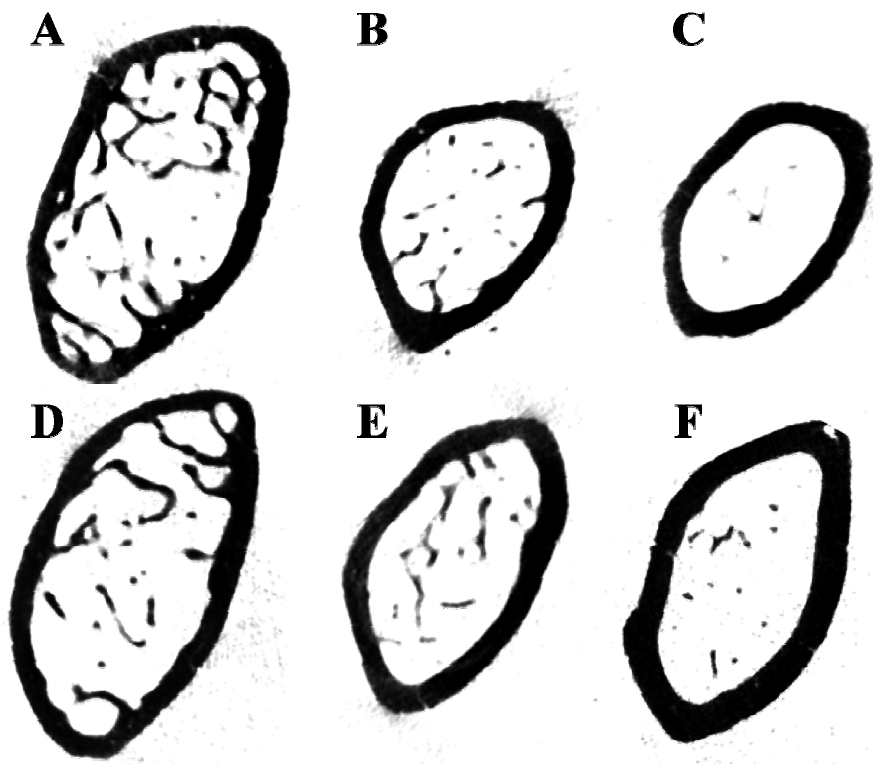
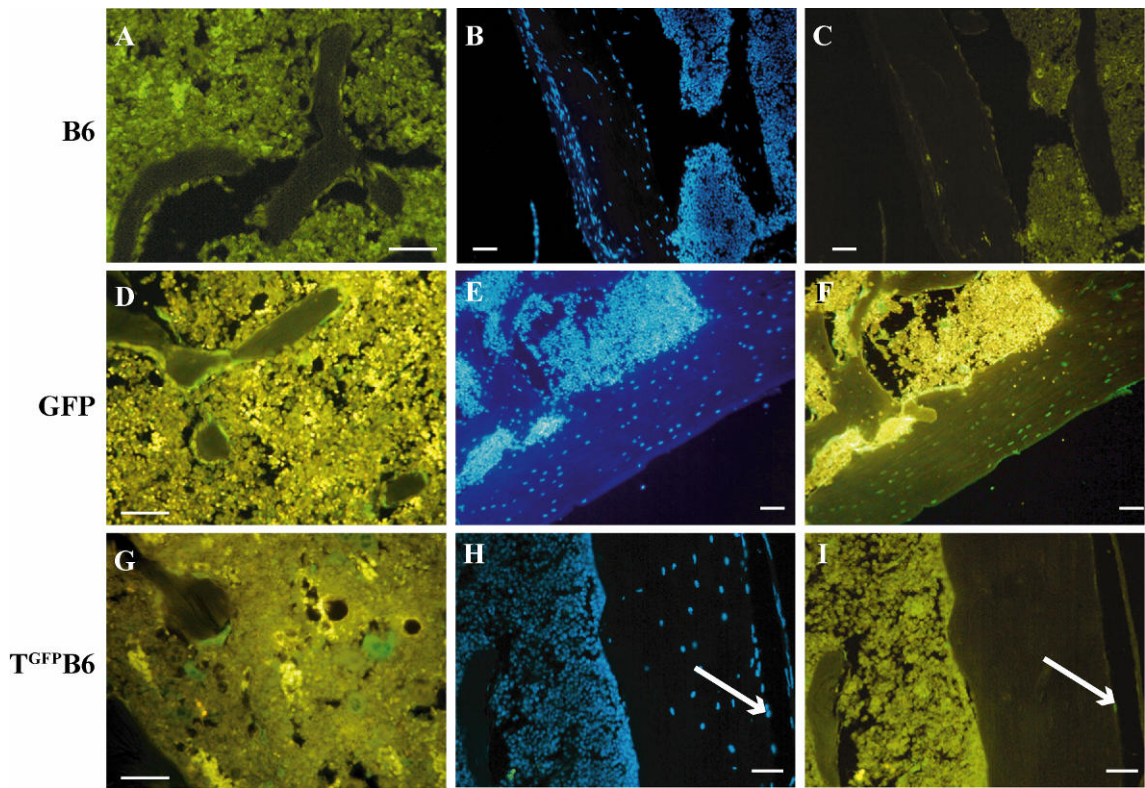


Figure 4



Decision Letter (OI-2007-12-0608)**From:** oi.europe@lyon.inserm.fr**To:** daniel.chappard@univ-angers.fr**Cc:****Subject:** Osteoporos Int - Decision on Manuscript ID OI-2007-12-0608**Body:** Manuscript ID: OI-2007-12-0608

Title: Bone mass and microarchitecture of irradiated and bone marrow-transplanted mice: influences of the donor strain.

Dear Prof. Chappard:

The above referenced manuscript that you submitted to Osteoporosis International has been reviewed by expert(s) in the field and myself. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

Regrettably, the manuscript is not acceptable for publication in its present form, but you may choose to revise and resubmit it for reconsideration. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments below and revise your manuscript.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Osteoporosis International and I look forward to receiving your revision.

Yours sincerely,
Ego Seeman
Editor, Osteoporosis International

Date**Sent:** 25-Jan-2008

Comments from Reviewer(s):

Reviewer:1

Comments to the Author

Dumas et al investigate the effects of TBI and BMT on bone mass and microarchitecture by microCT in mice. The bone loss was characterized by severe trabecular loss of about 50%, which was not restored after BMT. Cortical thickness of the femur was increased but the femoral width was decreased with reduced CSMI. Donor cells were present on trabecular surfaces, in periosteal and endosteal envelopes but no osteocytes were of donor origin,

This reviewer has the following questions/comments:

1. In humans bone loss is most marked at the FN after BMD with decreases of about 11% in the first year. How do the authors reconcile these findings with their own which demonstrate predominantly trabecular bone loss and cortical thickening. This needs to be discussed in the paper. These high rates of bone loss at the hip should be emphasized in the introduction as well.
2. Page 9. mention could be made here of two recent large prospective

intervention studies with pamidronate which show that bone loss at the femoral neck and total hip were not completely prevented by pamidronate (Grigg AG et al J Clin Endocrinol Metab 2006; Kananen K et al Clin Endocrinol Metab 2005).

3. Page 7: Tb Sp is increased not reduced. This needs to be corrected in paragraph 2.

4. Page 10, para 2: The grammar in first sentence needs attention. It does not make sense.

5. English spelling needs minor attention throughout.

6. Tables 1 and 2: Abbreviations for the histomorphometric variables need to be defined for the reader.

7. How commonly is TBI used before BMT in humans? This should be discussed.

Reviewer: 2

This is a well written manuscript about the effect of total body irradiation (TBI) on bone remodeling in trabecular and cortical mouse bone. The authors used transgenic GFP+ whole bone marrow as donor marrow and were able to track bone cell and marrow engraftment. They found that trabecular bone mass was significantly decreased after TBI compared to cortical bone mass. Because baseline bone mass and bone remodeling characteristics in the GFP+ donor mice and B6 recipient mice were different, they compared the bone mass in trabecular and cortical bone in transplanted mice that had received TBI to the donor and host un-irradiated age matched mice and found that the transplanted mice had bone mass characteristics of the donor marrow strain. They noted that trabecular bone mass was not restored as the cortical bone was. Interestingly, they found GFP+ cells lining the trabecular, periosteal and endosteal “envelopes” but no GFP+ cells in areas of osteocytes. Because they did not do any immunophenotyping or functional analyses to further characterize these “lining” cells, they cannot definitively conclude that there was non-hematopoietic cell contribution from the donor to trabecular bone loss and thus should temporize the last statement in the discussion. Overall, this study presents an intriguing finding that trabecular bone loss after TBI is significantly influenced by donor transplanted cells and that cortical and trabecular bone had different rates of loss and recovery after TBI and transplant.

Minor points:

Abstract- “bone envelopes” is vague and perhaps the authors should state the data between cortical and trabecular bone.

2. page 3- did not mention the role of hypogonadism as contributor to bone loss after transplant.

3. cyclosporine (not ciclosporine)

4. Page 7. GFP mice had significant difference in bone mass (which they authors further discuss later) however, were the GFP mice of B6 origin or mixed genetic background.

5. page 7, a nice control would have been B6 mice into B6 mice but I understand you would not have been able to track the donor cells.

6. page 8. Emphasize that the lining (periosteal and endosteal) cells were defined morphologically. You did not definitely confirm that these were osteoblasts and lining cells and not of hematopoietic origin by

immunophenotyping and CFU-Ob, CFU-F analyses, etc.

6. discussion point: Did TBI induce hypogonadism in your mouse strains? Could that have been an additional mechanism of bone loss after TBI- does hypogonadism affect trabecular bone differently than cortical bone?

7. page 9- grammatical suggestion: The majority of residual BMSC remains of host origin, despite the fact that BMSC are co-transplanted with hematopoietic stem cells when using donor whole bone marrow.

8. page 11 summary sentence- not sure if you can conclude that non-hematopoietic cells that make up the bone marrow microenvironment were derived from donor. This implies that osteoblasts were from the donor and this is highly controversial. Most studies show very few OB are donor derived. You could prove that by doing spleen cell transplants from GFP mice or doing immunophenotyping of GFP+ transplanted cells or GFP staining of CFU-OB from transplanted animals.

Les remarques du reviewer 2 portant sur un éventuel hypogonadisme chez les souris T^{GFP} B6 est très pertinente. Des dosages de la testostérone sérique sont en cours.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La science des biomatériaux a pris une place prépondérante pour l'élaboration de substituts osseux, très largement utilisés dans le cadre de la réparation du tissu osseux. Parmi eux les allogreffes sont, après les autogreffes, les plus réalisées à l'heure actuelle mais dont l'efficacité est limitée dans certaines applications thérapeutiques. La réparation des grandes pertes de substances osseuses et la guérison des maladies osseuses congénitales font l'objet de recherches précliniques de thérapie cellulaire : l'ingénierie tissulaire dans le premier cas et la transplantation de cellules de moelle osseuse pour le second.

Les objectifs de cette thèse ont été d'étudier la réponse de cellules médullaires au contact de biomatériaux implantables en site osseux et d'étudier les potentiels thérapeutiques pour la réparation du tissu osseux de l'implantation de ces cellules, leur contribution et leur devenir.

Biomatériaux et ingénierie du tissu osseux.

Dans un premier temps nous avons étudié les modifications de surfaces d'allogreffes osseuses humaines suite à leur purification par des agents chimiques, dont certains sont utilisés industriellement, et leurs conséquences sur la cytocompatibilité du greffon produit. Nous avons montré que H_2O_2 et NaOH ont des effets néfastes sur la surface des matrices osseuses, diminuant l'adhésion et la prolifération de cellules ostéoblastiques *in vitro*. Les différentes méthodes d'investigations utilisées nous ont permis d'établir que le traitement par H_2O_2 altère le collagène et modifie la structure des cristaux d'hydroxyapatite alors que le traitement par NaOH induit la dégradation du collagène et diminue le nombre de cristaux. Tous deux entraînent l'élimination des protéines argyrophiles (ostéopontine) des ostéoplastes et des canalicules ostéocytaires. $NaHCO_3$ quand à lui, a permis de produire un greffon propre dont les phases minérales et organiques sont intègres, permettant l'adhésion et la prolifération des cellules ostéoblastiques à sa surface *in vitro*.

Dans un second temps, des matrices osseuses trabéculaires bovines ont été purifiées par $NaHCO_3$ et ont servi de support à des cellules de moelle osseuse de souris. Le substitut osseux hybride ainsi élaboré a été utilisé pour réparer un défaut de taille critique au niveau du cône de souris. Nous avons obtenu une formation osseuse significativement plus importante lorsque les cellules médullaires ont été cultivées et implantées avec la matrice osseuse par rapport à la matrice seule. Néanmoins le comblement du déficit est

resté incomplet 8 semaines après la greffe. Nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats en induisant la différenciation ostéoblastique des cellules médullaires avant leur implantation. L'utilisation de cellules exprimant la GFP a montré que les cellules ayant survécues à l'implantation et visualisées au niveau du site de greffe après 2 semaines, ne sont plus présentes après 8 semaines et ne semblent pas avoir participé directement à la régénération osseuse puisqu'aucune cellule exprimant la GFP n'a été intégrée dans la matrice nouvellement formée.

Dans l'objectif d'améliorer le potentiel ostéogénique de la construction matrice/cellules élaborée, nous avons cherché à enrichir la population cellulaire en cellules ostéogéniques. Pour cela nous avons réalisé l'immunodéplétion des cellules hématopoïétiques contaminant les cultures primaires de moëlle osseuse de souris selon l'expression spécifique du CD11b. La population cellulaire résultante, très faible portion de la moëlle osseuse totale, est alors constituée à plus de 56 % d'ostéoprogéniteurs matures exprimant AlkP. Nous avons trouvé une corrélation linéaire entre le nombre de cellules CD11b⁻ dans la fraction adhérente de la moëlle osseuse et le nombre de cellules AlkP⁺ dans cette même population. Les cellules CD11b⁻ ont élaboré *in vitro* une matrice extracellulaire minéralisée de manière beaucoup plus importante que la population totale, sans stimulation exogène par de la dexaméthasone.

Thérapie cellulaire des maladies osseuses congénitales.

En collaboration avec le laboratoire EMI 0011 de la Faculté de Médecine de Créteil, nous avons souhaité étudier la masse et la microarchitecture osseuses après irradiation corporelle totale et transplantation systémique de moëlle osseuse chez la souris. L'utilisation de cellules issues de souris transgéniques pour la GFP a permis l'étude de la greffe des cellules médullaires au niveau du tissu osseux après transplantation systémique. Nous avons montré que l'irradiation et la transplantation seules, sans chimiothérapie associée, induisent une perte osseuse dramatique au niveau trabéculaire mais un épaissement de l'os cortical des diaphyses fémorales. Les souris transplantées ont présenté en plus de la perte osseuse, des modifications microarchitecturales du réseau trabéculaire. En comparant les microarchitectures des souris transplantées, des souris C57BL/6, lignée receveuse et des souris GFP-transgéniques, lignée donneuse, nous avons observé que :

- les souris transgéniques présentent une masse osseuse et des caractéristiques trabéculaires et corticales différentes des souris C57Bl/6 ayant pourtant servies de fond génétique pour l'élaboration des souris transgéniques.

- La microarchitecture osseuse des souris C57Bl/6 irradiées et transplantées montre, 6 mois après la transplantation, un changement de phénotype vers celui des souris donneuses.

Le suivi des cellules transplantées a montré leur migration au niveau des épiphyses et métaphyses fémorales. Elles sont présentes dans les espaces médullaires, le long des travées et dans les couches cellulaires endostéales et périostéales. Aucun ostéocyte n'exprime la GFP, suggérant que les cellules transplantées ne participent pas directement au remodelage osseux. Elles ont néanmoins eu une influence sur celui-ci, permettant le changement de phénotype, en reconstituant un nouveau microenvironnement osseux.

Perspectives envisagées.

Les modèles de souris transgéniques pour la GFP et de lacune de taille critique au niveau du crâne de la souris développés lors de cette thèse vont permettre l'étude des mécanismes cellulaires impliqués lors de l'implantation de divers biomatériaux ou substituts osseux élaborés par ingénierie tissulaire. De nouveaux biomatériaux sont en cours d'élaboration au sein du laboratoire dont certains ont montré des résultats préliminaires très satisfaisants pour le comblement du déficit osseux chez la souris. Nous pensons les utiliser seuls ou par ingénierie tissulaire pour la réparation de grandes pertes osseuses dans un modèle de lacune osseuse au niveau du crâne de lapin.

L'installation prochaine de la vidéomicroscopie au sein du laboratoire va permettre de visualiser, grâce au modèle de cellules GFP, la colonisation des biomatériaux par les cellules, sans marquage préalable ni problème de fading, afin d'en comprendre les mécanismes et d'améliorer les propriétés d'ostéoconduction des biomatériaux.

Les différences phénotypiques observées au niveau du tissu osseux des souris C57Bl/6 et les souris GFP-transgéniques ne peuvent être dues qu'aux effets de l'insertion du transgène dans le génome ou des effets directs de l'expression de la GFP. Depuis peu, quelques équipes imputent à la GFP des effets directs plus ou moins néfastes sur certains types de cellules (Liu *et coll.* 1999; Yang *et coll.* 2005; Mak *et coll.* 2007). Un travail de post-doctorat au sein du laboratoire a consisté à mettre au point la détection par PCR

quantitative de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le remodelage osseux. Afin de mieux caractériser les microenvironnements osseux des deux lignées murines pouvant expliquer les différences microarchitecturales observées, l'expression dans les cellules médullaires d'un grand nombre de gènes comme l'IL-6 et DKK1 sera étudiée.

REFERENCES

- Aalami, O. O., R. P. Nacamuli, K. A. Lenton, C. M. Cowan, T. D. Fang, K. D. Fong, Y. Y. Shi, H. M. Song, D. E. Sahar, M. T. Longaker. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 114: 713-20; 2004.
- Abdallah, B. M., M. Haack-Sorensen, T. Fink, M. Kassem. Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone* 39: 181-8; 2006.
- Abedin, M., Y. Tintut, L. L. Demer. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* 95: 671-6; 2004.
- Agence de la Biomédecine. Bilan des activités de prélèvement et de greffe en France en 2006. www.agence-biomedecine.fr; 2006.
- Al-Gubory, K. H., L. M. Houdebine. In vivo imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. *Eur J Cell Biol* 85: 837-45; 2006.
- Allay, J. A., J. E. Dennis, S. E. Haynesworth, M. K. Majumdar, D. W. Clapp, L. D. Shultz, A. I. Caplan, S. L. Gerson. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 8: 1417-27; 1997.
- Alsalameh, S., R. Amin, T. Gemba, M. Lotz. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50: 1522-32; 2004.
- Amstutz, H. C., P. Campbell, N. Kossovsky, I. C. Clarke. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research*: 7-18; 1992.
- Angelopoulou, M., E. Novelli, J. E. Grove, H. M. Rinder, C. Civin, L. Cheng, D. S. Krause. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 31: 413-20; 2003.
- Antoine, C., S. Muller, A. Cant, M. Cavazzana-Calvo, P. Veys, J. Vossen, A. Fasth, C. Heilmann, N. Wulffraat, R. Seger, S. Blanche, W. Friedrich, M. Abinun, G. Davies, R. Bredius, A. Schulz, P. Landais, A. Fischer. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet* 361: 553-60; 2003.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, T. Suda. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118: 149-61; 2004.
- Aristei, C., A. Tabilio. Total-body irradiation in the conditioning regimens for autologous stem cell transplantation in lymphoproliferative diseases. *The oncologist* 4: 386-97; 1999.
- Armitage, J. O. Bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 330: 827-38; 1994.
- Armitage, J. O., P. J. Bierman, J. M. Vose, J. R. Anderson, D. D. Weisenburger, A. Kessinger, E. C. Reed, W. P. Vaughan, P. F. Coccia, D. T. Purtilo. Autologous

- bone marrow transplantation for patients with relapsed Hodgkin's disease. *Am J Med* 91: 605-11; 1991.
- Arnold, M., P. Stas, J. Kummermehr, S. Schultz-Hector, K. R. Trott. Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiother Oncol* 48: 259-65; 1998.
- Arrington, E. D., W. J. Smith, H. G. Chambers, A. L. Bucknell, N. A. Davino. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research*: 300-9; 1996.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Wagner, J. M. Isner. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-8; 1999.
- Asakura, A., M. Komaki, M. Rudnicki. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68: 245-53; 2001.
- Asakura, A., P. Seale, A. Girgis-Gabardo, M. A. Rudnicki. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159: 123-34; 2002.
- Askenasy, N., T. Zorina, D. L. Farkas, I. Shalit. Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 20: 301-10; 2002.
- Atlan, G., O. Delattre, S. Berland, A. LeFaou, G. Nabias, D. Cot, E. Lopez. Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials* 20: 1017-22; 1999.
- Aubin, J. E. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 73-82; 1998.
- Aubin, J. E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 72: 396-410; 1999.
- Austin, T. W., E. Lagasse. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 120: 131-5; 2003.
- Bacigalupo, A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 17: 387-99; 2004.
- Baddoo, M., K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Kopen, D. G. Phinney. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of cellular biochemistry* 89: 1235-49; 2003.
- Badiavas, E. V., V. Falanga. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 139: 510-6; 2003.
- Bailey, A. S., S. Jiang, M. Afentoulis, C. I. Baumann, D. A. Schroeder, S. B. Olson, M. H. Wong, W. H. Fleming. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103: 13-9; 2004.
- Bakker, B., G. G. Massa, A. M. van Rijn, A. Mearadji, H. J. van der Kamp, M. M. Niemer-Tucker, M. H. van der Hage, J. J. Broerse, J. M. Wit. Effects of total-body irradiation on growth, thyroid and pituitary gland in rhesus monkeys. *Radiother Oncol* 51: 187-92; 1999.

- Baslé, M. F., G. Bertrand, S. Guyetant, D. Chappard, M. Lesourd. Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J Biomed Mater Res* 30: 157-63; 1996.
- Baxter, N. N., E. B. Habermann, J. E. Tepper, S. B. Durham, B. A. Virnig. Risk of pelvic fractures in older women following pelvic irradiation. *Jama* 294: 2587-93; 2005.
- Bellows, C. G., A. Ciaccia, J. N. Heersche. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone* 23: 119-25; 1998.
- Bennaceur-Griscelli, A., C. Ponderre, V. Schiavon, W. Vainchenker, L. Coulombel. Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history. *Blood* 97: 435-41; 2001.
- Bensinger, W. I., R. Clift, P. Martin, F. R. Appelbaum, T. Demirer, T. Gooley, K. Lilleby, S. Rowley, J. Sanders, R. Storb, C. D. Buckner. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood* 88: 2794-800; 1996.
- Bergonie, J., L. Tribondeau. Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906. *Yale J Biol Med* 76: 181-2; 2003.
- Betsholtz, C., P. Lindblom, H. Gerhardt. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *Exs*: 115-25; 2005.
- Betz, V. M., O. B. Betz, M. B. Harris, M. S. Vrahas, C. H. Evans. Bone tissue engineering and repair by gene therapy. *Front Biosci* 13: 833-41; 2008.
- Bianco, P., P. Gehron Robey. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-8; 2000.
- Bianco, P., S. A. Kuznetsov, M. Riminucci, L. W. Fisher, A. M. Spiegel, P. G. Robey. Reproduction of human fibrous dysplasia of bone in immunocompromised mice by transplanted mosaics of normal and Gsalpha-mutated skeletal progenitor cells. *J Clin Invest* 101: 1737-44; 1998.
- Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos, P. G. Robey. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19: 180-92; 2001.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, A. L. Vescovi. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534-7; 1999.
- Bloemers, F. W., T. J. Blokhuis, P. Patka, F. C. Bakker, B. W. Wippermann, H. J. Haarman. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *Journal of biomedical materials research* 66: 526-31; 2003.
- Boban, I., C. Jacquin, K. Prior, T. Barisic-Dujmovic, P. Maye, S. H. Clark, H. L. Aguila. The 3.6 kb DNA fragment from the rat *Coll1a1* gene promoter drives the expression of genes in both osteoblast and osteoclast lineage cells. *Bone* 39: 1302-12; 2006.

- Bolander, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 165-70; 1992.
- Bosch, P., D. S. Musgrave, J. Y. Lee, J. Cummins, T. Shuler, T. C. Ghivizzani, T. Evans, T. D. Robbins, Huard. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18: 933-44; 2000.
- Bostrom, M. P., N. P. Camacho. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research: S274-82*; 1998.
- Boyan, B. D., T. W. Hummert, D. D. Dean, Z. Schwartz. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17: 137-46; 1996.
- Boyce, S. T., A. P. Supp, R. R. Wickett, S. B. Hoath, G. D. Warden. Assessment with the dermal torque meter of skin pliability after treatment of burns with cultured skin substitutes. *J Burn Care Rehabil* 21: 55-63; 2000.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, D. L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-42; 2003.
- Brazelton, T. R., H. M. Blau. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23: 1251-65; 2005.
- Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90: 1345-64; 1997.
- Bryder, D., D. J. Rossi, I. L. Weissman. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169: 338-46; 2006.
- Buck, B. E., T. I. Malinin. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clinical orthopaedics and related research: 8-17*; 1994.
- Burg, K. J., S. Porter, J. F. Kellam. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21: 2347-59; 2000.
- Buser, D., R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, H. Stich. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25: 889-902; 1991.
- Butler, D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* 391: 320-4; 1998.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, D. T. Scadden. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-6; 2003.
- Camacho, N. P., L. Hou, T. R. Toledano, W. A. Ilg, C. F. Brayton, C. L. Raggio, L. Root, A. L. Boskey. The material basis for reduced mechanical properties in oim mice bones. *J Bone Miner Res* 14: 264-72; 1999.
- Cancedda, R., G. Bianchi, A. Derubeis, R. Quarto. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21: 610-9; 2003.
- Cancedda, R., P. Giannoni, M. Mastrogiacomo. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 28: 4240-50; 2007.
- Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-50; 1991.

- Caplan, A. I., J. D. Mosca. Orthopaedic gene therapy. Stem cells for gene delivery. *Clinical orthopaedics and related research*: S98-100; 2000.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-5; 1994.
- Chan, A. W., K. Y. Chong, C. Martinovich, C. Simerly, G. Schatten. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291: 309-12; 2001.
- Chang, B. S., C. K. Lee, K. S. Hong, H. J. Youn, H. S. Ryu, S. S. Chung, K. W. Park. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21: 1291-8; 2000.
- Chappard, D., C. Fressonnet, C. Genty, M. F. Baslé, A. Rebel. Fat in bone xenografts: Importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials* 14: 507-512; 1993.
- Chen, L. B., X. B. Jiang, L. Yang. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 10: 3016-20; 2004.
- Chen, T. L. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone* 35: 83-95; 2004.
- Chen, T. L., D. Fry. Hormonal regulation of the osteoblastic phenotype expression in neonatal murine calvarial cells. *Calcif Tissue Int* 64: 304-9; 1999.
- Chen, X. D., S. Shi, T. Xu, P. G. Robey, M. F. Young. Age-related osteoporosis in biglycan-deficient mice is related to defects in bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 17: 331-40; 2002.
- Cheng, H., W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park, T. C. He. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1544-52; 2003.
- Cheng, L., P. Qasba, P. Vanguri, M. A. Thiede. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 184: 58-69; 2000.
- Cheng, S. L., J. W. Yang, L. Rifas, S. F. Zhang, L. V. Avioli. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134: 277-86; 1994.
- Chopra, R., A. H. Goldstone, R. Pearce, T. Philip, F. Petersen, F. Appelbaum, E. De Vol, P. Ernst. Autologous versus allogeneic bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-controlled analysis of the European Bone Marrow Transplant Group Registry data. *J Clin Oncol* 10: 1690-5; 1992.
- Chung, U. I., B. Lanske, K. Lee, E. Li, H. Kronenberg. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13030-5; 1998.
- Coccia, P. F., W. Krivit, J. Cervenka, C. Clawson, J. H. Kersey, T. H. Kim, M. E. Nesbit, N. K. Ramsay, P. I. Warkentin, S. L. Teitelbaum, A. J. Kahn, D. M.

- Brown. Successful bone-marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *The New England journal of medicine* 302: 701-8; 1980.
- Cohen, A., E. Shane. Osteoporosis after solid organ and bone marrow transplantation. *Osteoporos Int* 14: 617-30; 2003.
- Cohen, R. B., K. C. Tsou, S. H. Rutenburg, A. M. Seligman. The colorimetric estimation and histochemical demonstration of beta-d-galactosidase. *The Journal of biological chemistry* 195: 239-49; 1952.
- Collett, G., A. Wood, M. Y. Alexander, B. C. Varnum, R. P. Boot-Handford, V. Ohanian, J. Ohanian, Y. W. Fridell, A. E. Canfield. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 92: 1123-9; 2003.
- Colnot, C., D. M. Romero, S. Huang, J. A. Helms. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical orthopaedics and related research*: 69-78; 2005.
- Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo, D. J. Prockop. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3213-8; 2000.
- Colter, D. C., I. Sekiya, D. J. Prockop. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7841-5; 2001.
- Conget, P. A., J. J. Minguell. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67-73; 1999.
- Cornell, C. N., J. M. Lane. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clinical orthopaedics and related research*: S267-73; 1998.
- Coulombel, L. [Adult stem cells: seing is not being]. *Med Sci (Paris)* 19: 683-94; 2003.
- Cowan, C. M., Y. Y. Shi, O. O. Aalami, Y. F. Chou, C. Mari, R. Thomas, N. Quarto, C. H. Contag, B. Wu, M. T. Longaker. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature biotechnology* 22: 560-7; 2004.
- D'Ippolito, G., S. Diabira, G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos, P. C. Schiller. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117: 2971-81; 2004.
- Dalinka, M. K., V. P. Mazzeo, Jr. Complications of radiation therapy. *Crit Rev Diagn Imaging* 23: 235-67; 1985.
- Davani, S., A. Marandin, N. Mersin, B. Royer, B. Kantelip, P. Herve, J. P. Etievent, J. P. Kantelip. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108 Suppl 1: II253-8; 2003.
- Degasne, I., M. F. Basle, V. Demais, G. Hure, M. Lesourd, B. Grolleau, L. Mercier, D. Chappard. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 64: 499-507; 1999.

- Degat, M. C., E. Ferreira, D. Logeart-Avramoglou. [Use of growth factors in the repair of bone]. *Pathol Biol (Paris)* 53: 131-41; 2005.
- Dekel, B., L. Zangi, E. Shezen, S. Reich-Zeliger, S. Eventov-Friedman, H. Katchman, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, G. Rechavi, R. Margalit, Y. Reisner. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 17: 3300-14; 2006.
- Dellavalle, A., M. Sampaolesi, R. Tonlorenzi, E. Tagliafico, B. Sacchetti, L. Perani, A. Innocenzi, B. G. Galvez, G. Messina, R. Morosetti, S. Li, M. Belicchi, G. Peretti, J. S. Chamberlain, W. E. Wright, Y. Torrente, S. Ferrari, P. Bianco, G. Cossu. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9: 255-67; 2007.
- Delloye, C. How to improve the incorporation of massive allografts? *Chir Organi Mov* 88: 335-43; 2003.
- Dennis, D. A., L. R. Little. The structural allograft composite in revision total knee arthroplasty. *Orthopedics* 28: 1005-7; 2005.
- Devine, S. M., A. M. Bartholomew, N. Mahmud, M. Nelson, S. Patil, W. Hardy, C. Sturgeon, T. Hewett, T. Chung, W. Stock, D. Sher, S. Weissman, K. Ferrer, J. Mosca, R. Deans, A. Moseley, R. Hoffman. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29: 244-55; 2001.
- Dicker, A., K. Le Blanc, G. Astrom, V. van Harmelen, C. Gotherstrom, L. Blomqvist, P. Arner, M. Ryden. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308: 283-90; 2005.
- Dickhut, A., R. Schwerdtfeger, L. Kuklick, M. Ritter, C. Thiede, A. Neubauer, C. Brendel. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84: 722-7; 2005.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis, P. V. Giannoudis. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-404; 2005.
- Docheva, D., C. Popov, W. Mutschler, M. Schieker. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 11: 21-38; 2007.
- Doherty, M. J., B. A. Ashton, S. Walsh, J. N. Beresford, M. E. Grant, A. E. Canfield. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 13: 828-38; 1998.
- Dominici, M., C. Pritchard, J. E. Garlits, T. J. Hofmann, D. A. Persons, E. M. Horwitz. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11761-6; 2004.
- Dreyfus, P. A., F. Chretien, B. Chazaud, Y. Kirova, P. Caramelle, L. Garcia, G. Butler-Browne, R. K. Gherardi. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol* 164: 773-9; 2004.
- Drusenheimer, N., G. Wulf, J. Nolte, J. H. Lee, A. Dev, R. Dressel, J. Gromoll, J. Schmidtke, W. Engel, K. Nayernia. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 69-76; 2007.

- Ducheyne, P., J. M. Cuckler. Bioactive ceramic prosthetic coatings. *Clinical orthopaedics and related research*: 102-14; 1992.
- Dumas, A., C. Gaudin-Audrain, G. Mabilieu, P. Massin, L. Hubert, M. F. Basle, D. Chappard. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials* 27: 4204-11; 2006.
- Eastlund, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell transplantation* 4: 455-77; 1995.
- Eghbali-Fatourehchi, G. Z., J. Lamsam, D. Fraser, D. Nagel, B. L. Riggs, S. Khosla. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *The New England journal of medicine* 352: 1959-66; 2005.
- Ehrler, D. M., A. R. Vaccaro. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clinical orthopaedics and related research*: 38-45; 2000.
- Einhorn, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*: S7-21; 1998.
- Ernst, D. R., R. E. Race. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 41: 193-201; 1993.
- Fages, J., A. Marty, C. Delga, J. S. Condoret, D. Combes, P. Frayssinet. Use of supercritical CO₂ for bone delipidation. *Biomaterials* 15: 650-6; 1994.
- Ferrara, J. L., H. J. Deeg. Graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 324: 667-74; 1991.
- Finney, M. R., N. J. Greco, S. E. Haynesworth, J. M. Martin, D. P. Hedrick, J. Z. Swan, D. G. Winter, S. Kadereit, M. E. Joseph, P. Fu, V. J. Pompili, M. J. Laughlin. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 585-93; 2006.
- Frame, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 38: 176-80; 1980.
- Frayssinet, P., N. Rouquet, D. Mathon, A. Autefage, J. Fages. Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO₂ implanted in sheep bones. *Biomaterials* 19: 2247-53; 1998.
- Fried, A., D. Benayahu. Dexamethasone regulation of marrow stromal-derived osteoblastic cells. *Journal of cellular biochemistry* 62: 476-83; 1996.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, U. V. Gerasimov. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20: 263-72; 1987.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, K. V. Petrakova. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16: 381-90; 1966.
- Friedlaender, G. E., D. M. Strong, K. W. Sell. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 58: 854-8; 1976.

- Friedman, R. J., Y. H. An, J. Ming, R. A. Draughn, T. W. Bauer. Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14: 455-64; 1996.
- Fu, A. L., K. M. Greven, Y. Maruyama. Radiation osteitis and insufficiency fractures after pelvic irradiation for gynecologic malignancies. *Am J Clin Oncol* 17: 248-54; 1994.
- Fukuda, K., J. Fujita. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 68: 1940-3; 2005.
- Fukumoto, T., J. W. Sperling, A. Sanyal, J. S. Fitzsimmons, G. G. Reinholz, C. A. Conover, S. W. O'Driscoll. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 55-64; 2003.
- Gahrton, G., S. Tura, P. Ljungman, B. Belanger, L. Brandt, M. Cavo, B. Chapuis, A. De Laurenzi, T. de Witte, T. Facon, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma using HLA-compatible sibling donors--an EBMT Registry Study. *Bone Marrow Transplant* 7 Suppl 2: 32; 1991.
- Galotto, M., G. Berisso, L. Delfino, M. Podesta, L. Ottaggio, S. Dallorso, C. Dufour, G. B. Ferrara, A. Abbondandolo, G. Dini, A. Bacigalupo, R. Cancedda, R. Quarto. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27: 1460-6; 1999.
- Gamradt, S. C., J. R. Lieberman. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng* 32: 136-47; 2004.
- Gerstenfeld, L. C., D. M. Cullinane, G. L. Barnes, D. T. Graves, T. A. Einhorn. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry* 88: 873-84; 2003.
- Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos, E. Tsiridis. Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3: S20-7; 2005.
- Gilsanz, V., M. E. Carlson, T. F. Roe, J. A. Ortega. Osteoporosis after cranial irradiation for acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 117: 238-44; 1990.
- Glorieux, F. H., N. J. Bishop, H. Plotkin, G. Chabot, G. Lanoue, R. Travers. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *The New England journal of medicine* 339: 947-52; 1998.
- Gojo, S., N. Gojo, Y. Takeda, T. Mori, H. Abe, S. Kyo, J. Hata, A. Umezawa. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288: 51-9; 2003.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, R. C. Mulligan. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-806; 1996.
- Gorustovich, A. A., A. J. Monserrat, M. B. Guglielmotti, R. L. Cabrini. Effects of intraosseous implantation of silica-based bioactive glass particles on rat kidney under experimental renal failure. *J Biomater Appl* 21: 431-42; 2007.
- Govender, S., C. Csimma, H. K. Genant, A. Valentin-Opran, Y. Amit, R. Arbel, H. Aro, D. Atar, M. Bishay, M. G. Borner, P. Chiron, P. Choong, J. Cinats, B.

- Courtenay, R. Feibel, B. Geulette, C. Gravel, N. Haas, M. Raschke, E. Hammacher, D. van der Velde, P. Hardy, M. Holt, C. Josten, R. L. Ketterl, B. Lindeque, G. Lob, H. Mathevon, G. McCoy, D. Marsh, R. Miller, E. Munting, S. Oevre, L. Nordsletten, A. Patel, A. Pohl, W. Rennie, P. Reynders, P. M. Rommens, J. Rondia, W. C. Rossouw, P. J. Daneel, S. Ruff, A. Ruter, S. Santavirta, T. A. Schildhauer, C. Gekle, R. Schnettler, D. Segal, H. Seiler, R. B. Snowdowne, J. Stapert, G. Taglang, R. Verdonk, L. Vogels, A. Weckbach, A. Wentzensen, T. Wisniewski. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 2123-34; 2002.
- Graham, N. M., I. Stockley. The use of structural proximal femoral allografts in complex revision hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 86: 337-43; 2004.
- Grant, M. B., W. S. May, S. Caballero, G. A. Brown, S. M. Guthrie, R. N. Mames, B. J. Byrne, T. Vaught, P. E. Spoerri, A. B. Peck, E. W. Scott. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8: 607-12; 2002.
- Grigoriadis, A. E., J. N. Heersche, J. E. Aubin. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106: 2139-51; 1988.
- Gronthos, S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet* 364: 735-6; 2004.
- Guillemin, G., J. L. Patat, J. Fournie, M. Chetail. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res* 21: 557-67; 1987.
- Hale, G. A. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 835-46; 2005.
- Hatton, J. D., L. Lin. Demonstration of specific neuronal cell groups in rat brain by beta-galactosidase enzyme histochemistry. *Journal of neuroscience methods* 45: 147-53; 1992.
- Heim, R., D. C. Prasher, R. Y. Tsien. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12501-4; 1994.
- Hoffstetter, S., C. Marchal, P. Bordigoni. [Total body irradiation in France in the past twenty years]. *Cancer Radiother* 7: 166-71; 2003.
- Hollinger, J. O., G. C. Battistone. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clinical orthopaedics and related research*: 290-305; 1986.
- Hopewell, J. W. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 41: 208-11; 2003.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, T. Hofmann. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 8932-7; 2002.

- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz, M. K. Brenner. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309-13; 1999.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, P. L. Gordon, W. W. Koo, L. A. Fitzpatrick, M. D. Neel, M. E. McCarville, P. J. Orchard, R. E. Pyeritz, M. K. Brenner. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97: 1227-31; 2001.
- Hou, Z., Q. Nguyen, B. Frenkel, S. K. Nilsson, M. Milne, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, P. Quesenberry, J. B. Lian, G. S. Stein. Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells: implications for skeletal gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7294-9; 1999.
- Hu, W., C. L. Cheng. Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Lett* 369: 331-4; 1995.
- Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 432-63; 2002.
- Ichioka, N., M. Inaba, T. Kushida, T. Esumi, K. Takahara, K. Inaba, R. Ogawa, H. Iida, S. Ikehara. Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 20: 542-51; 2002.
- Ikehara, S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: a new strategy for treatment of stem cell disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 626-34; 2005.
- Im, G. I., Y. W. Shin, K. B. Lee. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13: 845-53; 2005.
- Jackson, K. A., S. M. Majka, H. Wang, J. Pocius, C. J. Hartley, M. W. Majesky, M. L. Entman, L. H. Michael, K. K. Hirschi, M. A. Goodell. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107: 1395-402; 2001.
- Jansen, J., S. Hanks, J. M. Thompson, M. J. Dugan, L. P. Akard. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med* 9: 37-50; 2005.
- Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical orthopaedics and related research*: 259-78; 1981.
- Jensen, G. S., C. Drapeau. The use of in situ bone marrow stem cells for the treatment of various degenerative diseases. *Med Hypotheses* 59: 422-8; 2002.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, C. M. Verfaillie. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-9; 2002.
- Jiang, Y., B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes, C. M. Verfaillie. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30: 896-904; 2002.

- Jones, E. A., A. English, K. Henshaw, S. E. Kinsey, A. F. Markham, P. Emery, D. McGonagle. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 817-27; 2004.
- Kadowaki, A., T. Tsukazaki, K. Hirata, Y. Shibata, Y. Okubo, K. Bessho, T. Komori, N. Yoshida, A. Yamaguchi. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone* 34: 993-1003; 2004.
- Kalajzic, I., Z. Kalajzic, M. Kaliterna, G. Gronowicz, S. H. Clark, A. C. Lichtler, D. Rowe. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res* 17: 15-25; 2002.
- Kalra, S., R. J. Grimer, D. Spooner, S. R. Carter, R. M. Tillman, A. Abudu. Radiation-induced sarcomas of bone: factors that affect outcome. *J Bone Joint Surg Br* 89: 808-13; 2007.
- Kananen, K., L. Volin, R. Tahtela, K. Laitinen, T. Ruutu, M. J. Valimaki. Recovery of bone mass and normalization of bone turnover in long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29: 33-9; 2002.
- Kang, W. J., H. J. Kang, H. S. Kim, J. K. Chung, M. C. Lee, D. S. Lee. Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 47: 1295-301; 2006.
- Karageorgiou, V., D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26: 5474-91; 2005.
- Kassem, M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 6: 369-74; 2004.
- Katagiri, T., N. Takahashi. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 8: 147-59; 2002.
- Keith, J. D., Jr. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 24: 11-7; 2004.
- Kerschan-Schindl, K., M. Mitterbauer, W. Fureder, S. Kudlacek, S. Grampp, C. Bieglmayer, V. Fialka-Moser, P. Pietschmann, P. Kalhs. Bone metabolism in patients more than five years after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34: 491-6; 2004.
- Khan, S. N., F. P. Cammisa, Jr., H. S. Sandhu, A. D. Diwan, F. P. Girardi, J. M. Lane. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13: 77-86; 2005.
- Khan, S. N., H. S. Sandhu, H. K. Parvataneni, F. P. Girardi, F. P. Cammisa, Jr. Bone graft substitutes in spine surgery. *Bull Hosp Jt Dis* 59: 5-10; 2000.
- Kim, S. H., J. W. Shin, S. A. Park, Y. K. Kim, M. S. Park, J. M. Mok, W. I. Yang, J. W. Lee. Chemical, structural properties, and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. *Journal of biomedical materials research* 68: 69-74; 2004.

- Kimelman, N., G. Pelled, G. A. Helm, J. Huard, E. M. Schwarz, D. Gazit. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng* 13: 1135-50; 2007.
- Kneser, U., L. Stangenberg, J. Ohnolz, O. Buettner, J. Stern-Straeter, D. Mobest, R. E. Horch, G. B. Stark, D. J. Schaefer. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med* 10: 695-707; 2006.
- Knothe Tate, M. L., J. R. Adamson, A. E. Tami, T. W. Bauer. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1-8; 2004.
- Koc, O. N., J. Day, M. Nieder, S. L. Gerson, H. M. Lazarus, W. Krivit. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30: 215-22; 2002.
- Kofron, M. D., C. T. Laurencin. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 555-76; 2006.
- Koike, M., H. Shimokawa, Z. Kanno, K. Ohya, K. Soma. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Miner Metab* 23: 219-25; 2005.
- Kokovay, E., L. Li, L. A. Cunningham. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 545-55; 2006.
- Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry* 99: 1233-9; 2006.
- Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, S. J. Sharkis. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-77; 2001.
- Kremens, B., O. Basu, H. Grosse-Wilde, W. Sauerwein, U. W. Schaefer, W. Havers. Transplantation of CD34-enriched peripheral stem cells from an HLA-haplotype mismatched donor to a patient with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 27: 111-3; 2001.
- Kroger, H., E. Soppi, N. Loveridge. Growth hormone, osteoblasts, and marrow adipocytes: a case report. *Calcif Tissue Int* 61: 33-5; 1997.
- Kruyt, M. C., W. J. Dhert, C. Oner, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout, J. D. de Bruijn. Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J Biomed Mater Res* 69B: 113-20; 2004.
- Kucia, M., J. Ratajczak, M. Z. Ratajczak. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol Cell* 97: 133-46; 2005.
- Kushida, T., M. Inaba, H. Hisha, N. Ichioka, T. Esumi, R. Ogawa, H. Iida, S. Ikehara. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97: 3292-9; 2001.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, P. G. Robey. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153: 1133-40; 2001.

- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, P. G. Robey. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 70: 1780-7; 2000.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, M. Grompe. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6: 1229-34; 2000.
- Lakshmiathy, U., C. Verfaillie. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 19: 29-38; 2005.
- Langer, R., J. P. Vacanti. Tissue engineering. *Science* 260: 920-6; 1993.
- Laschke, M. W., K. Witt, T. Pohlemann, M. D. Menger. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *Journal of biomedical materials research* 82: 494-505; 2007.
- Lazarus, H. M., O. N. Koc, S. M. Devine, P. Curtin, R. T. Maziarz, H. K. Holland, E. J. Shpall, P. McCarthy, K. Atkinson, B. W. Cooper, S. L. Gerson, M. J. Laughlin, F. R. Loberiza, Jr., A. B. Moseley, A. Bacigalupo. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 389-98; 2005.
- Le Blanc, K., H. Samuelsson, B. Gustafsson, M. Remberger, B. Sundberg, J. Arvidson, P. Ljungman, H. Lonnies, S. Nava, O. Ringden. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 21: 1733-8; 2007.
- Le Blanc, K., C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg, O. Ringden. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890-6; 2003.
- Le Nihouannen, D., E. Goyenvalle, E. Aguado, P. Pilet, M. Bilban, G. Daculsi, P. Layrolle. Hybrid composites of calcium phosphate granules, fibrin glue, and bone marrow for skeletal repair. *J Biomed Mater Res A* 81: 399-408; 2007.
- Lee, J. Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, A. Usas, C. Gates, P. Robbins, A. Wernig, J. Huard. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150: 1085-100; 2000.
- Lee, W. Y., S. W. Cho, E. S. Oh, K. W. Oh, J. M. Lee, K. H. Yoon, M. I. Kang, B. Y. Cha, K. W. Lee, H. Y. Son, S. K. Kang, C. C. Kim. The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 329-35; 2002.
- Lerouge, S., O. Huk, L. Yahia, J. Witvoet, L. Sedel. Ceramic-ceramic and metal-polyethylene total hip replacements: comparison of pseudomembranes after loosening. *J Bone Joint Surg Br* 79: 135-9; 1997.
- Lexer, E. Free Transplantation. *Ann Surg* 60: 166-94; 1914.
- Li, J., D. L. Kwong, G. C. Chan. The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplant* 11: 379-87; 2007.

- Little, J. B. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 7: 337-52; 1993.
- Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen, N. J. Ke. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and biophysical research communications* 260: 712-7; 1999.
- Long, X., M. Olszewski, W. Huang, M. Kletzel. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 65-9; 2005.
- Lu, L., C. Zhao, Y. Liu, X. Sun, C. Duan, M. Ji, H. Zhao, Q. Xu, H. Yang. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Protoc* 15: 46-51; 2005.
- Majumdar, M. K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W. B. Hardy, M. A. Moorman, K. R. McIntosh, J. D. Mosca. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 10: 228-41; 2003.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman, S. L. Gerson. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176: 57-66; 1998.
- Mak, G. W., C. H. Wong, S. K. Tsui. Green fluorescent protein induces the secretion of inflammatory cytokine interleukin-6 in muscle cells. *Analytical biochemistry* 362: 296-8; 2007.
- Malik, P. Gene therapy for hemoglobinopathies using autologous hematopoietic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25: 1085-88; 2007.
- Marcacci, M., E. Kon, V. Moukhachev, A. Lavroukov, S. Kutepov, R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 13: 947-55; 2007.
- Marie, p. différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Sciences*; 2001.
- Martin, R. B., M. W. Chapman, N. A. Sharkey, S. L. Zissimos, B. Bay, E. C. Shors. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1 yr after implantation. *Biomaterials* 14: 341-8; 1993.
- Massin, P., D. Chappard, B. Flautre, P. Hardouin. Migration of polyethylene particles around nonloosened cemented femoral components from a total hip arthroplasty-an autopsy study. *Journal of biomedical materials research* 69: 205-15; 2004.
- Mauney, J. R., S. Sjöström, J. Blumberg, R. Horan, J. P. O'Leary, G. Vunjak-Novakovic, V. Volloch, D. L. Kaplan. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif Tissue Int* 74: 458-68; 2004.
- McKay, B., H. S. Sandhu. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine* 27: S66-85; 2002.
- McKinney-Freeman, S. L., K. A. Jackson, F. D. Camargo, G. Ferrari, F. Mavilio, M. A. Goodell. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 1341-6; 2002.

- McMurray, G. N. The evaluation of Kiel bone in spinal fusions. *J Bone Joint Surg Br* 64: 101-4; 1982.
- Mellonig, J. T., A. B. Prewett, M. P. Moyer. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 63: 979-83; 1992.
- Melo, H., C. Brandao, G. Rego, R. Nunes. Ethical and legal issues in xenotransplantation. *Bioethics* 15: 427-42; 2001.
- Mendes, S. C., M. Sleijster, A. Van Den Muysenberg, J. D. De Bruijn, C. A. Van Blitterswijk. A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach. *J Mater Sci Mater Med* 13: 575-81; 2002.
- Miro, C., R. Orecchia. Osteoporosis, risk of radiation-induced fracture, and quality of life. *Lancet* 360: 1429; 2002.
- Moore, K. A., I. R. Lemischka. Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-5; 2006.
- Moreau, M. F., D. Chappard, E. Aguado, F. Grizon, G. Hure, M. F. Baslé. Cicatrisation osseuse: comparaison entre consolidation péri-fracturaire et remodelage péri-implantaire. *implantologie nov*: 207-8; 2003.
- Moreau, M. F., Y. Gallois, M. F. Baslé, D. Chappard. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 21: 369-76; 2000.
- Morishita, T., K. Honoki, H. Ohgushi, N. Kotobuki, A. Matsushima, Y. Takakura. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 30: 115-8; 2006.
- Mosca, J. D., J. K. Hendricks, D. Buyaner, J. Davis-Sproul, L. C. Chuang, M. K. Majumdar, R. Chopra, F. Barry, M. Murphy, M. A. Thiede, U. Junker, R. J. Rigg, S. P. Forestell, E. Bohnlein, R. Storb, B. M. Sandmaier. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clinical orthopaedics and related research*: S71-90; 2000.
- Murray, E., D. Provvedini, D. Curran, B. Catherwood, H. Sussman, S. Manolagas. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res* 2: 231-8; 1987.
- Muschler, G. F., C. Nakamoto, L. G. Griffith. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 1541-58; 2004.
- Muschler, G. F., H. Nitto, C. A. Boehm, K. A. Easley. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19: 117-25; 2001.
- Nakahara, H., S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, J. J. Holecek, M. A. Baber, V. M. Goldberg, A. I. Caplan. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11: 181-8; 1990.
- Naylor, C. S., E. Jaworska, K. Branson, M. J. Embleton, R. Chopra. Side population/ABCG2-positive cells represent a heterogeneous group of haemopoietic cells: implications for the use of adult stem cells in transplantation and plasticity protocols. *Bone Marrow Transplant* 35: 353-60; 2005.
- Negrin, R. S., K. Atkinson, T. Leemhuis, E. Hanania, C. Juttner, K. Tierney, W. W. Hu, L. J. Johnston, J. A. Shizurn, K. E. Stockerl-Goldstein, K. G. Blume, I. L.

- Weissman, S. Bower, R. Baynes, R. Dansey, C. Karanes, W. Peters, J. Klein. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 6: 262-71; 2000.
- Niklason, L. E. Engineering of bone grafts. *Nature biotechnology* 18: 929-30; 2000.
- Nilsson, S. K., M. S. Dooner, H. U. Weier, B. Frenkel, J. B. Lian, G. S. Stein, P. J. Quesenberry. Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. *J Exp Med* 189: 729-34; 1999.
- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, G. A. Whitty, B. Williams, R. J. Webb, D. T. Denhardt, I. Bertocello, L. J. Bendall, P. J. Simmons, D. N. Haylock. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106: 1232-9; 2005.
- Nordsletten, L. Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery. *Curr Med Res Opin* 22 Suppl 1: S13-7; S23; 2006.
- Noshi, T., T. Yoshikawa, M. Ikeuchi, Y. Dohi, H. Ohgushi, K. Horiuchi, M. Sugimura, K. Ichijima, K. Yonemasu. Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 52: 621-30; 2000.
- O'Shaughnessy, J. A., K. H. Cowan, A. W. Nienhuis, K. T. McDonagh, B. P. Sorrentino, C. E. Dunbar, Y. Chiang, W. Wilson, B. Goldspiel, D. Kohler, et al. Retroviral mediated transfer of the human multidrug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hum Gene Ther* 5: 891-911; 1994.
- Ogawa, R., H. Mizuno, A. Watanabe, M. Migita, T. Shimada, H. Hyakusoku. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications* 313: 871-7; 2004.
- Ohgushi, H., A. I. Caplan. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 48: 913-27; 1999.
- Ohnishi, S., H. Ohgushi, S. Kitamura, N. Nagaya. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int J Hematol* 86: 17-21; 2007.
- Ohshima, M., S. K. Jung, T. Yasuda, Y. Sakano, D. Fujimoto. Active oxygen-induced modification alters properties of collagen as a substratum for fibroblasts. *Matrix* 13: 187-94; 1993.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, Y. Nishimune. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-9; 1997.
- Olmsted-Davis, E. A., Z. Gugala, F. Camargo, F. H. Gannon, K. Jackson, K. A. Kienstra, H. D. Shine, R. W. Lindsey, K. K. Hirschi, M. A. Goodell, M. K. Brenner, A. R. Davis. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15877-82; 2003.
- Ono, K., T. Takii, K. Onozaki, M. Ikawa, M. Okabe, M. Sawada. Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochemical and biophysical research communications* 262: 610-4; 1999.

- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, P. Anversa. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-5; 2001.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, H. Nakauchi. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-5; 1996.
- Ozeki, N., P. Jethanandani, H. Nakamura, B. L. Ziober, R. H. Kramer. Modulation of satellite cell adhesion and motility following BMP2-induced differentiation to osteoblast lineage. *Biochemical and biophysical research communications* 353: 54-9; 2007.
- Ozsahin, M., F. Pene, E. Touboul, B. Gindrey-Vie, C. Dominique, D. Lefkopoulos, C. Krzisch, J. Balosso, L. Vitu, L. H. Schwartz, et al. Total-body irradiation before bone marrow transplantation. Results of two randomized instantaneous dose rates in 157 patients. *Cancer* 69: 2853-65; 1992.
- Pascaretti-Grizon, F., C. Gaudin-Audrain, Y. Gallois, N. Retillaud-Gaborit, M. F. Baslé, D. Chappard. Osteopontin is an argentophilic protein in the bone matrix and in cells of kidney convoluted tubules. *Morphologie*; 2007.
- Peattie, R. A., A. P. Nayate, M. A. Firpo, J. Shelby, R. J. Fisher, G. D. Prestwich. Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials* 25: 2789-98; 2004.
- Peault, B., M. Rudnicki, Y. Torrente, G. Cossu, J. P. Tremblay, T. Partridge, E. Gussoni, L. M. Kunkel, J. Huard. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 15: 867-77; 2007.
- Pederson, W. C., D. W. Person. Long bone reconstruction with vascularized bone grafts. *Orthop Clin North Am* 38: 23-35, v; 2007.
- Pelosi, E., M. Valtieri, S. Coppola, R. Botta, M. Gabbianelli, V. Lulli, G. Marziali, B. Masella, R. Muller, C. Sgadari, U. Testa, G. Bonanno, C. Peschle. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 100: 3203-8; 2002.
- Pereira, R. F., M. D. O'Hara, A. V. Laptev, K. W. Halford, M. D. Pollard, R. Class, D. Simon, K. Livezey, D. J. Prockop. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1142-7; 1998.
- Perry, C. R. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical orthopaedics and related research* 360: 71-86; 1999.
- Peters, K. G., P. S. Rao, B. S. Bell, L. A. Kindman. Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 171: 252-7; 1995.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, J. P. Goff. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-70; 1999.
- Peterson, L. Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthop Belg* 62 Suppl 1: 196-200; 1996.

- Petite, H., V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, G. Guillemain. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology* 18: 959-63; 2000.
- Phillips, J. E., C. A. Gersbach, A. J. Garcia. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials* 28: 211-29; 2007.
- Phinney, D. G., G. Kopen, R. L. Isaacson, D. J. Prockop. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 72: 570-85; 1999.
- Phinney, D. G., G. Kopen, W. Righter, S. Webster, N. Tremain, D. J. Prockop. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry* 75: 424-36; 1999.
- Piersma, A. H., R. E. Ploemacher, K. G. Brockbank. Radiation damage to femoral hemopoietic stroma measured by implant regeneration and quantitation of fibroblastic progenitors. *Exp Hematol* 11: 884-90; 1983.
- Pittenger, M., P. Vanguri, D. Simonetti, R. Young. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2: 309-20; 2002.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7; 1999.
- Pittenger, M. F., B. J. Martin. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95: 9-20; 2004.
- Potten, C. S., M. Loeffler. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-20; 1990.
- Pountos, I., P. V. Giannoudis. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36 Suppl 3: S8-S12; 2005.
- Probert, J. C., B. R. Parker. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 114: 155-62; 1975.
- Puelacher, W. C., S. W. Kim, J. P. Vacanti, B. Schloo, D. Mooney, C. A. Vacanti. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23: 49-53; 1994.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, M. Marcacci. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine* 344: 385-6; 2001.
- Rafii, S., F. Shapiro, J. Rimarachin, R. L. Nachman, B. Ferris, B. Weksler, M. A. Moore, A. S. Asch. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 84: 10-9; 1994.
- Rajantie, I., M. Ilmonen, A. Alminaitte, U. Ozerdem, K. Alitalo, P. Salven. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104: 2084-6; 2004.

- Rappeport, J. M., E. I. Ginns. Bone-marrow transplantation in severe Gaucher's disease. *The New England journal of medicine* 311: 84-8; 1984.
- Reddi, A. H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature biotechnology* 16: 247-52; 1998.
- Reya, T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog Horm Res* 58: 283-95; 2003.
- Reya, T., A. W. Duncan, L. Ailles, J. Domen, D. C. Scherer, K. Willert, L. Hintz, R. Nusse, I. L. Weissman. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409-14; 2003.
- Reyes, C. D., T. A. Petrie, K. L. Burns, Z. Schwartz, A. J. Garcia. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 28: 3228-35; 2007.
- Reyes, M., A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P. H. Marker, C. M. Verfaillie. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109: 337-46; 2002.
- Robey, P. G., N. S. Fedarko, T. E. Hefferan, P. Bianco, U. K. Vetter, W. Grzesik, A. Friedenstein, G. Van der Pluijm, K. P. Mintz, M. F. Young, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2: S483-7; 1993.
- Rocha, V., E. Gluckman. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 34-41; 2006.
- Ross, N., L. Tacconi, J. B. Miles. Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg* 14: 476-9; 2000.
- Rowe, D. W. Viewing problems in bone biology from the perspective of lineage identification. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 350-2; 2005.
- Salingcarnboriboon, R., H. Yoshitake, K. Tsuji, M. Obinata, T. Amagasa, A. Nifuji, M. Noda. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287: 289-300; 2003.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, M. Dailey, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, S. Saporta, T. Zigova, P. R. Sanberg, E. Y. Snyder. The X-gal caution in neural transplantation studies. *Cell transplantation* 9: 657-67; 2000.
- Sanchez-Ramos, J. R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69: 880-93; 2002.
- Sandhu, H. S., H. S. Grewal, H. Parvataneni. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 30: 685-98; 1999.
- Sauvageau, G., N. N. Iscove, R. K. Humphries. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23: 7223-32; 2004.
- Savostin-Asling, I., S. Silverman, Jr. Effects of therapeutic radiation on microstructure of the human mandible. *Am J Anat* 151: 295-305; 1978.
- Schatteman, G. C., M. Dunnwald, C. Jiao. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1-18; 2007.

- Schimming, R., R. Schmelzeisen. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 724-9; 2004.
- Schmalzried, T. P., M. Jasty, W. H. Harris. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* 74: 849-63; 1992.
- Schmidmaier, G., B. Wildemann, J. Heeger, T. Gabelein, A. Flyvbjerg, H. J. Bail, M. Raschke. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1. *Bone* 31: 165-72; 2002.
- Schmitz, J. P., J. O. Hollinger. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*: 299-308; 1986.
- Schmitz, J. P., Z. Schwartz, J. O. Hollinger, B. D. Boyan. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta anatomica* 138: 185-92; 1990.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu, C. M. Verfaillie. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109: 1291-302; 2002.
- Seiler, J. G., 3rd, J. Johnson. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 9: 91-7; 2000.
- Serafini, M., S. J. Dylla, M. Oki, Y. Heremans, J. Tolar, Y. Jiang, S. M. Buckley, B. Pelacho, T. C. Burns, S. Frommer, D. J. Rossi, D. Bryder, A. Panoskaltsis-Mortari, M. J. O'Shaughnessy, M. Nelson-Holte, G. C. Fine, I. L. Weissman, B. R. Blazar, C. M. Verfaillie. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 204: 129-39; 2007.
- Shao, X. X., D. W. Hutmacher, S. T. Ho, J. C. Goh, E. H. Lee. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 27: 1071-80; 2006.
- Shin, H., S. Jo, A. G. Mikos. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4353-64; 2003.
- Shors, E. C. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 30: 599-613; 1999.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, W. J. Boyle. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-19; 1997.
- Soloviev, A., E. M. Schwarz, D. V. Kuprash, S. A. Nedospasov, J. E. Puzas, R. N. Rosier, R. J. O'Keefe. The role of p105 protein in NFkappaB activation in ANA-1 murine macrophages following stimulation with titanium particles. *J Orthop Res* 20: 714-22; 2002.

- Song, S., A. J. Ewald, W. Stallcup, Z. Werb, G. Bergers. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 7: 870-9; 2005.
- Speirs, A. D., M. A. Hotz, T. R. Oxland, R. Hausler, L. P. Nolte. Biomechanical properties of sterilized human auditory ossicles. *J Biomech* 32: 485-91; 1999.
- Stamm, C., B. Westphal, H. D. Kleine, M. Petzsch, C. Kittner, H. Klinge, C. Schumichen, C. A. Nienaber, M. Freund, G. Steinhoff. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-6; 2003.
- Standal, T., M. Borset, A. Sundan. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental oncology* 26: 179-84; 2004.
- Stangenberg, L., D. J. Schaefer, O. Buettner, J. Ohnolz, D. Mobest, R. E. Horch, G. B. Stark, U. Kneser. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng* 11: 855-64; 2005.
- Stevenson, S., S. E. Emery, V. M. Goldberg. Factors affecting bone graft incorporation. *Clinical orthopaedics and related research*: 66-74; 1996.
- Stier, S., Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grunewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L. M. Calvi, S. R. Rittling, D. T. Scadden. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201: 1781-91; 2005.
- Stock, U. A., J. P. Vacanti. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 52: 443-51; 2001.
- Strong, D. M., G. E. Friedlaender, W. W. Tomford, D. S. Springfield, T. C. Shives, H. Burchardt, W. F. Enneking, H. J. Mankin. Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clinical orthopaedics and related research*: 107-14; 1996.
- Sugimoto, M., S. Takahashi, Y. Kotoura, Y. Shibamoto, M. Takahashi, M. Abe, K. Ishizaki, T. Yamamuro. Osteocyte viability after high-dose irradiation in the rabbit. *Clinical orthopaedics and related research*: 247-52; 1993.
- Suzuki, H., M. Hayakawa, K. Kobayashi, H. Takiguchi, Y. Abiko. H₂O₂-derived free radicals treated fibronectin substratum reduces the bone nodule formation of rat calvarial osteoblast. *Mech Ageing Dev* 98: 113-25; 1997.
- Swenson, C. L., S. P. Arnoczky. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 323-32; 2003.
- Swiontkowski, M. F., H. T. Aro, S. Donell, J. L. Esterhai, J. Goulet, A. Jones, P. J. Kregor, L. Nordsletten, G. Paiement, A. Patel. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 88: 1258-65; 2006.
- Taguchi, Y., M. Yamamoto, T. Yamate, S. C. Lin, H. Mocharla, P. DeTogni, N. Nakayama, B. F. Boyce, E. Abe, S. C. Manolagas. Interleukin-6-type cytokines

- stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc Assoc Am Physicians* 110: 559-74; 1998.
- Takahashi, S., M. Sugimoto, Y. Kotoura, K. Sasai, M. Oka, T. Yamamuro. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation. An ultrastructural and quantitative histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 76: 722-38; 1994.
- Tatebe, M., R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytotherapy* 7: 520-30; 2005.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, T. Murohara, U. Ikeda, S. Shintani, H. Masaki, K. Amano, Y. Kishimoto, K. Yoshimoto, H. Akashi, K. Shimada, T. Iwasaka, T. Imaizumi. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-35; 2002.
- Thomas, E. D., R. Storb. Technique for human marrow grafting. *Blood* 36: 507-15; 1970.
- Thorgeirsson, S. S., J. W. Grisham. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 43: 2-8; 2006.
- Tolar, J., C. Bonfim, S. Grewal, P. Orchard. Engraftment and survival following hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 38: 783-7; 2006.
- Toma, C., M. F. Pittenger, K. S. Cahill, B. J. Byrne, P. D. Kessler. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93-8; 2002.
- Tropel, P., D. Noel, N. Platet, P. Legrand, A. L. Benabid, F. Berger. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295: 395-406; 2004.
- Turonis, J. W., J. C. McPherson, 3rd, M. F. Cuenin, S. D. Hokett, M. E. Peacock, M. Sharawy. The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical-sized defect in the *Rattus norvegicus* calvarium. *J Oral Implantol* 32: 55-62; 2006.
- Ueda, Y., M. Inaba, K. Takada, J. Fukui, Y. Sakaguchi, M. Tsuda, M. Omae, T. Kushida, H. Iida, S. Ikehara. Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25: 1356-63; 2007.
- Usas, A., J. Huard. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials* 28: 5401-6; 2007.
- Vacanti, C. A., L. J. Bonassar, M. P. Vacanti, J. Shufflebarger. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *The New England journal of medicine* 344: 1511-4; 2001.
- Vacanti, C. A., J. P. Vacanti. Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaryngol Clin North Am* 27: 263-76; 1994.
- van Laar, J. M., A. Tyndall. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology (Oxford)* 45: 1187-93; 2006.

- van Leeuwen, J. P., M. van Driel, G. J. van den Bemd, H. A. Pols. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11: 199-226; 2001.
- Van Vlasselaer, P., N. Falla, H. Snoeck, E. Mathieu. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 84: 753-63; 1994.
- VandeVord, P. J., S. Nasser, P. H. Wooley. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* 23: 1059-64; 2005.
- Vastel, L., A. Meunier, H. Siney, L. Sedel, J. P. Courpied. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials* 25: 2105-10; 2004.
- Verfaillie, C. M. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 265: 55-61; discussion 61-5, 92-7; 2005.
- Vose, J. M., P. J. Bierman, J. C. Lynch, K. Atkinson, C. Juttner, C. E. Hanania, G. Bociek, J. O. Armitage. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with recurrent indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 7: 680-7; 2001.
- Vriesendorp, H. M. Aims of conditioning. *Exp Hematol* 31: 844-54; 2003.
- Wang, S., T. Hazelrigg. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-03; 1994.
- Warnke, P. H., I. N. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, H. Eufinger, M. Wehmoller, P. A. Russo, H. Bolte, E. Sherry, E. Behrens, H. Terheyden. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364: 766-70; 2004.
- Warnke, P. H., J. Wiltfang, I. Springer, Y. Acil, H. Bolte, M. Kosmahl, P. A. Russo, E. Sherry, U. Lutzen, S. Wolfart, H. Terheyden. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27: 3163-7; 2006.
- Watanabe, K., A. Hishiya. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol Aspects Med* 26: 221-31; 2005.
- Webb, J. C., R. F. Spencer. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* 89: 851-7; 2007.
- Weilbaecher, K. N. Mechanisms of osteoporosis after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 6: 165-74; 2000.
- Weinreb, M., A. Grosskopf, N. Shir. The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype. *Am J Physiol* 276: E376-83; 1999.
- Wenger, A., A. Stahl, H. Weber, G. Finkenzeller, H. G. Augustin, G. B. Stark, U. Kneser. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 10: 1536-47; 2004.
- Wennerberg, A., T. Albrektsson, B. Andersson, J. J. Krol. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 6: 24-30; 1995.

- Wennerberg, A., A. Ide-Ektessabi, S. Hatkamata, T. Sawase, C. Johansson, T. Albrektsson, A. Martinelli, U. Sodervall, H. Odellius. Titanium release from implants prepared with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 15: 505-12; 2004.
- Wheeler, D. L., W. F. Enneking. Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clinical orthopaedics and related research*: 36-42; 2005.
- Wilson, J., S. B. Low. Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the Patus monkey. *J Appl Biomater* 3: 123-9; 1992.
- Winn, S. R., H. Uludag, J. O. Hollinger. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clinical orthopaedics and related research*: S95-106; 1999.
- Winter, A., S. Breit, D. Parsch, K. Benz, E. Steck, H. Hauner, R. M. Weber, V. Ewerbeck, W. Richter. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418-29; 2003.
- Wollert, K. C., G. P. Meyer, J. Lotz, S. Ringes-Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, D. Messinger, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser, H. Drexler. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364: 141-8; 2004.
- Yamamoto, M., Y. Takahashi, Y. Tabata. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng* 12: 1305-11; 2006.
- Yamaoka, H., H. Asato, T. Ogasawara, S. Nishizawa, T. Takahashi, T. Nakatsuka, I. Koshima, K. Nakamura, H. Kawaguchi, U. I. Chung, T. Takato, K. Hoshi. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78: 1-11; 2006.
- Yamasaki, T., M. Deie, R. Shinomiya, Y. Izuta, Y. Yasunaga, S. Yanada, P. Sharman, M. Ochi. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res A* 75: 23-30; 2005.
- Yang, M., E. Baranov, X. M. Li, J. W. Wang, P. Jiang, L. Li, A. R. Moossa, S. Penman, R. M. Hoffman. Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 2616-21; 2001.
- Yang, W. S., J. K. Ko, S. O. Park, H. Y. Choi, Y. N. Kim, C. W. Kim. C-terminal region of Bfl-1 induces cell death that accompanies caspase activation when fused with GFP. *Journal of cellular biochemistry* 94: 1234-47; 2005.
- Ying, Q. L., J. Nichols, E. P. Evans, A. G. Smith. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-8; 2002.
- Yoshimoto, M., T. Shinohara, T. Heike, M. Shiota, M. Kanatsu-Shinohara, T. Nakahata. Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicates the presence of a niche. *Exp Hematol* 31: 733-40; 2003.
- Young, H. E., T. A. Steele, R. A. Bray, J. Hudson, J. A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P. A. Lucas, A. C. Black, Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective

- tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264: 51-62; 2001.
- Yuan, J., L. Cui, W. J. Zhang, W. Liu, Y. Cao. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 28: 1005-13; 2007.
- Yuehuei, H., R. J. Friedman, Eds. (1999). Animal models in orthopaedic research, CCR Press LLC.
- Zambrowicz, B. P., A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr, P. Soriano. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3789-94; 1997.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, L. Li. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-41; 2003.
- Zhang, X. S., T. A. Linkhart, S. T. Chen, H. Peng, J. E. Wergedal, G. G. Gutierrez, M. H. Sheng, K. H. Lau, D. J. Baylink. Local ex vivo gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *J Gene Med* 6: 4-15; 2004.
- Zhao, L. R., W. M. Duan, M. Reyes, C. D. Keene, C. M. Verfaillie, W. C. Low. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11-20; 2002.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, B. P. Sorrentino. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7: 1028-34; 2001.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, M. H. Hedrick. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-28; 2001.
- zur Nieden, N. I., G. Kempka, H. J. Ahr. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71: 18-27; 2003.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger, R. N. Maini. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2: 477-88; 2000.

RÉSUMÉ: Différentes stratégies associant des cellules médullaires et/ou des biomatériaux ont été étudiées pour la réparation du tissu osseux dans des modèles murins. Nous avons montré que H₂O₂ et NaOH, produits utilisés dans les procédés de purification industriels de greffons osseux allogéniques, induisent une détérioration matricielle de surface, diminuant l'adhésion, la prolifération et l'activité de cellules ostéoblastiques. NaHCO₃ est apparu comme un agent nettoyant efficace, sans conséquences sur la qualité des greffons et leur cytocompatibilité. Des matrices osseuses ainsi purifiées ont été utilisées comme support pour la réparation par ingénierie tissulaire d'un défaut crânien de taille critique chez la souris. La construction cellules médullaires/matrice, élaborée *in vitro*, a induit *in vivo* une régénération osseuse rapide jusqu'au centre du déficit. L'induction de la différenciation ostéoblastique des cellules avant leur implantation n'a pas amélioré nos résultats. Une autre thérapie cellulaire ayant été étudiée est la transplantation systémique de cellules médullaires. L'irradiation corporelle totale et la transplantation ont induit une perte osseuse trabéculaire dramatique. Les cellules transplantées n'ont pas permis la restauration de la masse osseuse mais ont reconstitué un microenvironnement ayant modifié la microarchitecture des receveurs vers un phénotype donneur. Pour ces deux dernières études les cellules médullaires sont issues de souris transgéniques pour la GFP, permettant le suivi des cellules après implantation. L'immunodéplétion des cellules médullaires possédant le CD11b a permis d'enrichir fortement la population cellulaire en ostéoprogéniteurs.

TITLE: Bone marrow cells and biomaterials for the repair of bone tissue

ABSTRACT: Various strategies using bone marrow cells and/or biomaterials were studied for the repair of bone tissue in murine models. Among allogenic bone grafts industrially produced, some associate H₂O₂ and NaOH in the purification process. However, we showed that each compound induces a deterioration of matrix surface, decreasing adhesion, proliferation and activity of osteoblastic cells. NaHCO₃ seemed an effective cleaning agent, without deleterious consequences on the quality of the grafts and their cytocompatibility. This process was used to produce purified bone grafts for the repair, by tissue engineering, of a calvarial bone defect of critical size in the mouse. Cells/graft hybrid construction, elaborate *in vitro*, induced *in vivo* a fast bone regeneration until the center of the defect. Induction of the osteoblast differentiation of bone marrow cells before implantation did not improve the results. Systemic transplantation of bone marrow cells was also studied. The total body irradiation of mice, a precondition to transplantation, induces a dramatic trabecular bone loss. The transplanted cells, from the bone marrow, did not allow the restoration of bone mass but reconstituted a bone microenvironment leading to a modified microarchitecture of the recipient mice towards the donor phenotype. We have used bone marrow cells from GFP transgenic mice, allowing to trace the donor cells in wild type mice. We found that immunodepletion of CD11b expressed-bone marrow cells allow to strongly enrich the cellular population in osteoprogenitors.

DISCIPLINE – SPÉCIALITÉ DOCTORALE : Biologie cellulaire

MOTS-CLÉS : Mœlle osseuse, ostéoblastes, greffes osseuses, ingénierie tissulaire, lacune osseuse, souris transgéniques, GFP, transplantation de mœlle osseuse, ostéoporose, phosphatase alcaline.

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

INSERM, U922 « Remodelage osseux et biomatériaux », LHEA- UFR Médecine
1, rue Haute de Reculée 49045 ANGERS