



HAL
open science

Evaluation de matrices extracellulaires décellularisées comme support de BMP-2 pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Nathanael Larochette

► **To cite this version:**

Nathanael Larochette. Evaluation de matrices extracellulaires décellularisées comme support de BMP-2 pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Ingénierie biomédicale. 2017. hal-01668934

HAL Id: hal-01668934

<https://ephe.hal.science/hal-01668934>

Submitted on 20 Dec 2017

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

Nathanael LAROCLETTE

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Evaluation de matrices extracellulaires décellularisées comme support de BMP-2 pour l'ingénierie tissulaire osseuse

soutenu le 14 décembre 2017 devant le jury suivant :

Pr Emmanuel BELAMIE – Président
Dr Delphine LOGEART AVRAMOGLU – Tuteur scientifique
Dr Betty GARDIE – Tuteur pédagogique
Pr Emmanuel PAUTHE – Rapporteur
Pr Gaël ROCHEFORT – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Delphine LOGEART-AVRAMOGLU

Laboratoire B2OA Bio-ingénierie et Bio-imagerie Ostéo-Articulaire CNRS UMR7052

Directeur : Hervé PETITE

et de

Betty GARDIE

en délégation auprès de Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes/Angers

INSERM U1232

Directeur : Marc Grégoire

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Génomes, Cancers et Thérapie (GCT)

Remerciements

*« La science c'est comme faire l'amour :
c'est parfois quelque chose d'utile en soi,
mais ce n'est pas la raison pour laquelle nous la faisons. »*

Richard Feynman

Tout d'abord, je tiens à remercier Hervé PETITE, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir laissé le temps nécessaire à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à Delphine Logeart, pour m'avoir encadré (et c'est pas si simple!), et recadré quand nécessaire.

Un grand merci -ou devrais je dire, "thanks GOD" ;) - à Betty Gardie pour son acharnement à me convaincre de passer ce diplôme, aux conseils prodigués et à sa bonne humeur teintée de désespoir (côté sciences uniquement!)

Un grand merci à tous les collègues et étudiant(e)s (ça commence à en faire!) pour les moments passés (présents, futurs) ensemble ;

Remerciements particuliers à Hanane pour l'Histologie et les petites discussions impromptues, Morad, Esther, et Gaëlle pour les tips au microscanner, Marianne pour sa gentillesse inébranlable et la chasse aux fautes.

Thanks to my padawan Adrien, for beers and whiskies, together with science discussions.

Un travail ne vaut que s'il est lu (adaptation du "science not communicated is science not done" alors merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'en oublie bien sûr... mais bon, vous savez...quoi ;)

*"Every day we make it, we'll make it the best we can"
Jack Daniels*

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	7
<i>Liste des tableaux</i>	9
<i>Liste des abréviations</i>	10
Introduction	12
1 Le tissu osseux	12
1.1 <i>Structure et composition</i>	13
1.2 <i>Homéostasie osseuse</i>	14
1.2.1 La résorption osseuse	15
1.2.2 La formation osseuse	16
1.2.3 La phase de réversion	17
1.3 <i>Problèmes cliniques</i>	18
1.3.1 Les pathologies du couplage résorption/formation osseuse	19
1.3.2 Les fractures	19
1.3.3 Les grandes pertes de substance osseuse et ses stratégies thérapeutiques	21
2 Les substituts osseux	24
2.1 <i>Les substituts osseux standards (de première génération)</i>	24
2.1.1 Les substituts osseux allogéniques et xénogéniques	25
2.1.2 Les matériaux ostéo-mimétiques	25
2.1.3 Les polymères biodégradables	26
2.2 <i>Les substituts osseux activés (de seconde génération)</i>	27
2.2.1 Les produits d'ingénierie tissulaire cellularisés	28
2.2.1.1 Les cellules stromales multipotentes	28
2.2.1.2 Les CSM dans les substituts osseux cellularisés	29
2.2.2 Les substituts osseux protéo-activés	31
2.2.3 Les substituts osseux génétiquement activés	32
3 Les BMPs et leurs applications	32
3.1 <i>La famille des BMPs</i>	32
3.2 <i>Mode d'action des BMPs</i>	36
3.3 <i>Utilisation en clinique</i>	39
3.4 <i>Systèmes de libération de la BMP-2</i>	41
4 La matrice extracellulaire osseuse	42
4.1 <i>Définition et composition</i>	42
4.2 <i>MEC et ingénierie tissulaire osseuse</i>	44
4.2.1 Composants de la MEC et ingénierie tissulaire osseuse	44
4.2.2 MEC intégrale et ingénierie tissulaire osseuse	46
5 Projet de recherche	47
Matériel et méthodes	48
1 Culture cellulaire	48

1.1	<i>Obtention des Cellules Stromales Mésenchymateuses humaines</i>	48
1.2	<i>Obtention du « pool » de CSMs</i>	48
1.3	<i>Production des matrices extracellulaires (MEC)</i>	49
1.3.1	MEC sur fond de puits	49
1.3.2	MEC sur les implants en trois dimensions	49
1.4	<i>Obtention des matrices extracellulaires décellularisées (dMEC)</i>	50
1.5	<i>Utilisation de la BMP-2 recombinante</i>	50
1.5.1	Marquage en fluorescence	50
1.5.2	Rétention de la BMP-2 sur les dMEC	51
2	Colorations et histologie	51
2.1	<i>Coloration au Rouge Alizarine</i>	51
2.2	<i>Coloration Von Kossa</i>	52
2.3	<i>Coloration à l'Oil Red O</i>	52
2.4	<i>Coloration à la Safranine O</i>	52
2.5	<i>Coloration au Rouge Sirius /Vert Rapide FCF</i>	52
2.6	<i>Coloration histologique : Bleu de Stévenel et Picrofuchine de Van Gieson</i>	53
2.7	<i>Coloration histologique : Trichrome de Masson</i>	53
3	Analyses par cytofluorimétrie et par microscopie	53
3.1	<i>Cytofluorimétrie</i>	53
3.2	<i>Microscopie à fluorescence</i>	54
3.2.1	Visualisation de la répartition cellulaire	54
3.2.2	Visualisation de la BMP-2 retenue sur le dMEC	54
3.3	<i>Microscopie électronique</i>	55
4	Techniques biochimiques	55
4.1	<i>ELISA</i>	55
4.2	<i>Dosage de l'activité phosphatase alcaline</i>	55
4.3	<i>Dosage de l'activité BRE-LUC</i>	56
5	Etudes in vivo	56
5.1	<i>Implantations sous cutanée chez la souris</i>	56
5.2	<i>Suivi longitudinal de la formation osseuse</i>	57
5.3	<i>Traitement numérique des données du microscanner à rayon X</i>	57
5.4	<i>Suivi longitudinal de la libération de la BMP-2 in vivo</i>	58
6	Analyses Statistiques	58
	Résultats	59
1	La matrice extracellulaire sécrétée comme plateforme de libération de BMP-2	59
1.1	<i>Caractérisation du pool de cellules stromales mésenchymateuses</i>	59
1.2	<i>Caractérisation de MECs dérivées des CSMs</i>	61
1.3	<i>Effet de la décellularisation sur la MEC</i>	63
1.4	<i>Capacité de la dMEC à retenir la rhBMP-2</i>	64
1.5	<i>Lyophilisation du complexe dMEC-rhBMP-2</i>	68

1.6	Potentiel ostéoinducteur d'un PITO PCL-dMEC-BMP-2 in vivo.....	69
2	De l'intérêt d'utiliser une MEC minéralisée ou non.....	71
2.1	Caractérisation des dMEC in vitro.....	71
2.2	Comparaison fonctionnelle des PITO.....	72
2.2.1	Caractérisation des implants.....	73
2.2.1.1	Viabilité des cellules sur les implants.....	73
2.2.1.2	Analyse des PITO en Microscopie Electronique à Balayage.....	74
2.2.2	Capacité des PITO à retenir la rhBMP-2.....	75
2.2.3	Analyse de la formation osseuse in vivo.....	76
2.2.4	Libération de la BMP-2 in vivo.....	80
	Discussion.....	82
1	Problématique générale.....	82
2	Synthèse de la MEC.....	83
3	Décellularisation de la MEC.....	85
4	Rétention de rhBMP-2 et dose utilisée.....	87
5	Libération de la BMP-2.....	89
6	Comparaison entre dMEC-AA2P et dMEC-OS.....	89
7	Améliorations possibles.....	90
8	Conclusion.....	90
	Bibliographie.....	92
	Annexes.....	102

Liste des figures

- Figure 1 : *Structure et fonctions de l'os.*
- Figure 2 : *Le remodelage osseux.*
- Figure 3 : *L'étape de résorption osseuse.*
- Figure 4 : *Un modèle de formation de l'hydroxyapatite osseux.*
- Figure 5 : *Modèle du couplage résorption/formation osseuse.*
- Figure 6 : *Facteurs influençant la balance formation/résorption osseuse.*
- Figure 7 : *Modèles cinétiques du processus d'ossification endochondrale chez la souris.*
- Figure 8 : *La technique du transfert osseux segmentaire selon Ilizarov.*
- Figure 9 : *Une classification possible des greffes osseuses non autologues*
- Figure 10 : *Usage thérapeutique des CSMs dans les troubles squelettiques*
- Figure 11 : *Apport de la transcriptomique à la matériomique*
- Figure 12 : *Analyse phylogénique des membres de la famille des BMPs*
- Figure 13 : *Structure de la BMP-2*
- Figure 14 : *Membres de la famille des BMPs ou protéines appartenant aux voies de transduction de signaux des BMPs impliqués dans différentes maladies humaines.*
- Figure 15 : *Les deux voies de signalisation de BMP-2 : Smad dépendante et smad indépendante*
- Figure 16 : *Représentation des différentes familles de BMPs, des deux types de récepteurs, de leurs co-récepteurs, et des récepteurs à d'autres ligands pouvant influencer sur la voie de transduction de signal des BMPs.*
- Figure 17 : *Représentation des différents régulateurs des BMPs.*
- Figure 18 : *Illustration des différents systèmes de libération de BMP-2.*
- Figure 19 : *Schéma et caractéristiques de l'implant PCL.*
- Figure 20 : *Caractérisation des CSMs : Expression des marqueurs de membranes CD90/73/105 et CD45*
- Figure 21 : *Caractérisation des CSMs : Potentiel de différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique*
- Figure 22 : *Visualisation du contenu en collagène fibrillaire et en protéines et en GAG*
- Figure 23 : *Quantification de la synthèse de matrice extracellulaire.*
- Figure 24 : *Quantification de la matrice extracellulaire avant/après décellularisation*
- Figure 25 : *Rétention de la BMP-2 sur une MEC décellularisée*
- Figure 26 : *Activité de la BMP-2 retenue*
- Figure 27 : *Rétention et activité phosphatase alcaline de la rhBMP-2 retenue : effet dose*
- Figure 28 : *Effet de la lyophilisation sur l'activité de rhBMP-2 retenue*

Figure 29 : *Rétention de la BMP-2 sur des implants PCL-dMEC-AA2P et formation osseuse in vivo*

Figure 30 : *Comparaison de la production de collagène et de GAG avant et après décellularisation*

Figure 31 : *Rétention et bioactivité de la rhBMP-2 dans les dMECs-AA2P et -OS*

Figure 32 : *Répartition et viabilité des cellules 24h post ensemencement*

Figure 33 : *Répartition et viabilité des cellules après 21 jours de culture en milieu AA2P ou OS*

Figure 34 : *Microscopie électronique à balayage des implants décellularisés*

Figure 35 : *Rétention de la BMP-2 sur des implants PCL, PCL-dECM-AA2P et PCL-dECM-OS*

Figure 36 : *Analyse de la formation osseuse en microtomographie à rayon X*

Figure 37 : *Visualisation du tissu osseux par histologie en méthyl-méthacrylate et coloration à la Picrofuschine de Van Gieson.*

Figure 38 : *Visualisation des implants par histologie en paraffine et coloration au trichrome de Masson*

Figure 39 : *Rétention et suivi de la BMP-2 in vivo par fluorescence proche infra-rouge*

Liste des tableaux

Tableau 1 : *Composition de la matrice organique de l'os*

Tableau 2 : *Fonctions biologiques des membres de la famille des BMPs.*

Tableau 3 : *Les différents types de protéoglycanes*

Tableau 4 : *Principaux composants de la MEC ayant une affinité pour la BMP-2*

Liste des abbréviations

AA2P : *Acide ascorbique 2 Phosphate*
ADN : *acide desoxyribonucléique*
BLC : *Bone Lining Cells (cellules bordantes)*
B2OA : *Bio-imagerie et Bioingénierie Ostéo-articulaire*
BMP(s) : *Bone Morphogenetic Protein(s)*
BMP2 : *Bone Morphogenetic Protein 2*
BMPR : *Bone Morphogenetic Proteins Receptor*
BMU : *Basic Multicellular Unit*
BPE : *Bone Protein Extract*
BRE : *BMP-Responsive Element*
BSP : *Bone Sialoprotein*
CFU-F : *Colony Forming Unit*
CS : *Chondroïtine Sulfate*
CSM(s) : *Cellule(s) Stomale(s) Méenchymateuse(s)*
DBM : *Demineralized Bone Matrix*
DLX5 : *Distal-Less homeobox 5*
dMEC : *Matrice Extracellulaire décellularisée*
DMP1 : *dentin matrix protein 1*
DS : *Dermatan sulfates*
FDA : *Food and Drug Administration*
FGF2 : *Fibroblast Growth Factor 2*
GAG(s) : *Glycosaminoglycane(s)*
GDF : *Growth Differentiation Factor*
Gla : *γ -carboxyglutamate*
GR : *Globule Rouge*
HA : *Hydroxy-Apatite*
HS : *Héparane Sulfate*
Ihh : *Indian Hedgehog Homolog*
IL-1 : *Interleukine 1*
IL-6 : *Interleukine 6*

IT : *Ingénierie Tissulaire*
Il-8 : *Interleukine 8*
LbL : *layer by layer*
MEB : *microscopie électronique à balayage*
MEC : *matrice extracellulaire*
MEPE : *matrix extracellular phosphoglycoprotein*
MGP : *Matrix Gla Protein*
OS : *Ostéogénique*
P38MAPK : *Mitogen-Activated Protein kinase P38*
PCL : *PolyCaproLactone*
PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*
PG(s) : *Protéoglycane(s)*
Pi : *Phosphate inorganique*
PIGF : *Placental Growth Factor*
PLA : *PolyLactic Acid*
PLGA : *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*
PLL : *Poly(L-Lysine)*
PPi : *inorganic PyroPhosphate*
PTH : *ParaThyroid Hormone*
RANTES : *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*
RGD : *Arg-Gly-Asp*
rhBMP-2 : *recombinant human Bone Morphogenetic Protein*
rhPDGF BB : *recombinant Platelet-Derived Growth Factor BB*
RUNX2 : *Runt-related transcription factor 2*
Smad : *Sma and Mothers Against Decapentaplegic related*
 β -TCP : *β -Tricalcium Phosphate*
TC-PS : *Tissue culture polystyrene*
TGF : *Transforming Growth Factor*
TNAP : *Tissue non specific Alkaline Phosphatase*
TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
WNT : *Wingless/integrated*

Introduction

1 Le tissu osseux

L'os est un tissu vivant qui assure plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement du corps humain. Le squelette, qui compose le tissu osseux, assure une fonction mécanique en supportant le poids de l'organisme et une fonction de protection des organes essentiels. Le tissu osseux assure quant à lui une fonction métabolique liée à sa capacité de stockage des minéraux, tel le calcium (99 %), le phosphore (75 %), le sodium (90 %) et le magnésium (50 %) dont il régule l'homéostasie (Glimcher 1987). De plus, la cavité médullaire de la plupart des os longs et des os plats est le siège de l'hématopoïèse, qui assure la formation des cellules sanguines. Des données plus récentes en biologie osseuse ont également mis en lumière le rôle endocrine du tissu osseux. Il est non seulement la cible d'hormones endocrines mais apparaît également comme un organe endocrine en lui-même régulant en particulier le métabolisme énergétique (figure 1) (Riddle and Clemens 2017).

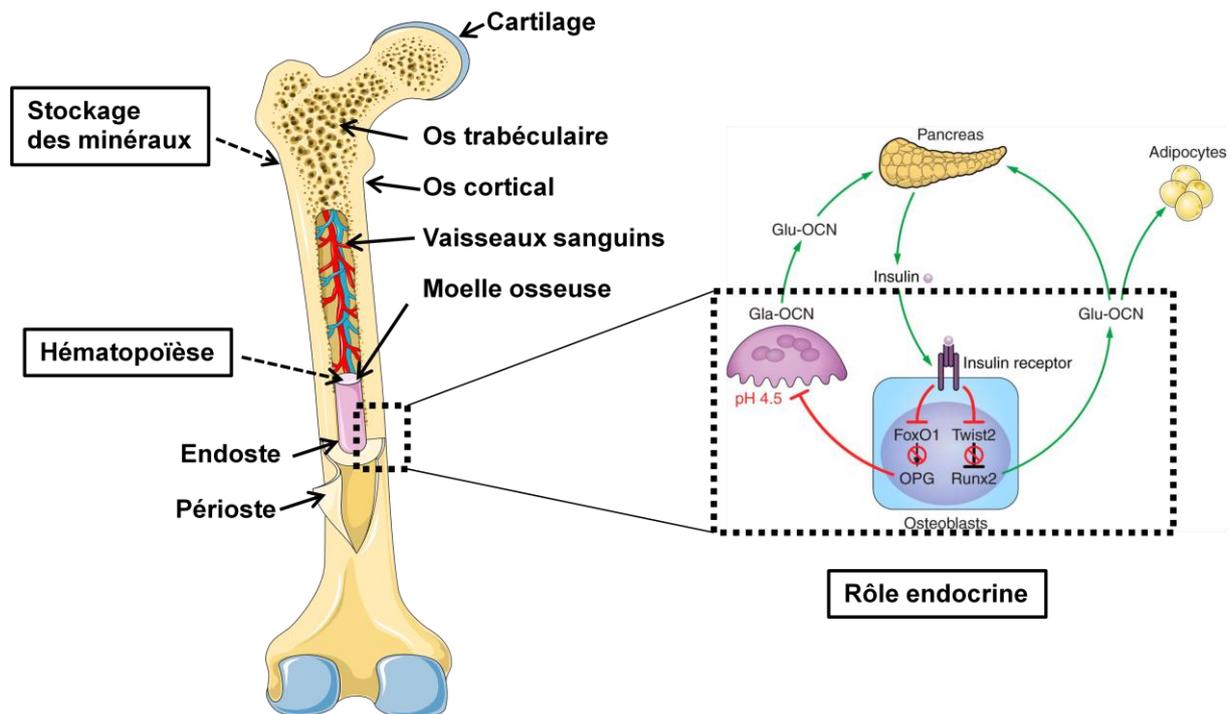


Figure 1 : Structure et fonctions de l'os.

L'os a plusieurs fonctions : -le stockage des minéraux (calcium, phosphore, sodium, magnésium), - l'hématopoïèse a lieu dans la cavité médullaire qui comporte la moelle osseuse. Le rôle endocrine du tissu osseux est représenté par la boucle Insuline-Ostéocalcine où les ostéoblastes participent à la régulation du métabolisme du glucose. En activant son récepteur sur les ostéoblastes, l'insuline déclenche la synthèse d'Ostéocalcine sous carboxylée (Glu-OCN) qui régule la production d'insuline au niveau du pancréas, et la sensibilité d'organes périphériques comme le tissu adipeux à l'insuline. (Modifié de Servier images + (Riddle and Clemens 2017))

1.1 Structure et composition

L'os est un tissu conjonctif en perpétuel renouvellement mais contrairement à la plupart des autres tissus du corps humain, il a la particularité d'être formé d'une matrice extracellulaire minéralisée. Cette matrice, à la fois organique et minérale, lui confère d'excellentes propriétés biomécaniques. La fraction organique de la matrice osseuse représente environ 35% en masse de l'os (tableau 1) et en assure les propriétés de flexibilité tandis que la partie minérale, qui représente 65% en masse, est composée principalement d'hydroxyapatite carbonatée, et assure les propriétés de rigidité (Module d'Young= 20 GPa) et de résistance à la rupture (100-200 MPa) (Keller et al. 1990) de l'os.

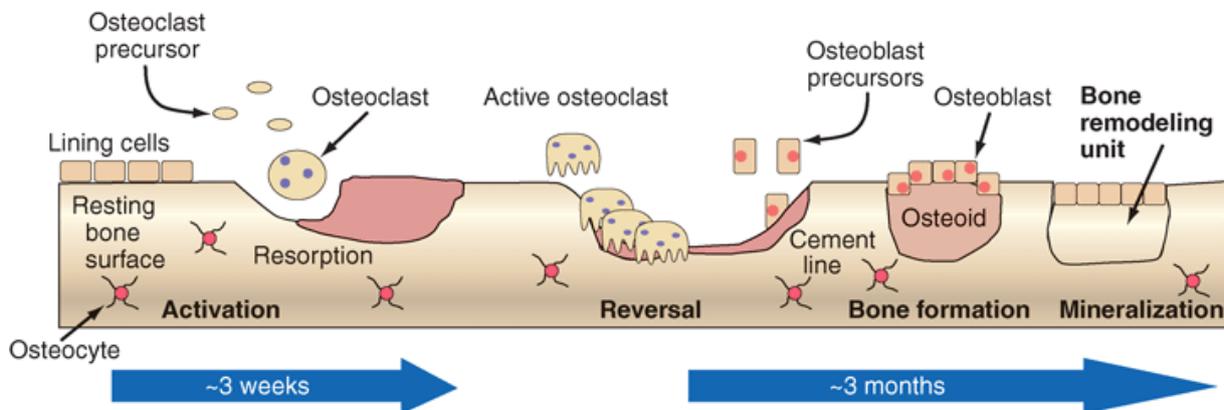
Tableau 1 : Composition de la matrice organique de l'os.

Composition de la matrice organique de l'os		Pourcentage (W/W)
Collagène (Type I, X, III, IV)		85%
Substance fondamentale :		15% dont :
Protéines osseuses non collagéniques	Ostéocalcine	15-25%
	Glycoprotéines :	
	Phosphatase alcaline	9%
	Thrombospondine, Ostéonectine, Fibronectine, Tétraneectine	15-25%
	Sialoprotéines :	
	Ostéopontine, Bone sialoprotéine	10%
	Protéoglycanes	4%
	Facteurs de croissance	<1%
	Interleukines/chimiokines :	
	IL-1, IL-6, IFN γ , TNFs, MCP-1	<1%
Protéines plasmatiques	Glycoprotéine α2HS	5-10%
	Albumine, immunoglobulines	3%
	hormones	<1%

1.2 Homéostasie osseuse

Le modelage osseux est défini comme l'ensemble des événements cellulaires, fonctionnels et biochimiques qui forme le tissu osseux lors de la croissance de l'organisme jusqu'à la fermeture des plaques de croissance épiphysaires. Le remodelage osseux définit, quant à lui, le renouvellement osseux à l'âge adulte en conditions physiologiques pour permettre la réparation des micro-fractures (dues à une usure mécanique) et l'adaptation du squelette aux variations des contraintes mécaniques extérieures, ou post-traumatiques / pathologiques, par exemple après consolidation d'une fracture (Hollinger and Wong 1996). Le remodelage est responsable du remplacement annuel de 10% du squelette humain adulte (Parfitt 1994). La quantité d'os produit est dépendante de l'équilibre entre formation et résorption du tissu osseux. Tout au long de la vie, cette homéostasie est finement régulée par l'action concertée de deux types cellulaires

principaux, les ostéoclastes et les ostéoblastes (figure 2). Les premiers sont d'origine hématopoïétique et ont pour fonction de résorber l'os préformé alors que les seconds dérivent du mésenchyme¹ et ont pour fonction de synthétiser une matrice organique puis de la minéraliser. La synchronisation des ostéoblastes et des ostéoclastes est donc essentielle au renouvellement adéquat du tissu osseux et on retrouve ces deux types cellulaires au sein d'une unité multicellulaire de base (BMU, Basic multicellular unit), structure qui permet leur action séquentielle et couplée (Sims and Martin 2014). Ces BMU incluent aussi des ostéoblastes matures enchâssés dans la matrice extracellulaire minéralisée qu'ils ont eux-mêmes synthétisée : les ostéocytes (Prideaux et al. 2016).



Source: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition*: www.accessmedicine.com

Figure 2 : Le remodelage osseux.

L'os est initialement dans un état dit de quiescence. Lorsqu'il est nécessaire de remplacer du tissu osseux, c'est le remodelage osseux qui entre en jeu. La première étape est la résorption. Elle est effectuée par les ostéoclastes suite à la rétractation des cellules bordantes. Il s'ensuit une étape de réversion qui correspond à la transition entre résorption et formation osseuse, puis l'étape de formation osseuse et de minéralisation (Lining cells : cellules bordantes, reversal : phase de réversion).

1.2.1 La résorption osseuse

Au sein du tissu osseux, la paroi osseuse est recouverte de cellules bordantes, un type de cellules proche des ostéoblastes, qui forment une barrière protégeant le tissu osseux de son environnement extérieur (Everts et al. 2002). Sous l'action de stimuli tels que l'hormone parathyroïde (PTH), une réponse inflammatoire, ou des dommages causés au réseau ostéocytaire, cette barrière est activée et est suivie de la rétractation des cellules bordantes permettant ainsi l'accès des ostéoclastes au tissu osseux (Ferrier et al. 1994). Suite à l'adhésion

¹ Ici le mésenchyme désigne un tissu dérivé du mésoderme. Cependant, dans certains cas, les ostéoblastes peuvent provenir de l'ectomésenchyme, tissu dérivé de la crête neurale ayant des caractéristiques similaires (cellules subissant une transition épithélio-mésenchymateuse).

des ostéoclastes à la surface, se forme entre les ostéoclastes et l'os une lacune de résorption dont l'environnement acide permet la dissolution des minéraux d'hydroxyapatite tandis que les protéases sécrétées par les ostéoclastes dégradent la matrice organique déminéralisée (figure3) (Rucci and Teti 2016).

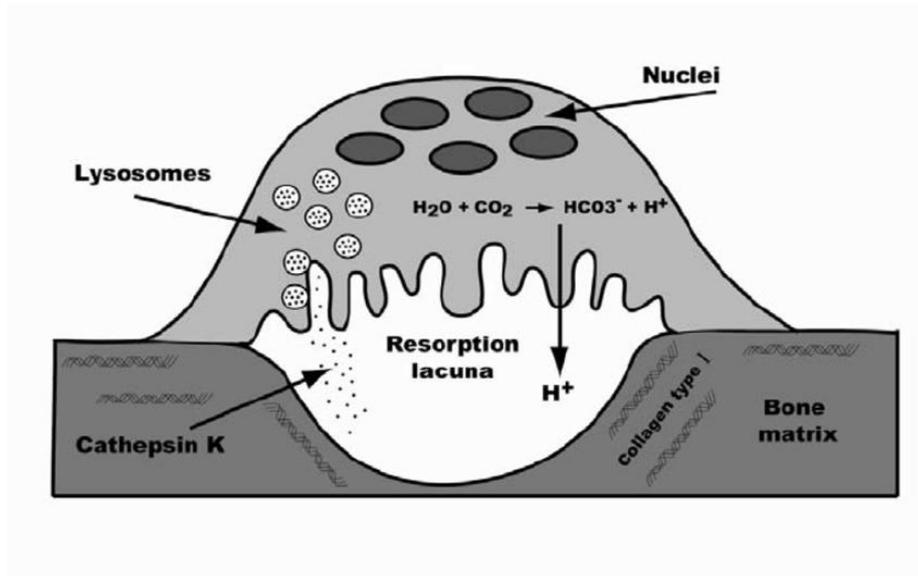


Figure 3 : L'étape de résorption osseuse.

Les ostéoclastes forment une lacune de résorption en adhérant à l'os. Ils acidifient alors cette lacune pour dissoudre le minéral osseux et sécrètent des protéases (Cathepsine K) pour dégrader la partie organique de l'os. (Ainola et al. 2005)

1.2.2 La formation osseuse

La formation osseuse est la génération *de novo* de tissu osseux. Elle est le fait des ostéoblastes qui sont issus de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSMs) de la moelle osseuse. Cette formation se fait en deux étapes ; tout d'abord la synthèse d'une matrice extracellulaire organique riche en fibre de collagène de type I, puis, la minéralisation de cette matrice via la concentration localisée de calcium et de phosphate inorganique, donnant lieu à la formation de cristaux d'hydroxyapatite. Les mécanismes détaillés de l'initiation de la minéralisation sont encore mal compris. Cependant, deux types de minéralisation semblent co-exister, la minéralisation intravésiculaire et la minéralisation extracellulaire. Pour cette dernière, le ratio entre pyrophosphate inorganique (PPi) et phosphate inorganique (Pi) extracellulaire apparaît comme une des clefs de l'initiation de la minéralisation. Le PPi extracellulaire (considéré comme inhibiteur de la minéralisation) est converti en Pi (considéré comme un promoteur de la minéralisation) par une enzyme membranaire, la Phosphatase Alcaline non spécifique (TNAP). C'est ce Pi en conjonction avec le calcium extracellulaire et les protéines liant le calcium de la matrice extracellulaire qui vont permettre la nucléation des

cristaux d'hydroxyapatite le long des fibres de collagènes. L'expression de TNAP étant augmentée de façon précoce au cours de la différenciation ostéoblastique, elle est couramment utilisée comme marqueur précoce de la minéralisation (Zhou et al. 2012).

La minéralisation intravésiculaire correspond, quant à elle, à une formation de cristaux d'hydroxyapatite dans des vésicules matricielles spécialisées secrétées par les ostéoblastes et les chondrocytes, ces vésicules libérant leur contenu entre les fibres de collagène. Les deux mécanismes de minéralisation sont liés puisque la membrane des vésicules matricielles contient des enzymes TNAP qui permettent la génération de Pi dans le milieu extracellulaire (et ainsi la minéralisation extracellulaire) et des transporteurs de phosphates qui permettent l'entrée de celui-ci (et donc la minéralisation intravésiculaire) (figure 4).

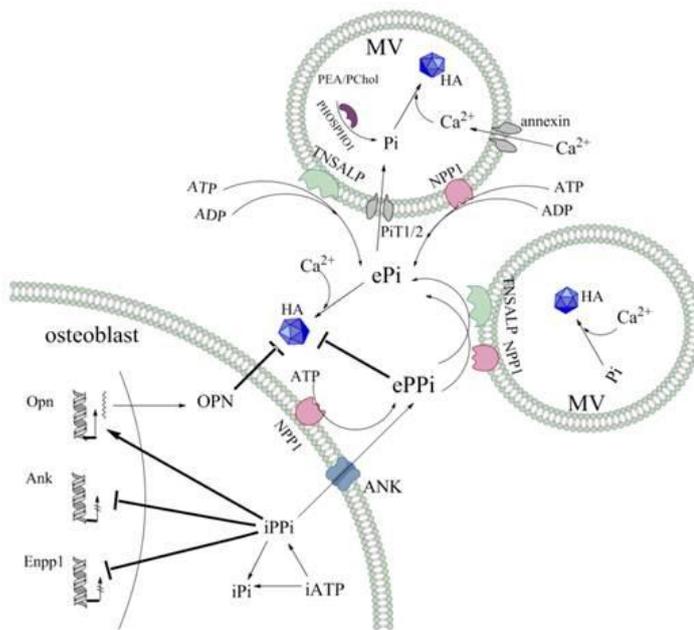


Figure 4 : Un modèle de formation de l'hydroxyapatite osseux.

Un des principaux facteurs limitant de la formation des cristaux d'HA est la conversion du pyrophosphate (PPi) en Phosphate inorganique (Pi). Celle-ci peut être réalisée dans l'espace extracellulaire par la phosphatase alcaline présente dans les membranes plasmiques ainsi que dans les membranes des corps multivésiculaires (MV) secrétés par les ostéoblastes. Le Pi extracellulaire (ePi) ainsi que les ions Ca^{2+} peuvent être importés dans les MV et conduire à la minéralisation intravésiculaire. Ces deux composants étant présents dans l'espace extracellulaire, la formation de cristaux d'HA peut aussi se faire de façon extravésiculaire. (Zhou et al. 2012)

1.2.3 La phase de réversion

Pour assurer l'homéostasie du tissu osseux, le couplage entre résorption et formation osseuse doit être finement régulé afin que la quantité d'os néoformé égale celle de tissu osseux résorbé. Cette phase de réversion est mal connue et fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires ainsi que de multiples facteurs solubles. A la fin de la phase de résorption, les « reversal cells », un

autre type de cellules ostéoblastiques, participent à la transition résorption/formation en nettoyant le site après le passage des ostéoclastes (Delaisse 2014). La dégradation de la MEC permet la libération de facteurs solubles, et les ostéoclastes sécrètent des facteurs ostéogènes, les clastokines. Ces facteurs permettent l'initiation de la formation osseuse en agissant sur plusieurs types cellulaires dont les cellules de la canopée, une couche cellulaire formée de CSMs aplaties séparant les cellules bordantes et la moelle osseuse. En réponse aux facteurs ostéogènes, ces ostéoprogéniteurs de la canopée prolifèrent, puis migrent vers la surface de réversion où elles vont progressivement se différencier en ostéoblastes, tout comme les « reversals cells » (figure 5).

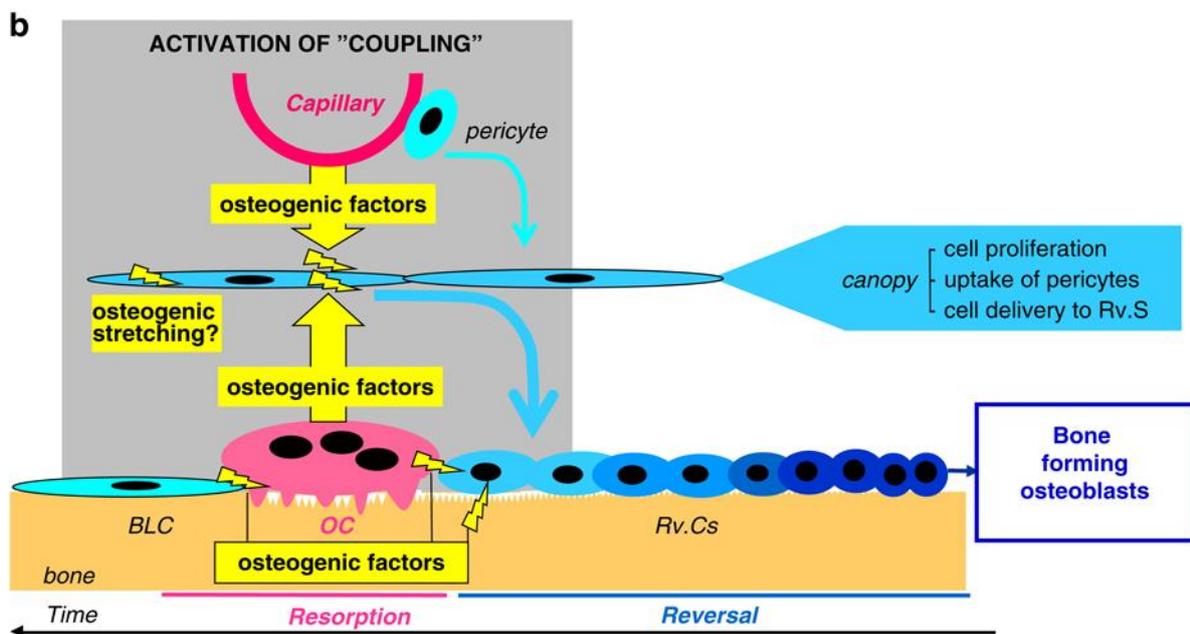


Figure 5 : Modèle du couplage résorption/formation osseuse.

Lors de la phase de résorption, différents stimuli ostéogéniques sont produits : les clastokines libérées par les ostéoclastes, des facteurs de croissance libérés de la MEC préalablement dégradée, voire des signaux provenant des capillaires sanguins très proches. La canopée, à proximité immédiate de la BMU, est une cible privilégiée de ces signaux car elle est très riche en progéniteurs ostéoblastiques et semble être une zone de forte prolifération. Les progéniteurs ostéoblastiques migrent jusqu'à la surface de réversion puis se différencient progressivement en ostéoblastes. (Delaisse 2014) (Rv.Cs : reversal cells, BLC : bone lining cells, cellules bordantes, OC : ostéoclastes))

1.3 Problèmes cliniques

De multiples pathologies résultent du découplage de la balance résorption/formation osseuse. De plus, l'os, comme d'autres tissus, peut être l'objet d'altérations physiques nécessitant une réparation.

1.3.1 Les pathologies du couplage résorption/formation osseuse

Une pathologie courante est l'ostéoporose qui est caractérisée par une perte de la masse osseuse due à une résorption osseuse excédant la formation osseuse. Cette dérégulation de la balance résorption/formation apparaît tant chez l'homme que chez la femme à partir de 45 ans. Différents facteurs peuvent accélérer ce phénomène comme par exemple la ménopause (diminution des oestrogènes et des androgènes), la carence en vitamine D ou l'immobilisation (figure 6). Des maladies génétiques peuvent aussi conduire à une diminution de la masse osseuse comme par exemple les dysplasies avec défaut de minéralisation dues à la mutation du gène de la phosphatase alcaline (*hypophosphatasie*) ou dues à une mutation du gène du collagène I (*Osteogenesis Imperfecta*). D'autres pathologies, au contraire, entraînent une augmentation de la densité osseuse comme c'est le cas dans les ostéopétroses impliquant un dysfonctionnement des ostéoclastes.

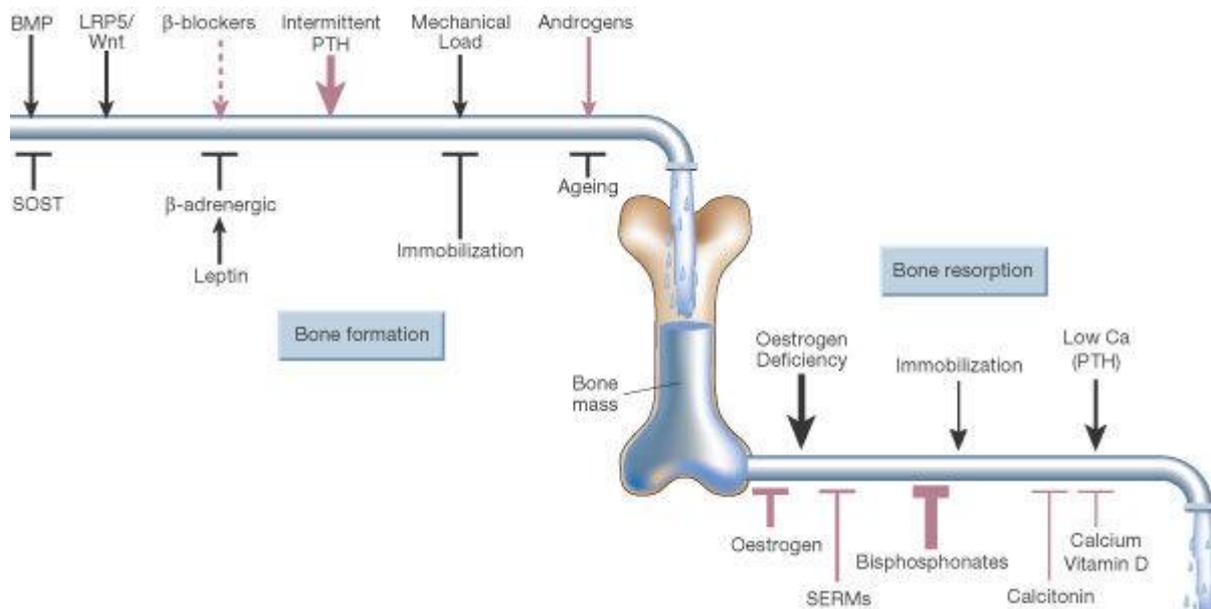


Figure 6 : La masse osseuse est sous le contrôle de facteurs physiologiques (et pharmacologiques) influençant son augmentation ou sa diminution. L'augmentation de la masse osseuse est favorisée par les facteurs augmentant la formation (BMP, PTH, androgènes, forces mécaniques ou inhibant la résorption osseuse (Biphosphonate, oestrogènes, calcium..). La diminution de la masse osseuse est favorisée par l'inhibition de la formation osseuse (SOST, vieillissement, immobilisation) et l'augmentation de la résorption osseuse (baisse des œstrogènes due à la ménopause, immobilisation..) (Harada and Rodan 2003).

1.3.2 Les fractures

Les atteintes les plus communes du tissu osseux ne sont pas dues à une perturbation de l'homéostasie osseuse mais à des altérations physiques de l'os après traumatisme, ce sont les fractures. Il existe plusieurs modes de cicatrisation osseuse suivant l'anatomie de la fracture.

Dans le cas le plus simple, lorsque les bouts osseux sont suffisamment proches (<1mm) et que la fracture est stabilisée (éventuellement de façon artificielle par la pose d'une plaque d'ostéosynthèse), c'est la « cicatrisation par première intention » qui entre en jeu. Celle-ci se fait par ossification endomembraneuse et implique le recrutement de progéniteurs ostéoblastiques, la création d'un tissu conjonctif, la différenciation des progéniteurs en ostéoblastes et finalement, le pontage des bouts osseux par de l'os néoformé. Dans le cas d'une fracture non stabilisée et/ou lorsque les bouts osseux sont un peu plus éloignés (>1mm), un autre processus est mis en œuvre, la cicatrisation par seconde intention. Celle-ci se fait principalement par ossification endochondrale mais aussi partiellement par ossification endomembraneuse. L'ossification endochondrale passe par la synthèse d'une matrice cartilagineuse qui est ensuite minéralisée pour devenir du tissu osseux. Le processus d'ossification endochondrale s'effectue en plusieurs étapes très bien documentées (figure 7).

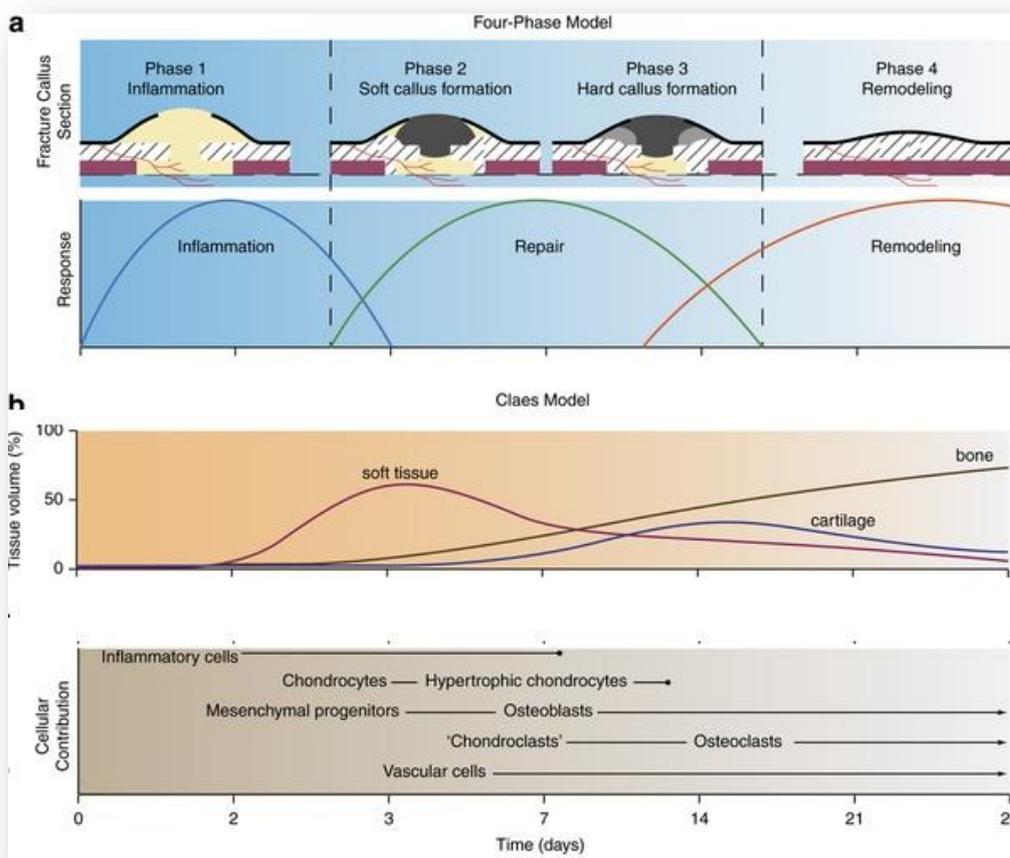


Figure 7 : Modèles cinétiques du processus d'ossification endochondrale chez la souris.

a) les différentes phases ; b) les différents tissus synthétisés ; c) les types cellulaires impliqués. (Pivonka and Dunstan 2012)

Tout d'abord, dès la fracture, un hématome se forme dû à la rupture des vaisseaux environnants et l'irruption d'une réaction inflammatoire aiguë. Les plaquettes formant l'hématome vont libérer des facteurs chemo-attractants régulant l'activité de différents types cellulaires. En particulier, elles libèrent du PDGF et du TGF β qui vont permettre la sortie de l'état de quiescence et la prolifération des CSMs (Hollinger and Wong 1996). Parallèlement, les polynucléaires, les macrophages et les ostéoclastes sont recrutés et permettent de dégrader le tissu osseux nécrosé en bordure de la fracture, c'est la phase de démolition. Des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1, et l'IL-6 sont aussi sécrétés et vont déclencher l'angiogénèse qui est renforcée par la sécrétion de VEGF due à l'hypoxie locale créée par l'hématome (Dimitriou et al. 2005). Il s'ensuit un recrutement de fibroblastes qui vont sécréter du collagène et créer un tissu granuleux. Les protéines de la morphogénèse osseuse (ou BMPs), comme par exemple la BMP-2, ainsi que le TGF β vont alors induire la différenciation des CSMs en chondrocytes ou en ostéoblastes, ceux-ci permettant l'évolution du tissu granuleux en tissu fibro-cartilagineux, le cal mou. Ce dernier est une structure semi-rigide stabilisant la fracture qui, après vascularisation, évolue progressivement vers un cal osseux constitué d'os tissé non-lamellaire. A ce stade, la fracture est considérée comme réparée. Il s'ensuit une phase de remodelage prenant plusieurs années durant laquelle le cal osseux est remplacé par un os lamellaire compact avec dégradation du cal externe surnuméraire et restitution *ad integrum* des corticales et du canal médullaire.

1.3.3 Les grandes pertes de substance osseuse et ses stratégies thérapeutiques

Il existe des situations cliniques où la réparation ne peut s'effectuer (1 à 5 % des fractures) ou s'effectue mal (5 à 10 %). En premier lieu, lorsque qu'une fracture n'est pas suffisamment réduite, c'est-à-dire lorsque les bouts osseux sont trop distants (> 10 mm) ou, s'il y a perte importante de substance osseuse, la réparation ne peut se faire. D'autre part, certaines fractures, 6 mois après le trauma, ne se consolident pas ou se consolident mal suite au traitement initial, on parle alors de pseudo-arthrose. De nombreux facteurs prédisposent à l'apparition d'une pseudo-arthrose comme une fracture ouverte, septique, lorsque le périoste est décollé ou lorsqu'un contexte clinique défavorable existe (tabagisme, diabète...). Dans tous ces cas, il est nécessaire de recourir à une intervention chirurgicale dont les objectifs sont de :

- maintenir la longueur initiale de l'os touché
- stabiliser la fracture pour éviter une pseudo-arthrose

-créer un environnement propice à la consolidation osseuse.

Pour parvenir à atteindre ces objectifs, plusieurs possibilités s'offrent au chirurgien. La première technique permettant la restauration de la longueur initiale d'un membre, en particulier le tibia, est le transfert osseux segmentaire ou technique de l'ascenseur-descenseur proposé par Ilizarov (figure 8). Cette méthode repose sur le principe de l'ostéogénèse par distraction progressive. Celle-ci consiste à pratiquer une corticotomie à distance de la perte de substance osseuse qui va permettre la création d'un foyer d'ostéogénèse. Des fixateurs externes avec des broches intra-osseuses spécifiques vont permettre de moduler les forces appliquées et en particulier d'écartier progressivement les segments osseux au fur et à mesure de la synthèse osseuse et ainsi récupérer la longueur initiale du membre. Cette technique, adaptée en particulier pour le tibia et pour des défauts excédant 4 cm, permet d'éviter la microchirurgie et les dommages vasculaires associés comme c'est le cas dans la greffe osseuse conventionnelle. Aussi, elle a l'avantage d'éviter la morbidité liée à un second site de prélèvement. Cependant, c'est un traitement à long terme (6 à 12 mois), et comportant de nombreuses complications liées à la durée prolongée du port du fixateur externe (douleur, inconfort, infections, ostéolyse au niveau des broches, fractures, arrêt de travail / déscolarisation des patients...).

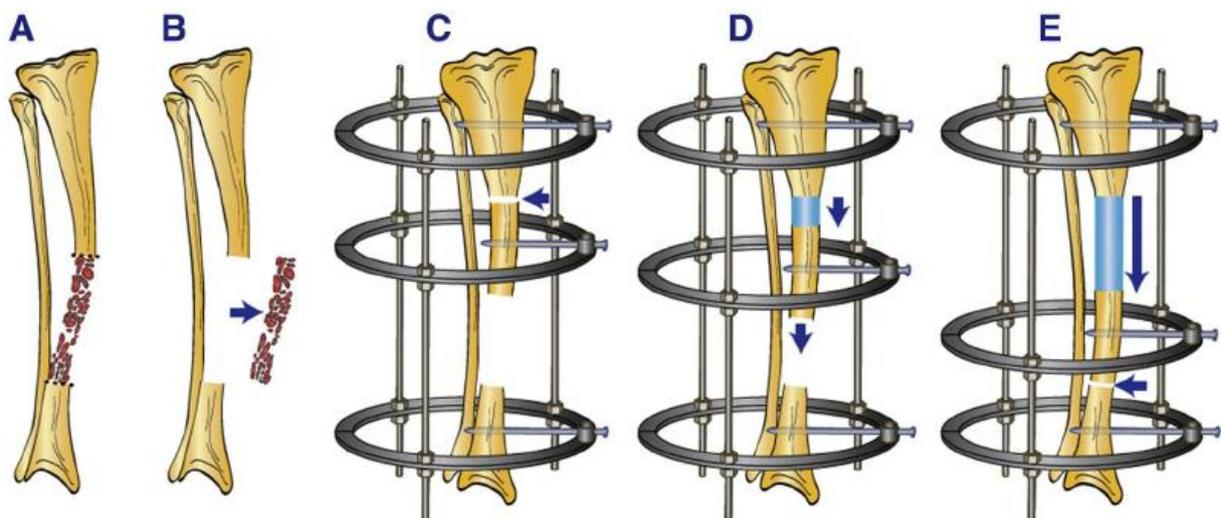


Figure 8 : La technique du transfert osseux segmentaire selon Ilizarov.

Pour combler une grande perte de substance osseuse, le principe de cette technique consiste à reformer du tissu osseux de proche en proche à partir d'une corticotomie située au niveau de la plaque de croissance, lieu d'une ostéogénèse importante (ostéogénèse en distraction). Le fragment osseux situé entre la fracture et la corticotomie est progressivement descendu (environ 1 mm/jour) grâce à des broches intra-osseuses et à l'appareillage externe. La consolidation finale est le résultat d'une ostéogénèse par compression (Makhdoum et al. 2015).

Depuis les travaux d'Ollier en 1858 sur le potentiel régénératif du périoste et en particulier de la couche sous périostée ostéogène, et avec la compréhension des phénomènes biologiques tels que l'asepsie et l'immunologie (en particulier la compréhension du phénomène de rejet), la greffe de tissu osseux s'est développée. Suivant la taille et la localisation du défaut, plusieurs techniques chirurgicales sont possibles. Tout d'abord, le transfert de fibula (=péroné) chez le patient en préservant sa vascularisation puis à la greffer. Elle est réservée aux défauts segmentaires diaphysaires de plus de 5 cm et autorise des greffes allant jusqu'à 25 cm de longueur. Elle nécessite un réseau veineux intacte (pas de calcification, pas de thrombose) au site de prélèvement et supporte mal la greffe en milieu septique.

Une autre méthode pour traiter les pertes de substance osseuse est l'autogreffe de tissu osseux généralement prélevé au niveau de la crête iliaque du patient et réimplanté sur le site de lésion. Ce tissu inclut une matrice organique et minérale, des cellules osseuses, de nombreuses cytokines et de la moelle osseuse, cette dernière contenant les précurseurs des cellules ostéoblastiques. Cette greffe, dans sa forme simple, est possible pour des défauts jusqu'à 5 cm car il est apparu qu'au-dessus de cette limite, une résorption osseuse apparaissait. L'évolution des techniques chirurgicales a fortement augmenté les taux de succès des chirurgies osseuses. Récemment, la technique de la membrane induite (ou technique de Masquelet) (Karger et al. 2012) a été une révolution dans la reconstruction des grands défauts osseux où seules les allogreffes et/ou les greffes vascularisées étaient possibles. Cette technique simple et possible dans un contexte clinique d'urgence permet aujourd'hui d'appliquer la greffe de tissu osseux à des défauts supérieurs à 5 cm. Elle se réalise en deux étapes. Tout d'abord, le chirurgien comble le défaut osseux avec une entretoise en ciment acrylique. Deux mois après, l'inflammation s'est atténuée et une membrane à corps étranger s'est formée autour du ciment. Cette membrane est fortement vascularisée, sécrète de nombreux facteurs comme le TGF β 1, le VEGF et la BMP-2 (Pelissier et al. 2004) et contient des CSMs (Gruber et al. 2013, 2016). Le deuxième temps opératoire consiste à enlever l'entretoise tout en conservant la membrane intacte puis à combler le défaut avec de l'autogreffe spongieuse ou cortico-spongieuse, associée ou non à des matériaux substituts osseux. Cette membrane permet, en plus de ses propriétés pro-ostéogènes, de contenir les particules de greffes/matériaux en place. Dans une étude rétrospective incluant principalement des fractures ouvertes, dont 50 % étaient septiques, le taux de consolidation donné est de 90 % pour des pertes osseuses allant de < 2 cm et jusqu'à 23 cm (Karger et al. 2012).

Malgré ces progrès dans le domaine chirurgical, il reste encore de nombreux problèmes en particulier lorsque l'autogreffe n'est pas ou plus possible. En effet, le prélèvement de tissu osseux dans la crête iliaque est limité en quantité et est associé à une morbidité importante (atteignant jusqu'à 50 % des patients) tel qu'une douleur éventuellement chronique, des infections, ou des pertes de sensibilité (Silber et al. 2003, Dimitriou et al. 2011)(Dimitriou et al. 2011).

2 Les substituts osseux

Il existe cependant des alternatives à l'autogreffe. Le développement des biomatériaux ces dernières décennies a vu l'émergence de substituts osseux. Ceux-ci sont regroupés en deux grandes catégories : les substituts osseux de première génération et les substituts osseux activés, de seconde génération (figure 9) (Deev et al. 2015).

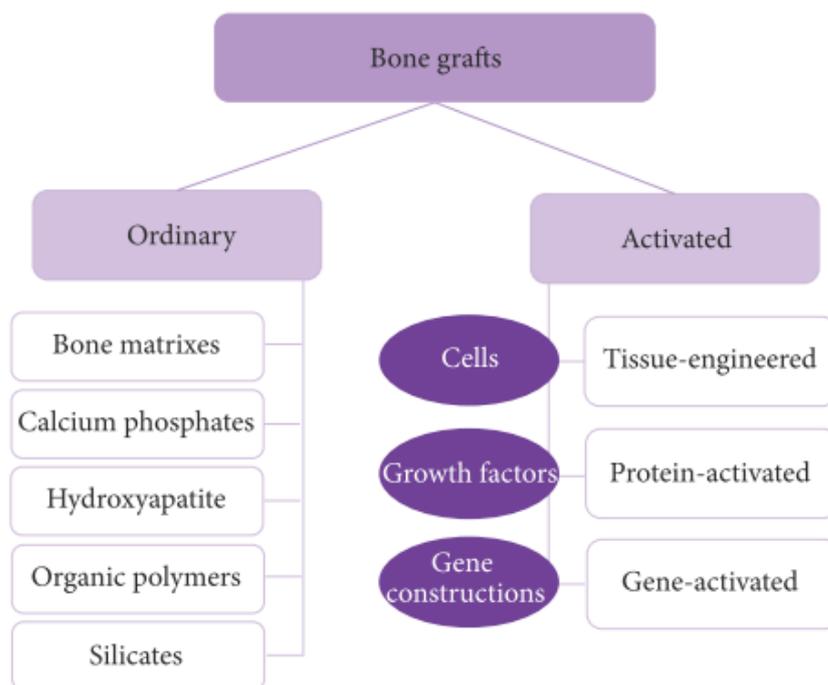


Figure 9 : Une classification possible des greffes osseuses non autologues.
(Deev et al. 2015).

2.1 Les substituts osseux standards (de première génération).

Cette catégorie regroupe les matériaux de comblement qu'ils soient naturels ou synthétiques. Leur caractéristique commune est que seules leurs propriétés intrinsèques sont utilisées. Ils sont pour la plupart ostéo-conducteurs, c'est-à-dire qu'ils permettent la repousse osseuse à leur surface, mais pas ou peu ostéoinducteurs c'est-à-dire qu'ils n'induisent pas (ou peu) la

formation osseuse *per se*. Leur but est de guider la régénération osseuse dans les situations cliniques où il y a suffisamment d'activité ostéogène. On trouvera dans cette catégorie :

2.1.1 Les substituts osseux allogéniques et xénogéniques.

Les substituts osseux allogéniques sont à base de matériel humain, tandis que les substituts xénogéniques sont à base d'os d'origine animale, principalement bovin. Deux types de substituts osseux peuvent alors être produits. L'os peut être décellularisé et subir différents traitements comme la déprotéinisation et ou la délipidation pour ne conserver que les propriétés structurelles tridimensionnelles de l'os natif et éliminer les possibles immunogènes (en particulier pour les xélogreffes), on parle alors d'os de banque. Le tissu osseux peut aussi permettre d'obtenir un autre composé intéressant. Pour cela il subit une décellularisation et une décalcification, ce qui permet de ne garder que la partie organique active biologiquement, on l'appelle alors DBM pour « Demineralized Bone Matrix » ou BPE pour « Bone Protein Extract » suivant le traitement physique et chimique réalisé pour l'obtenir. Ces matrices, en particulier les matrices DBM démontrent une activité ostéoinductrice due à la présence de protéines ostéoinductrices, les BMPs, mais il existe une variabilité importante de leurs concentrations suivant les préparations et même suivant les lots (Bae et al. 2006), ce qui diminue leur attractivité. Ces substituts osseux allogéniques et xénogéniques ne sont pas dénués d'inconvénients, en particulier, la disponibilité de cadavres humains pour les substituts allogéniques, et les risques de transmission de pathogènes pour les substituts allogéniques et xénogéniques. C'est pour cela que d'autres matériaux ayant des caractéristiques proches du tissu osseux (ou au moins d'une de ses composantes) sont aujourd'hui de plus en plus utilisés et étudiés.

2.1.2 Les matériaux ostéo-mimétiques.

La plupart des céramiques utilisées comme substituts osseux sont d'origine synthétique. La première « céramique » et le premier substitut osseux utilisé en chirurgie orthopédique dans la période moderne a été le plâtre de Paris. C'est du sulfate de calcium hemihydraté, non poreux et présentant une forte résorbabilité. Bien que son activité ostéo-conductrice n'ait pas été initialement reconnue, il apparaît néanmoins qu'une formation osseuse se crée directement à la surface du matériau, possiblement due à la libération du calcium (Kraitzer n.d., Peltier 1961). D'une composition chimique plus proche de l'os, les phosphates de calcium ont aujourd'hui la préférence comme matériau de comblement osseux. Parmi eux, l'hydroxyapatite (HA), et le tri-calcium phosphate beta (β TCP) sont largement utilisés en clinique. En effet, tous deux sont biocompatibles et n'entraînent qu'une faible réaction inflammatoire ; ils sont ostéoconducteurs

voire ostéoinducteurs (Holzapfel et al. 2013), et ont des propriétés mécaniques proches de l'os natif. Cependant, malgré de bons résultats, aucun de ces deux matériaux ne présente de vitesse de résorption idéale, c'est-à-dire une vitesse de résorption équivalente à celle de synthèse de l'os néoformé (Kwon et al. 2003). En effet l'HA est résorbé très lentement, principalement par action cellulaire, alors que le TCP l'est très rapidement à la fois par des mécanismes cellulaires et de dissolution (Heymann et al. 1999). Dans les deux cas, il peut y avoir un impact négatif sur la consolidation osseuse. Des modifications chimiques de ces phosphates de calcium ou même l'utilisation de matériaux biphasiques contenant différents ratios de HA et de TCP sont plus couramment utilisés pour permettre d'améliorer l'adéquation entre résorption du matériau et synthèse osseuse (Schopper et al. 2005). D'origine naturelle, les carbonates de calcium sont aussi utilisés, en particulier le corail, qui est aussi ostéoconducteur (Guillemin et al. 1989) et démontre une biorésorbabilité à environ 4 mois selon le genre (Porites ou Acropora), soit situé entre le TCP et l'HA. Un autre matériau présentant une bonne ostéoconduction mais aussi une activité anti-bactérienne est le bioverre (Bioglass®) ou verre bio-actif. Il est composé d'oxyde de silice (SiO₂), d'oxyde de calcium, d'oxyde de sodium et d'oxyde de phosphore (P₂O₅). Son faible taux de silicate (en comparaison avec d'autres verres) et son ratio élevé en Calcium/Phosphate expliquent en grande partie sa bioactivité. Tous ces matériaux ont des propriétés chimiques proches de la partie minérale osseuse qui leur confèrent des propriétés intéressantes pour la formation osseuse. En particulier, leur ostéo-conductivité favorise la repousse osseuse. En présence de fluide corporel, la surface des biocéramiques se dissout puis re-précipite sous forme d'une couche de HA carbonaté, favorisant ainsi l'apposition osseuse. Par ailleurs, leur résorbabilité permet l'apport de minéraux sur le site de lésion concomitamment au remplacement du matériau par de l'os natif. Bien que la composition chimique des céramiques soit modifiable pour changer leurs propriétés, en particulier leur vitesse de résorption, modifier leur architecture macro et microscopique reste un challenge. Cette problématique, nécessaire pour une bonne intégration de l'implant au tissu de l'hôte (passage des vaisseaux sanguins, adhésion, prolifération et différenciation des CSMs...) est cependant abordée aujourd'hui par l'impression 3D des céramiques (Wen et al. 2017).

2.1.3 Les polymères biodégradables

Les polymères seuls sont peu utilisés pour le comblement osseux en raison de leurs propriétés mécaniques très différentes de celles du tissu osseux et de leur ostéoconductivité relativement faible voire nulle et sont donc plus couramment utilisés en association avec des céramiques.

Les polymères naturels comme le collagène, l'acide hyaluronique ou le chitosan ont été les premiers utilisés. Souvent, ces polymères naturels sont des molécules faisant partie de la fraction organique d'une matrice minéralisée (os de vertébrés pour le collagène et l'acide hyaluronique, exosquelette pour le chitosan) et sont bio-compatibles. Ils ont une capacité intrinsèque à interagir avec les cellules de l'hôte et favorisent l'adhésion, la prolifération ou la survie cellulaire.

Les polymères synthétiques sont quant à eux, issus du bio-mimétisme. En effet l'architecture complexe de la matrice extracellulaire en 3 dimensions est difficile à mettre en œuvre avec du matériel biologique purifié. Les matériaux synthétiques comme le poly-lactic acid (PLA), le Poly(l-lactide-co-glycolide) (PLGA), ou le Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) en revanche sont facilement modelables, tant au niveau de leur porosité que de leur dégradabilité mais sont peu « actifs » sur les cellules et sont peu ostéoconducteurs. Les composites polymères-céramiques permettent d'associer les avantages des deux matériaux. Par exemple, une fine couche de PLGA déposée sur la surface d'un implant en β TCP permet d'augmenter la porosité et la force mécanique de l'implant (Yoshida et al. 2014), et une fine couche de phosphate de calcium déposée sur des nanofibres de PCL (Mavis et al. 2009) permet d'apporter une ostéoconduction à l'architecture du PCL. Plus récemment, des nanoparticules de céramique ont aussi été incorporées dans des implants polymériques. Il a été montré qu'en faisant varier les concentrations de 3 composants i.e. le polyuréthane, le polylactide, et l'HA le devenir des cellules est largement modifié. Par exemple, la différenciation chondrogénique est stimulée par un implant polyuréthane/polylactide (TPU80/PLA20) contenant 10% de nanoparticules d'HA alors que le même implant contenant 20% d'HA stimule la différenciation ostéogénique (Marycz et al. 2016)

2.2 Les substituts osseux activés (de seconde génération).

Les substituts osseux de première génération, bien que largement utilisés en clinique pour le comblement de défaut osseux de petite taille, ne permettent pas de combler des défauts $> 1 \text{ cm}^3$. Seule la périphérie de l'implant est envahie par le néo-tissu osseux hôte par ostéoconduction, mais pas le cœur de l'implant. Aussi, des substituts osseux de seconde génération ont été développés pour répondre aux critères d'ostéoinduction et/ou d'ostéogénèse qui ne sont pas intrinsèquement présents dans les matériaux et sont destinés aux situations où la capacité ostéogène de l'hôte est limitée. On pourra parler de substituts osseux activés lorsque les matériaux présentés précédemment seront combinés à une ou plusieurs composantes

bioactives et que celle-ci pourra être quantifiée (Deev et al. 2015). Lorsque cette composante sera cellulaire, on parlera de « substituts osseux cellularisés », lorsque ce seront des facteurs de croissance ou des molécules de signalisation, on parlera de « substituts osseux protéo-activés » et lorsque ce sera un acide nucléique, on parlera de « substitut osseux génétiquement activé ».

2.2.1 Les produits d'ingénierie tissulaire cellularisés

2.2.1.1 Les cellules stromales multipotentes

De nombreux types cellulaires font l'objet d'une recherche approfondie pour évaluer leur potentiel régénératif en particulier depuis la découverte de la présence de cellules souches adultes dans la plupart des organes. En 1974, Friedenstein montre que dans la moelle osseuse, il existe une population de cellules adhérentes de type fibroblastique en faible proportion (0.01 à 0.001% des cellules mononuclées), capables de former *in vitro* des « unités formant des colonies », CFU-F c'est-à-dire capable d'auto-renouvellement. Il montre aussi qu'une partie de ces colonies individuelles est capable de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes *in vitro* et est capable de développer du tissu fibreux, du cartilage, et de l'os (éventuellement contenant de la moelle osseuse) lorsqu'implantées *in vivo* (Friedenstein et al. 1974, 1987, Friedenstein 1980). Ces cellules ont depuis été nommées « Cellules souches mésenchymateuses », « Cellules Stromales Mésenchymateuses » ou « Cellules Stromales Multipotentes Mésenchymateuses » suivant les auteurs, tout en gardant l'acronyme CSM(s) (Caplan 1991). Depuis, des cellules multipotentes similaires aux CSMs de la moelle osseuse ont été découvertes dans le tissu adipeux (Williams et al. 1991, Gronthos et al. 2001, Beltrami et al. 2003) et dans la plupart des tissus conjonctifs. Les CSMs jouent un rôle physiologique dans la réparation naturelle du tissu duquel elles proviennent, sont non-immunogènes et ont aussi un rôle immuno-modulateur qu'autorise leur important pouvoir sécrétoire. En effet, les CSMs peuvent par exemple inhiber la prolifération des lymphocytes T ou induire la polarisation des macrophages. Ce sont toutes ces propriétés intrinsèques qui peuvent être utilisées en ingénierie tissulaire (IT). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, deux modes d'action sont attribués aux CSMs. Tout d'abord, les CSMs ont un effet direct en se différenciant en ostéoblastes et sont donc capables de synthétiser du tissu osseux. Par exemple, des CSM de souris exprimant le gène rapporteur de la Luciférase et injectées par voie veineuse chez une souris ayant subi une fracture ont été observées au niveau du site de fracture et se sont différenciées en ostéoblastes et en ostéocytes. De plus, ce traitement a augmenté le contenu en cartilage et en os du cal (Granero-Molta et al. 2009). Les CSM ont également des propriétés paracrines, c'est-à-dire qu'elles sécrètent de nombreuses molécules solubles qui vont agir sur

d'autres types cellulaires. L'ensemble des biomolécules sécrétées, nommé « sécrétome » s'avère avoir un fort potentiel régénératif, ayant des effets sur l'inflammation, l'angiogenèse, et le recrutement de cellules progénitrices. Par exemple, l'IL1 β , une cytokine pro-inflammatoire présente très tôt lors de la cicatrisation osseuse, a pour effet d'induire la sécrétion de facteurs chimiotactiques et angiogéniques comme l'Il-6, l'Il-8 ou RANTES par les CSMs. Ces propriétés sécrétoires font des CSMs un vecteur intéressant pour libérer un panel de cytokines dans une zone lésée ciblée. Il est de plus possible d'orienter le profil sécrétoire des CSMs par des pré-conditionnements. C'est le cas d'un pré-conditionnement hypoxique des CSMs qui entraîne une réponse sécrétoire chimiotactique et angiogénique (Paquet et al. 2015).

2.2.1.2 Les CSM dans les substituts osseux cellularisés

Le schéma classique de l'utilisation de CSMs pour l'ingénierie tissulaire (IT) est tout d'abord d'isoler les CSMs du patient, de les amplifier, puis de les combiner à un biomatériau et enfin d'implanter ce substitut osseux chez le patient (figure 10). La preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de ce type de matériau cellularisé pour la réparation de grand défaut osseux chez le grand animal a été faite chez la brebis, le chien, ou la chèvre (Kon et al. 2000, Petite et al. 2000, Schliephake et al. 2001). En particulier, une étude pré-clinique au laboratoire B2OA a montré qu'un implant composé de granules de corail et de CSMs autologues avait un pouvoir régénératif aussi performant que l'autogreffe dans trois cas sur sept (Petite et al. 2000). Malgré cette preuve de concept, des améliorations restent à apporter puisque les résultats obtenus avec les produits d'ingénierie tissulaire sur la réparation démontrent une plus grande variabilité que ceux obtenus avec l'autogreffe (avec laquelle la réparation est effective dans tous les cas).

Parmi les pistes, l'amélioration des matériaux est souhaitable puisque les matériaux utilisés en IT osseuse doivent, en plus d'être ostéoconducteurs, favoriser l'adhésion et la survie, voire la prolifération, la différenciation, et éventuellement orienter le profil sécrétoire des CSMs.

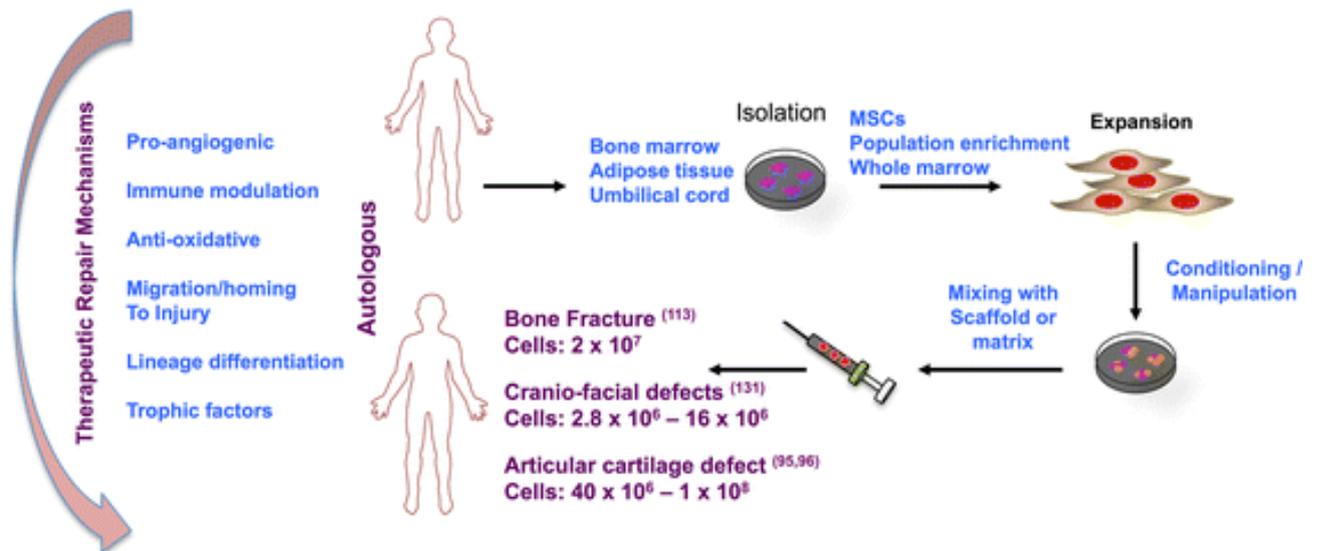


Figure 10 : Usage thérapeutique des CSMs dans les troubles squelettiques

Les CSMs provenant de différentes sources (moelle osseuse, tissu adipeux, cordon ombilical) sont isolées, amplifiées, mise en présence d' (ou cultivées sur) une matrice/un implant puis injectées chez le patient. A gauche sont représentées les propriétés bénéfiques des CSMs (Saeed et al. 2016)).

Pour mieux comprendre le couple matériau/cellules, de nouvelles approches se développent, comme par exemple, les études de « matériomics » (figure 11), cherchant à prendre en compte la complexité des matériaux, (composition chimique, structure cristalline, charge de surface, taille des grains, taille des pores, topographie de surface, microporosité et macroporosité) dans la réponse cellulaire et ce à grande échelle (Schultheiss et al. 2011, Cranford et al. 2013, Groen et al. 2016).

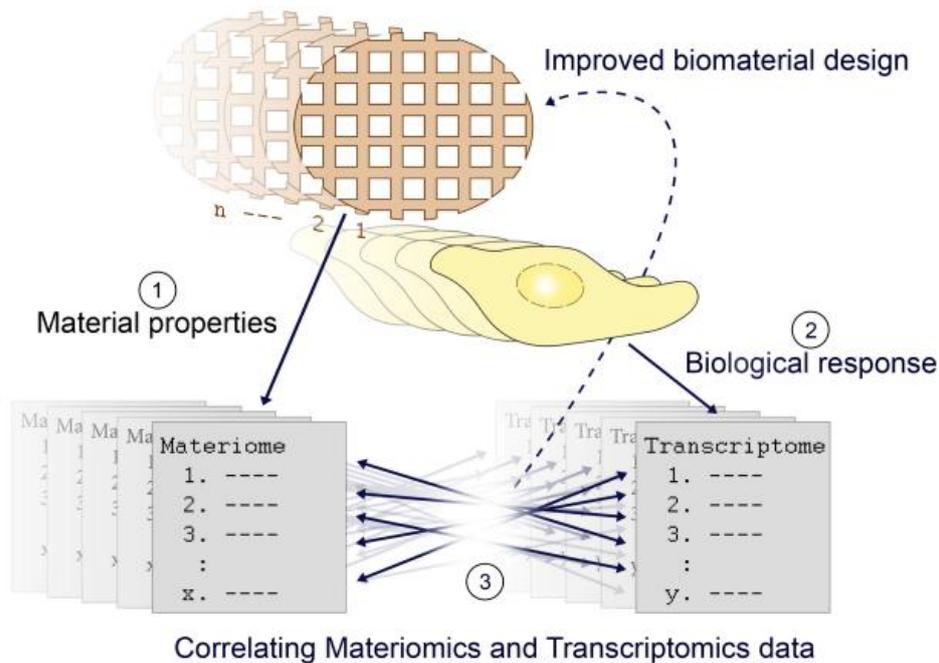


Figure 11 : Apport de la transcriptomique à la matériomique.

La matériomique, i.e. la prédiction, la synthèse puis l'évaluation des propriétés des matériaux à haut débit en combinaison avec les études cellulaires à haut débit (ici transcriptomique mais éventuellement protéomique, cellomique...) permet de confronter les données théoriques avec le comportement réel des cellules sur le matériau. La composition et l'architecture des matériaux peuvent ainsi être améliorées. (De groen, 2016)

2.2.2 Les substituts osseux protéo-activés

Ces substituts pourront aussi être appelés plateforme ou système de libération de facteurs solubles car en général leur rôle est d'apporter au sein du tissu lésé un facteur bioactif. Comme on l'a vu, diverses molécules de signalisation sont libérées à des moments clés par les différents acteurs cellulaires prenant part à la cicatrisation. Ces facteurs peuvent être ostéogènes, c'est-à-dire capables d'induire une formation osseuse directement, chimiotactiques, en attirant les cellules progénitrices endothéliales et osseuses, mitotiques en stimulant la prolifération des cellules progénitrices telles que les CSM et ainsi permettre d'augmenter leur nombre sur le site de lésion, ou encore angiogènes en stimulant l'étape de re-vascularisation du site de lésion pour apporter des nutriments et de l'oxygène. Le but de ces substituts osseux protéo-activés est donc de mimer l'environnement adéquat à une bonne réparation osseuse en stimulant une ou plusieurs phases de la réparation osseuse. Parmi les facteurs potentiellement intéressants pour la régénération osseuse se trouve par exemple le PDGF BB (Platelet Derived Growth Factor) qui est libéré par les plaquettes lors de la formation de l'hématome. Ses effets principaux lors de la réparation osseuse sont dus à ses propriétés chimiotactiques (Fiedler et al. 2002), mitogènes (Ozaki et al. 2007) et angiogènes (Bouletreau et al. 2002). C'est pour l'instant

le seul facteur de croissance, hors BMP, à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA. Celle-ci a été donnée en 2015 pour du rhPDGF BB en association avec du β -TCP (AUGMENT[®] Bone Graft, Wright Medical) pour le traitement de l'arthrodèse de la cheville et de la fracture ouverte du talon. D'autres pistes sont aussi à l'étude comme par exemple l'utilisation du FGF2 (Clinical trial. NCT00734708) pour l'augmentation verticale de l'os alvéolaire lors de parodontites, ou du VEGF dans des défauts maxillo-faciaux (Clinical trial NCT02293031). Hormis ces facteurs, la plupart des travaux aujourd'hui se focalisent sur la libération de BMP-2 en raison de ses propriétés fortement ostéoinductrices (voir Partie 3).

2.2.3 Les substituts osseux génétiquement activés.

Les substituts osseux génétiquement activés ont le même but que les substituts osseux protéo-activés, à savoir introduire sur le site lésé une composante ostéoinductrice. La différence réside dans l'utilisation d'un acide nucléique (plasmide ou virus) codant pour la protéine d'intérêt plutôt que la protéine elle-même. L'avantage affiché de ce système est de permettre la régulation de l'expression du gène (et donc la quantité de protéine sur le site de lésion) par les cellules de l'hôte transfectées *in situ* en fonction du contexte micro-environnemental. Une première étude clinique encourageante a été réalisée (NCT02293031) en utilisant des implants composites collagène-HA activés par un plasmide comportant un gène codant pour le VEGF (Bozo et al. 2016).

3 Les BMPs et leurs applications

3.1 La famille des BMPs

C'est Urist qui, en 1965, découvre qu'un fragment osseux décalcifié induit une formation osseuse lorsqu'il est implanté en site non osseux chez l'animal (Urist 1965). Plus tard, il s'appliquera avec d'autres à isoler et à caractériser les molécules responsables de cette activité qu'il nommera « Bone Morphogenetic Proteins » ou BMPs (Urist and Strates 1971). C'est seulement à la fin des années 80 que les premiers membres de la famille des BMPs ont été purifiés, séquencés puis clonés (Urist et al. 1984, Sampath et al. 1987, Wang et al. 1988, Wozney et al. 1988). En effet, la purification des BMPs n'est pas aisée. Il aura fallu à Wozney 40 kg d'os bovin pour obtenir 40 μ g de protéine purifiée, incluant trois membres de la famille.

La famille des BMPs fait partie de la superfamille du TGF β (facteur de croissance transformant β ou Transforming Growth Factor β). Elle comporte plus de vingt membres (figure12) (BMP-2 à 7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP15, GDF11=BMP11, GDF7=BMP12, GDF6=BMP13,

GDF5=BMP14, GDF2=BMP9, GDF8=Myostatin, GDF9, GDF10=BMP3b et Nodal) dont cinq ont une activité ostéo-inductrice clairement établie (BMP-2, 4, 6, 7 et 9) (Luu et al. 2007).

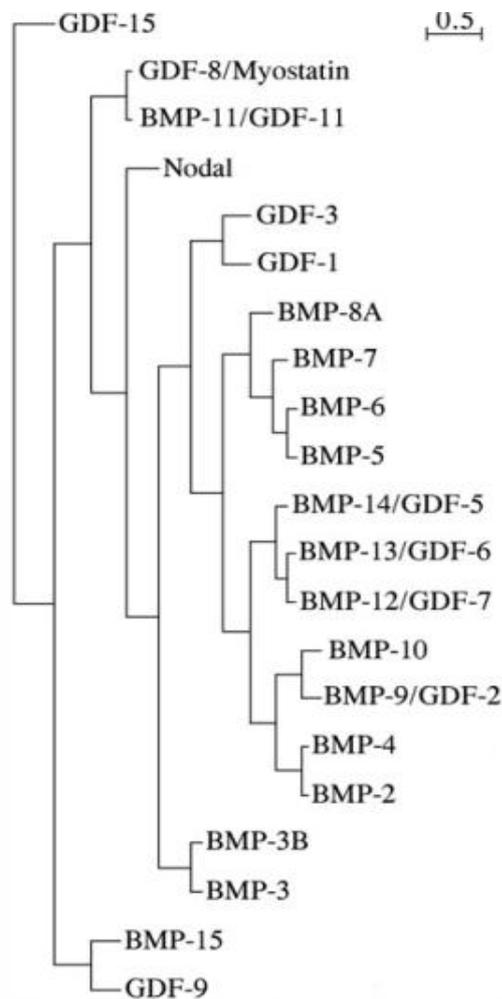


Figure 12 : Analyse phylogénétique des membres de la famille des BMPs.
(Rider and Mulloy 2010)

Les BMPs sont synthétisées sous forme d'une pré-pro-protéine, qui est composée d'un pro-domaine, de la protéine mature et d'un peptide signal en N-terminal qui guide la protéine vers la voie sécrétoire. Le clivage de ce peptide signal et du pro-domaine par des pro-protéines convertases comme la Furine permet la libération de la protéine mature qui se dimérise puis est sécrétée par exocytose. Les BMPs contiennent aussi des sites de N- et O-glycosylation qui augmentent leurs demi-vies et peuvent influencer sur leur sécrétion et leur activité (Hang et al. 2013, Carreira et al. 2014). La structure des BMPs est fortement conservée entre les espèces et entre types de BMPs, et la plupart contiennent dans leur partie C-terminale sept résidus Cystéine. Six des sept cystéines forment un nœud ou « cystein Knot », c'est-à-dire qu'elles forment des ponts disulfure deux à deux dans un même monomère ce qui permet le repliement

du peptide. Le septième résidu est impliqué dans la formation du pont disulfure entre deux monomères de BMP formant ainsi des homo- et éventuellement des hétéro-dimères (Neugebauer et al. 2015) (figure 13).

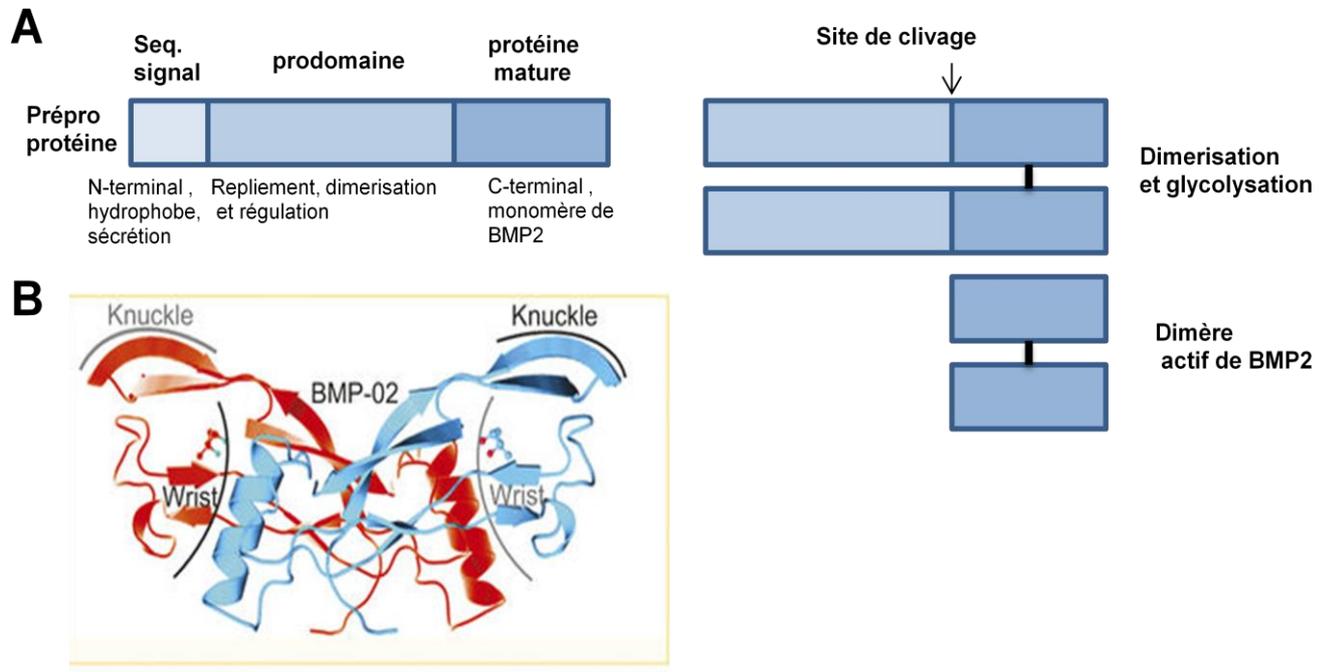


Figure 13 : Structure de la BMP-2.

A. Schéma des différents domaines de la préproprotéine BMP-2 et maturation en dimère de BMP-2 actif. B. Sont représentés 2 monomères de BMP-2 (1 rouge et 1 bleu). La partie centrale du dimère regroupe les 6 ponts disulfures du « cystein knot ». Les épitopes « Knuckle » et « Wrist » sont les épitopes de liaisons aux récepteurs. (Rahman et al. 2015).

Les BMPs sont produites par divers types cellulaires (cellules endothéliales, ostéoblastes, chondroblastes, macrophages) et leurs fonctions sont pléiotropiques bien qu'étant initialement décrites comme promouvant la synthèse osseuse. En effet, nous savons aujourd'hui qu'en plus de leur fonction dans la formation osseuse, les BMPs sont impliquées dans le développement de la plupart des organes tels le cœur, les poumons, les reins, l'œil (tableau 2), dans l'homéostasie du fer (BMP6) ou du glucose (BMP6) et dans des maladies comme l'hypertension artérielle pulmonaire (BMPR2, BMP9), le diabète ou l'obésité (BMP7) (Wang et al. 2014b, Hiepen et al. 2016), ce qui leur valent aujourd'hui le surnom de « Body Morphogenetic Proteins » (figure 14).

Tableau 2 : Fonctions biologiques des membres de la famille des BMPs.
D'après (Rahman et al. 2015)

Sous type(s)	Fonction(s) Biologique(s)
Ligand(s)	
BMP-2/BMP-2a	Inducteur de la morphogénèse osseuse et impliqué dans la formation du cœur.
BMP3A/Ostéogénine	Inhibiteur de la morphogénèse osseuse, chemo-attractant, induit synthèse et sécrétion de TGF- β 1 par les monocytes.
BMP4/BMP-2B	Impliqué dans l'induction osseuse, la formation du cartilage, des reins, des dents, et la réparation des fractures.
BMP5	Impliqué dans l'embryogénèse précoce du squelette, le développement des membres et la morphogénèse osseuse.
BMP6/Vrg1, Dvr6	Rôle actif dans l'induction de la différenciation des CSMs en ostéoblastes.
BMP7/OP1	Rôle dans l'homéostasie osseuse, la régulation du calcium et la formation des reins.
BMP8A/OP2	Rôle dans la morphogénèse osseuse et dans la spermatogénèse
BMP8B/OP3	Impliqué dans la spermatogénèse chez la souris.
BMP9/GDF2	Rôle actif dans l'induction de l'ostéogénèse et la différenciation des CSMs. Fonction dans le système hépatique et nerveux.
BMP10	Morphogénèse cardiaque (trabéculatation du Cœur embryonnaire).
BMP11/GDF11	Rôle embryonnaire dans le développement de la moelle épinière, du squelette, du pancréas, des reins et des yeux.
BMP12/CDMP3, GDF7	Impliqué dans la formation des tendons et ligaments ainsi que dans la réparation et le développement des neurones sensoriels.
BMP13/CDMP2, GDF6	Impliqué dans la chondrogénèse.
BMP14/CDMP1, GDF5	Molécule pro-survie pour les neurones dopaminergiques. Augmente la réparation des tendons et la formation osseuse.
BMP15/GDF9b	Rôle dans le développement et la fonction ovarienne.
BMP16/Nodal	Structuration embryonnaire.
BMP17/Lefty	Structuration embryonnaire.
BMP18/Lefty	Structuration embryonnaire.

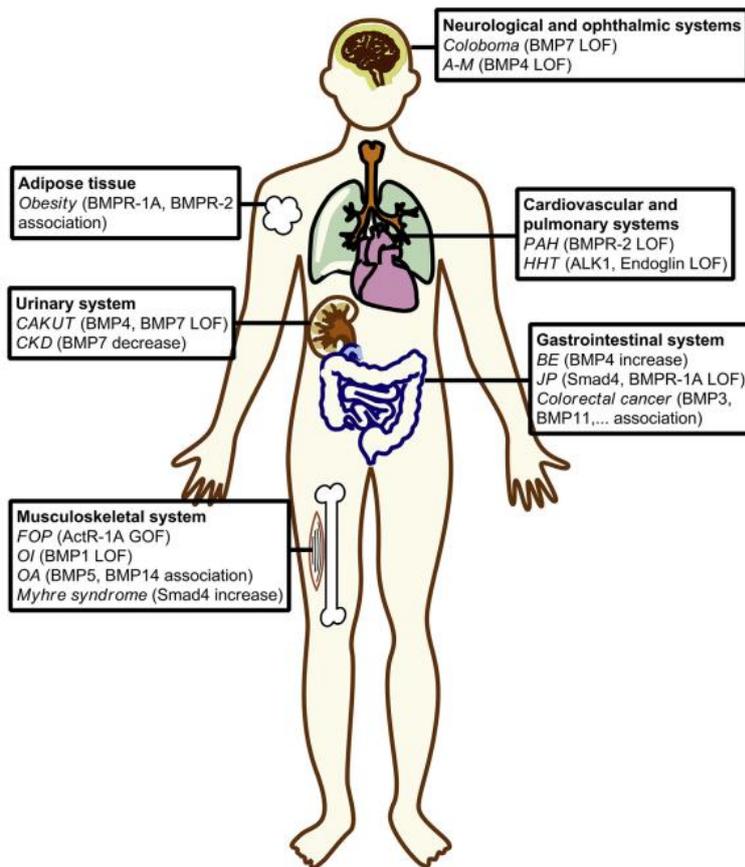


Figure 14 : Membres de la famille des BMPs ou protéines appartenant aux voies de transduction de signaux des BMPs impliqués dans différentes maladies humaines.

Certaines mutations impliquées dans les pathologies humaines peuvent causer un gain ou une perte de fonction d'une protéine de la voie BMP. Les BMPs ayant un rôle pléiotropique, les pathologies associées touchent un grand nombre d'organes différents. Abbreviations: LOF, loss-of-function; GOF: gain-of-function; CAKUT, congenital anomalies of the kidney and urinary tract; CKD, chronic kidney disease; FOP, fibrodysplasia ossificans progressiva; OI, osteogenesis imperfecta; OA, osteoarthritis; A e M, anophthalmia e microphthalmia; PAH, pulmonary arterial hypertension; HHT, hereditary hemorrhagic telangiectasia; BE, Barrett esophagus; JP, juvenile polyposis (Wang et al. 2014b).

3.2 Mode d'action des BMPs

Les dimères de BMP-2, comme tous les membres de la superfamille du TGF β agissent via l'activation d'une cascade de signalisation commençant par la liaison à des récepteurs transmembranaires à activité Sérine/Thréonine Kinase de deux types, les BMPR-I et les BMPR-II. Ces derniers peuvent exister sous forme homomérique ou hétéromérique ce qui fait que deux modes d'actions de la BMP-2 sont possibles (Nohe et al. 2002) :

-Dans la voie canonique, une partie des récepteurs BMPR-I et BMPR-II forment un complexe préformé à la membrane plasmique, *de novo*. Les dimères de BMP-2, en se liant au BMPR-I, induisent une phosphorylation de celui-ci, qui à son tour phosphoryle les protéines intracellulaires Smad 1/5/8. Celles-ci forment alors un complexe avec Smad4 dans le cytoplasme. Ce complexe est finalement transloqué dans le noyau, se lie au domaine BRE

(« BMP responsive element ») de certains gènes (Katagiri et al. 2002) et va ainsi moduler leur expression. C'est le cas pour RUNX2, un facteur de transcription clef de la différenciation ostéogénique des CSM (Lee et al. 2002).

-Dans la voie non-canonique, le complexe BMPRI/BMPRII n'est pas formé avant la liaison au ligand et les récepteurs sont spatialement séparés (Yadin et al. 2016). Pour déclencher la cascade d'activation, la BMP-2 se lie tout d'abord à BMPRI (récepteur de haute affinité) induisant son homo-dimérisation. Il s'ensuit le recrutement de BMPRII puis la phosphorylation du domaine riche en glycine et sérine (GR domain) de BMPRI par BMPRII. Le complexe formé par le dimère de BMP et l'hétéro-oligomère de BMPRI induit alors une cascade de signalisation non-SMAD dépendante aboutissant à l'activation de la P38MAPK (Rodríguez-Carballo et al. 2016). Là encore, de nombreuses cibles comme RUNX2, DLX5 ou Osterix sont phosphorylées par P38, augmentant soit leurs expressions soit leurs activités. C'est principalement la voie non canonique qui va induire l'augmentation de l'expression de la phosphatase alcaline (PAL ou TNAP). Ces deux voies d'activation, en concordance avec d'autres voies comme la voie WNT et la voie Ihh vont finalement aboutir à la différenciation progressive de cellules progénitrices en cellules osseuses, mais aussi à la production et à la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse (figure 15).

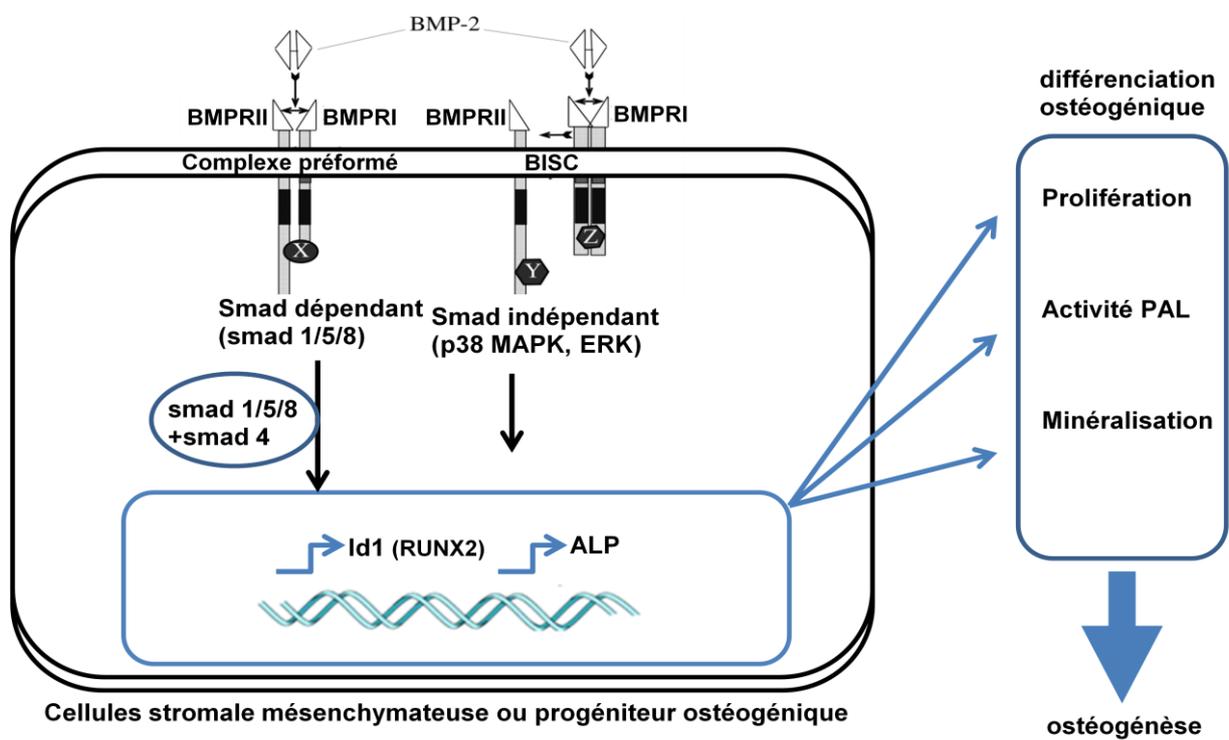


Figure 15 : les deux voies de signalisation de BMP-2 : Smad dépendante et smad indépendante. Dans la voie smad dépendante, le complexe des récepteurs BMPR-I et BMPR-II est préformé. La ligation de la BMP-2 induit la phosphorylation de BMPR-I puis la cascade smad. Dans la voie smad indépendante, BMPR-I forme un homodimère. La ligation de la BMP-2 induit le recrutement de BMPR-II puis l'activation de la voie P38 MAPK. Ces deux voies induisent différents gènes pour moduler la différenciation des cellules ostéocompétentes. (Wang et al. 2014a) (BMPR : bone morphogenetic receptor, BISC : BMP induced signaling complex)

Les effets pléiotropiques des BMPs impliquent une régulation spatio-temporelle fine, tant au niveau des récepteurs qu'au niveau des BMPs elles-mêmes. L'activation des récepteurs peut être augmentée par exemple par les protéoglycanes, en particulier par les héparanes sulfates qui agissent alors comme des co-activateurs. A l'inverse, de nombreuses protéines, elles-mêmes ayant une régulation spatiotemporelle fine, inhibent l'activation des récepteurs en se liant directement aux BMPs. C'est le cas par exemple des protéines Chordin, Noggin et Gremlin qui forment avec la BMP-2 (entre autres) des complexes empêchant la liaison aux récepteurs et l'activation qui s'ensuit (figure16 et 17) (Mulloy and Rider 2015, Sanchez-Duffhues et al. 2015).

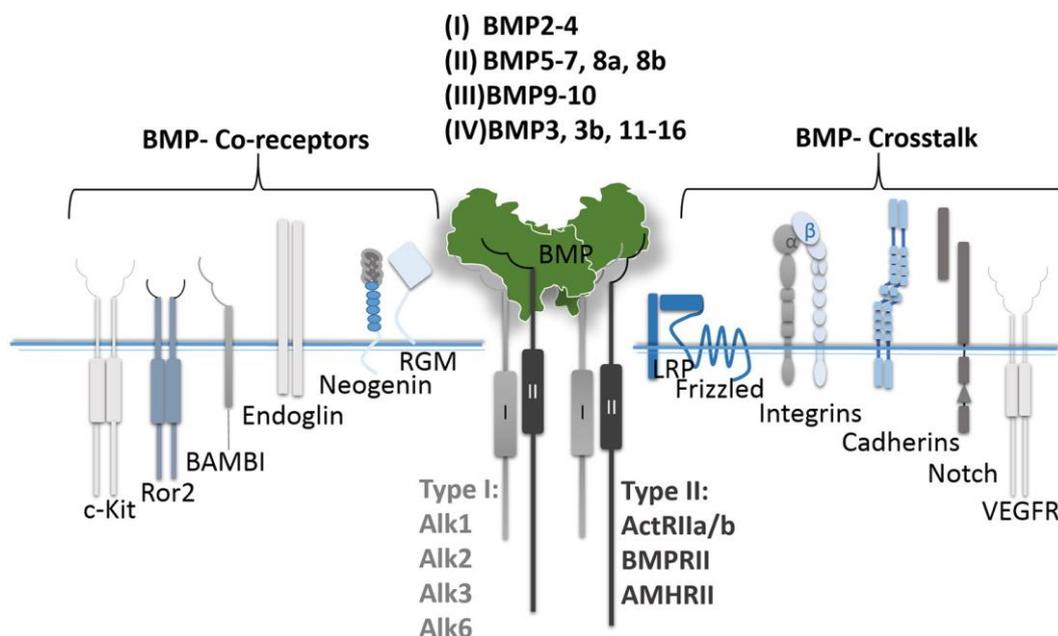


Figure 16 : Représentation des différentes familles de BMPs, des deux types de récepteurs, de leur co-récepteurs, et des récepteurs à d'autres ligands pouvant influencer sur la voie de transduction de signal des BMPs. (Sanchez Duffhues, 2015)

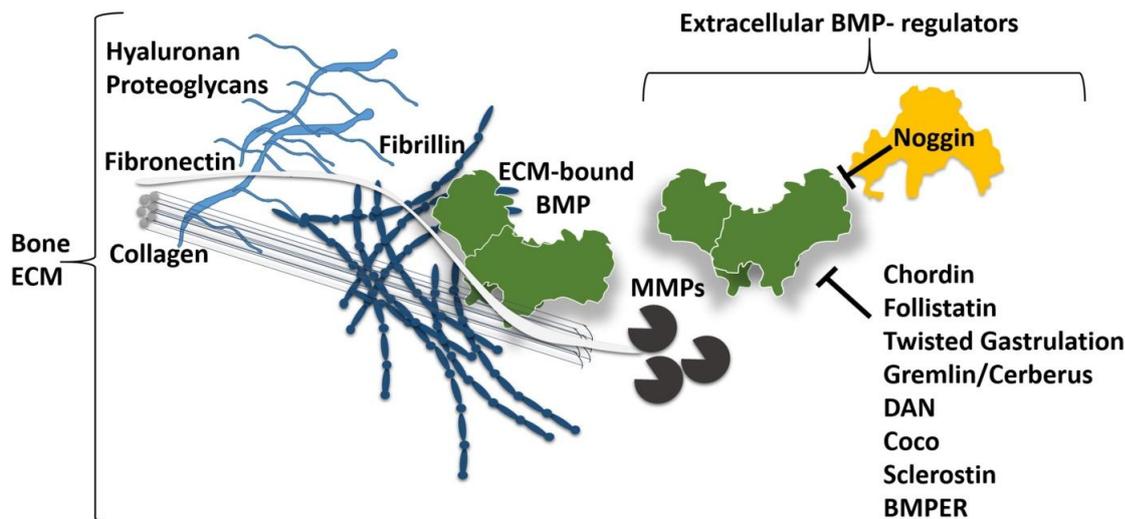


Figure 17 : Représentation des différents régulateurs des BMPs.

Les protéines solubles extracellulaires comme la Chordine peuvent séquestrer les BMPs pour les empêcher d'activer leurs récepteurs. Les composants de la MEC peuvent servir de réservoir, ou générer un gradient de BMPs (d'après Sanchez Duffues 2015).

La BMP-2 a aussi des propriétés angiogènes et chimiotactiques et est capable en particulier d'induire directement la migration et la différenciation de cellules endothéliales avec une potentialité similaire au VEGF (Finkenzeller et al. 2012). Ces effets pro-angiogènes de la BMP-2, mais aussi de la BMP4/6/9 et 10 utilisent également la voie SMAD 1/5/8 et la voie non-SMAD. Elle peut aussi agir indirectement, en induisant la libération par les CSMs d'autres facteurs chimiotactiques ou angiogènes comme le facteur de croissance placentaire (PIGF) (Raida et al. 2006). De plus, la BMP-2 agit sur les ostéoclastes, en augmentant leur différenciation et leur maturation, mais aussi en augmentant la synthèse de cathepsine K et d'anhydrase carbonique, deux protéines dégradant la matrice osseuse. La BMP-2 joue aussi un rôle sur l'inflammation, elle a en effet un pouvoir chimiotactique pour les lymphocytes, les monocytes et les macrophages.

3.3 Utilisation en clinique

Il a été montré que la capacité ostéoinductrice de la BMP-2 est suffisante pour générer de l'os *de novo* y compris en situation ectopique (Whang et al. 1998), et qu'elle est nécessaire à l'initiation de la réparation des fractures (Tsuji et al. 2006). En effet, dans un modèle murin utilisant un Knock-Out conditionnel de BMP-2 ciblé sur les membres, aucun signe de réparation d'une fracture préalablement créée n'est visible après 20 jours malgré l'expression normale des autres BMPs ostéoinductrices. Dans ce contexte, les CSMs sont présentes sur le site de la lésion mais ne sont pas capables de se différencier. Plus récemment, des études

cliniques ont montré que la BMP-2 (adsorbée sur une éponge de collagène) avait un bénéfice/risque équivalent à l'autogreffe osseuse dans la fusion lombaire (arthrodèse) faisant suite à une dégénérescence du disque intervertébral. La BMP-2 sous sa forme associée à l'éponge de collagène (Inductos®, Medtronic) a donc été autorisée pour cette application ainsi que dans le cas de fractures tibiales chez l'adulte (à noter que depuis 2015, son autorisation de mise sur le marché a été suspendue pour cause de déviation des bonnes pratiques de fabrication de l'éponge de collagène). Malgré ces bons résultats, la BMP-2 souffre d'effets secondaires importants comme la formation d'os ectopique, une ostéolyse, une forte inflammation, de la dysphagie voire même la suspicion de la promotion de cancers (Shields et al. 2006, Boerckel et al. 2011a, Epstein 2013), en particulier, lorsque son utilisation sort de sa prescription initiale. Il a été montré que les fortes doses utilisées sont responsables de ces effets secondaires. Dans un modèle de grand défaut osseux chez le rat, une concentration de 300 µg/ml de BMP-2 induit des kystes osseux et une forte inflammation, sans bénéfice quant à la réparation du défaut osseux par rapport à une dose 10 fois moindre (Zara et al. 2011). Chez l'homme, les fortes doses utilisées (1,5mg/ml) s'expliquent par la demi-vie courte de la BMP-2 (7-16 min selon l'espèce) et sa clairance rapide (McKay 2006). Aussi, l'éponge de collagène utilisée actuellement pour la délivrer en clinique ne permet pas sa rétention sur le site de lésion pour une longue durée puisque 50% de la protéine est libérée dans les trois premiers jours (Friess et al. 1999a, 1999b, Boerckel et al. 2011b). En comparant des matériaux qui libèrent la BMP-2 rapidement ou sur le long terme, il a été montré que la BMP-2 est plus efficace lorsqu'elle est présente plus longtemps (Jeon et al. 2008). Aussi, la concentration locale de BMP-2 est corrélée à son pouvoir ostéogène (Uludag et al. 2000). Ces résultats, ainsi que la connaissance des propriétés chimiotactiques et ostéogéniques de la BMP-2, ont permis l'élaboration d'une hypothèse pharmacocinétique optimale de BMP-2 (Uludag et al. 1999). Le profil de libération de la BMP-2 devrait se faire en deux temps : (i) tout d'abord une forte libération qui permettrait le recrutement des cellules d'intérêt environnantes, (ii) puis une libération sur le long terme qui permettrait d'induire la différenciation ostéoblastique des CSM. Cependant, ceci reste une hypothèse et des données plus récentes suggèrent que la quantité résiduelle de BMP-2 sur l'implant, *i.e.* après la libération initiale, est un critère plus probant pour la réparation d'un grand défaut osseux (Bouyer et al. 2016). La dose et la cinétique de libération sont donc des facteurs primordiaux pour que la BMP-2 puisse agir de façon efficace et sans risque. Il est donc important de trouver des systèmes de libération permettant de délivrer une fraction suffisante de BMP-2 dans les premiers temps opératoires (sans pour autant en libérer trop pour éviter les effets secondaires) mais aussi sur une durée plus longue.

3.4 Systèmes de libération de la BMP-2

De nombreux systèmes de libération de BMP-2 sont à l'étude, tous ayant pour but commun de réduire les doses implantées et de permettre une libération prolongée de BMP-2. Les polymères synthétiques tiennent toute leur place dans cette stratégie puisque qu'ils peuvent être aisément chimiquement modifiés pour favoriser la rétention de la BMP-2. Plusieurs stratégies sont utilisées pour retenir la BMP-2. Elle peut être simplement adsorbée comme dans le cas de l'éponge de collagène ; elle peut être adsorbée puis recouverte d'une couche protectrice pour limiter sa libération ; elle peut être greffée de façon covalente ; elle peut être incorporée dans un polymère lors de sa solidification ; ou bien encore déposée sous forme de couches entre d'autres couches de polymères de charge opposée (figure 18) (Wang et al. 2014a). Cette technique dite de « Layer by Layer » (LbL) permet de disposer de réserves de BMP-2 (Crouzier et al. 2009). L'incorporation de BMP-2 dans des multicouches formées de Poly-L-lysine et d'acide hyaluronique a montré son utilité dans la réparation d'un grand défaut osseux chez le rat (Bouyer et al. 2016).

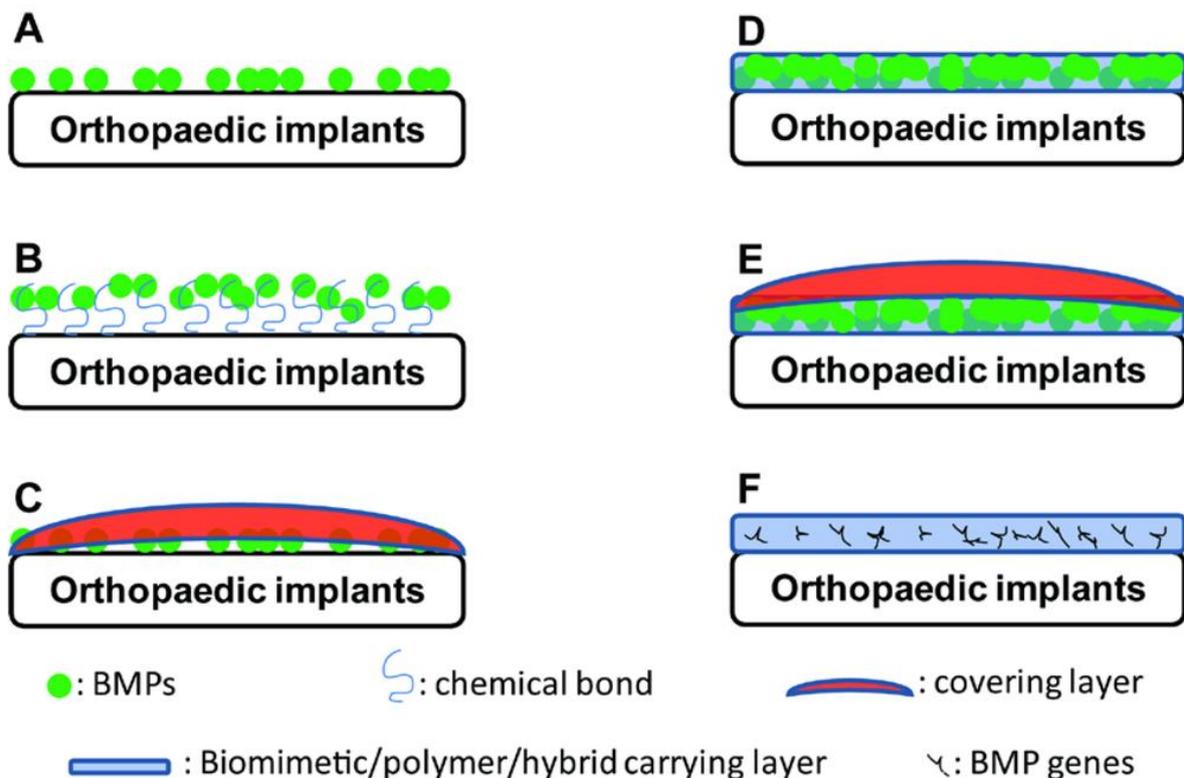


Figure 18 : Illustration des différents systèmes de libération de BMP-2.

(A) adsorption directe; (B) Immobilisation par pont chimique; (C) Adsorption puis ajout d'une couche de protection; (D) Incorporation dans un polymère (E) combinaison de C et D; and (F) Incorporation d'un gène codant pour la BMP-2 dans un polymère (Wang et al. 2014a)

Les phosphates de calcium ont eux aussi montré des capacités de rétention de la BMP-2 de par leur porosité importante et leur forte affinité pour les protéines (Ginebra et al. 2006).

Les polymères synthétiques et les céramiques sont donc des supports prometteurs pour la libération de BMP-2. Historiquement, le premier matériau utilisé pour libérer de la BMP-2 a été le collagène, et c'est d'ailleurs toujours le seul support ayant été autorisé pour une utilisation en clinique. Il y a donc toujours un intérêt à l'étude des matrices organiques naturelles pour la libération de la BMP-2, en particulier car cette dernière comporte un domaine de liaison à l'héparine, qui lui permet de se lier aux GAGs de la matrice extracellulaire.

4 La matrice extracellulaire osseuse

4.1 Définition et composition

La matrice extracellulaire est l'environnement en trois dimensions dans lequel les cellules évoluent. Elle permet l'adhésion cellulaire, et procure aux cellules de multiples signaux régulant entre autres leur prolifération, leur polarisation et leur différenciation. Comme les autres tissus conjonctifs, le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire. Celle-ci est sécrétée par les ostéoblastes qui, après l'avoir déposée, la minéralisent. La partie organique de la MEC osseuse est composée principalement de collagène de type I à 90%. D'autres collagènes minoritaires sont aussi retrouvés en son sein, en particulier les collagènes III, V et X. Ces collagènes sont organisés sous forme de fibres et forment la structure du tissu osseux. Parmi les autres composants de la MEC osseuse, on trouvera

- des protéines de type GLA (Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxyglutamic acid), liant les ions Ca^{2+} (et donc l'HA), comme l'ostéocalcine et la matrix GLA protein (MGP). Ces protéines modulent la croissance des cristaux d'HA et agissent comme des inhibiteurs de la minéralisation (Cancela et al. 2014).
- des glycoprotéines à domaine RGD dites SIBLING pour « small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein » (Staines et al. 2012), dont font partie la bone sialoprotein (BSP), l'ostéopontine, la « dentin matrix protein 1 » (DMP-1) et la « matrix extracellular phosphoglycoprotein » (MEPE). Ces protéines sont sécrétées lors de la phase de minéralisation et y participent positivement ou négativement. La BSP, par exemple, est considérée comme étant le nucléateur de la déposition des cristaux d'hydroxyapatite (Staines et al. 2012).

- des protéoglycanes (PGs). Ce sont des protéines associées à des glycosaminoglycanes. Il existe quatre types de GAGs suivant le sucre associé ; les sulfates de chondroïtine et de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane et le Hyaluronane qui est le seul GAG à ne pas être associé à un corps protéique. Les PGs peuvent contenir plusieurs chaînes de GAGs différents, pouvant avoir différents niveaux de sulfatation, ajoutant encore un niveau de complexité. Ils appartiennent à différentes familles suivant leur localisation (Tableau 3) et sont impliqués dans la transduction de signal, la stabilité et l'organisation des fibres de collagène, la rétention et la modulation de l'activité des facteurs de croissance.
- des protéines d'adhésion comme la fibronectine ou la laminine qui permettent l'adhésion des cellules à la MEC
- des métalloprotéases, qui sont impliquées dans le remodelage de la MEC.

Tableau 3 : Les différents types de protéoglycanes.

(Adapté de <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php#proteoglycans>)

Famille	PGs	GAGs	Fonction	Localisation
Protéoglycanes Interstitiels : SLRPs ("small leucine-rich protéoglycanes")	Biglycan, Décorine	chondroïtine sulfates (CS) dermatan sulfates (DS)	stabilisation organisation des fibres de collagènes.	Tendons
	Lumican, Fibromoduline, Kératocan, Mimécane	kératane sulfates		Cornée
Protéoglycanes Interstitiels : Famille des lectican ou des agrécane	Aggrécane	-Domaine N-terminal qui peut lier l'hyaluronane.	stabilisation organisation des fibres de collagènes	Cartilage
	Brévécane	-Les CS et DS sont attachés au domaine central		Système nerveux
	Neurocane			
	Versicane			
Protéoglycanes de la membrane basale	Perlécane	-Héparane Sulfate (HS) ou HS&CS	Séparation tissu/tissu conjonctif	
	Aggrin	-HS		
	Coll. type XVIII	-HS		
	Leprécane	-CS		
Protéoglycanes des granules sécrétoires	Serglycine	-héparine -CS		Cellules endothéliales, endocrines, et hématopoïétiques
Protéoglycanes associés aux membranes	Syndécans	-Syn1-3 : CS & HS -Syn 2/4 : HS	Transduction de signal cellules/MEC	
	Glypicans	-HS	Régulation voies de signalisation (Wnt, iHH, FGF,BMP)	

*Protéoglycanes retrouvés dans la MEC décellularisée

L'une des particularités de la MEC est d'être un réservoir protecteur pour les facteurs de croissance. En particulier, les « Heparin-binding growth factor », incluant les membres de la famille du FGF, de la famille du TGF β , le VEGF, le PDGF et l'HGF se lient aux sulfates d'héparanes (Whitelock and Iozzo 2005), et il a été montré que le FGF-10 peut être relargué par une héparanase (Patel et al. 2007). Les facteurs de croissance piégés dans la MEC peuvent être inactifs en attendant d'être libérés mais ils peuvent être aussi actifs et leur action est alors modulée par les GAGs, qui agissent comme co-récepteur, comme c'est le cas pour la BMP-2 (Hintze et al. 2014) ou le VEGF (Whitelock and Iozzo 2005).

4.2 MEC et ingénierie tissulaire osseuse

4.2.1 Composants de la MEC et ingénierie tissulaire osseuse

Parmi les composants de la MEC, nombreux sont ceux qui sont utilisés soit pour optimiser un implant cellularisé, soit pour servir de plateforme de libération de facteurs de croissance. Les propriétés adhésives de la fibronectine sont par exemple utilisées pour recouvrir des polymères synthétiques comme le PLA pour améliorer la prolifération de fibroblastes sur le polymère (Boccafoschi et al. 2012). De la fibronectine co-précipitée avec du phosphate de calcium sur de l'hydroxyapatite augmente la différenciation ostéoblastique des CSMs (Sogo et al. 2007). Il est aussi possible d'utiliser plusieurs composants de la MEC pour former un implant. Mathews *et al.* ont synthétisé un composite polymérique triple composé de chitosan et de deux composants de la MEC, le collagène de type I et l'acide hyaluronique et démontrent que ce composite induit une meilleure différenciation ostéogénique des CSMs que les trois composants séparés *in vitro* (Mathews et al. 2011). Aussi, plusieurs composants de la MEC présentent une affinité pour la BMP-2 et sont proposés pour servir de système de libération de la BMP-2 (tableau 4). Certains PGs comme le Perlecan contiennent des héparanes sulfates qui ont une haute affinité pour le « domaine de liaison à l'héparine » de la BMP-2. D'autres GAGs ont aussi une affinité pour la BMP-2. C'est le cas du dermatan-sulfate (Kisiel et al. 2013) qu'on retrouve dans la décorine et le biglycan. D'autres protéines de la MEC ont également une affinité plus ou moins forte pour la BMP-2; c'est le cas de la fibronectine qui a une affinité équivalente aux héparanes sulfates, et des collagènes de type I et II qui, eux, ont une affinité faible (en regard de celles des GAGs tel que l'HS), mais néanmoins non négligeable (Martino et al. 2014).

Tableau 4 : Principaux composants de la MEC ayant une affinité pour la BMP-2.

Composant	Affinité avec BMP-2 (Kd) M	Auteur	Référence
Héparine	$2.4 \pm 0.3 \times 10^{-9}$	Kisiel	(Kisiel et al. 2013)
Sulfate de dermatan	$2 \pm 0.8 \times 10^{-8}$	Kisiel	(Kisiel et al. 2013)
Fibronectine	1.92×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
Fibrinogène	4.71×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
Tenascine C	4.78×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
Sulfate d'Héparane	1.71×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
Ostéopontine	2.55×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
vitronectine	9.47×10^{-8}	Martino	(Martino et al. 2014)
Spp24, spp16, spp14.5, spp18.1	Env 1×10^{-8}	Brochmann	(Brochmann et al. 2009)
Biglycan	ND	Mighez	(Miguez et al. 2014)
Collagène I	$10^{-3} - 10^{-4} / 10^{-7} *$	Morin / Martino	(Martino et al. 2014), (Morin et al. 2006)
Collagène II	10^{-7}	Sieron	(Sieron et al. 2002)
Agtrin	$2,62 \times 10^{-7}$	Bányai	(Bányai et al. 2010)
dMEC **	4.2×10^{-10}	Bhat	(Bhat et al. 2011) Erreur ! Source du renvoi introuvable.

*Différences suivant les auteurs

** il s'agit de l'affinité mesurée d'une BMP-2 fluorescente sur une dMEC produite par des ostéoblastes humains de calvaria.

L'interaction de la BMP-2 avec les PGs/GAGs peut avoir des effets opposés. Il a été montré que la présence de biglycan augmente l'effet de la BMP-2 sur la minéralisation *in vitro* et la formation osseuse *in vivo* (Miguez et al. 2014). Cet effet est médié par la partie protéique du biglycan car les GAGs associés (Chondroïtine Sulfate, CS) ont plutôt un effet inhibiteur sur la minéralisation (Miguez et al. 2011). D'autres GAGs, comme les héparanes sulfates, sont au contraire décrits comme augmentant l'activité de la BMP-2 (Decarlo et al. 2012, Bramono et al. 2012).

4.2.2 MEC intégrale et ingénierie tissulaire osseuse

Au vu des propriétés individuelles des composants de la MEC, un implant composé d'une MEC intégrale permettrait donc d'avoir une multitude d'interactions de plus ou moins grande affinité entre la BMP-2 et ses composants, ce qui déterminerait un profil de libération unique et potentiellement intéressant. L'affinité de la BMP-2 pour une MEC produite par des ostéoblastes de calvaria a déjà été mesurée. ($4.4 \cdot 10^{-10}$, (Bhat et al. 2011)) De plus, Kang et al ont montré qu'effectivement, une MEC décellularisée (dMEC) issue de la culture de CSMs humaines en condition ostéogénique sur un implant en β -TCP pendant 14 jours, permettait non seulement la rétention de BMP-2, mais aussi sa libération à plus long terme qu'avec un implant β -TCP avec BMP-2 mais sans dMEC (Kang et al. 2011). Plus encore, les autres propriétés de la MEC peuvent être intéressantes pour la formation osseuse. En effet, il a été montré qu'un support recouvert d'une dMEC augmente l'adhésion, la prolifération, la différenciation des CSMs cultivées sur ce support et maintient leur caractère souche (Datta et al. 2005, Chen et al. 2007, Lai et al. 2010, Lu et al. 2011, Decaris et al. 2012b, Guo et al. 2013, Pati et al. 2014, Rao Pattabhi et al. 2015). De plus, il a été démontré dans un défaut fémoral chez la souris que des CSMs pré-ostéodifférenciées et ré-ensemencées sur une dMEC permettaient la réparation d'un défaut osseux dans 6 cas sur 10 alors que c'était le cas en moyenne dans 1,25 sur 10 pour une dMEC seule et 2,5 sur 10 pour les hCSMs pré-ostéodifférenciées seules (Clough et al. 2014). Une MEC intégrale peut donc servir de support aux cellules que l'on souhaite implanter ou bien de plateforme de libération de facteurs de croissance. Dans les deux cas, il faut noter que la MEC peut contenir de nombreux facteurs de croissance endogènes ce qui pourrait aussi favoriser le chimiotactisme de progéniteurs, l'angiogénèse et la formation osseuse. Cependant, à l'heure actuelle, seule la présence de GDF-15 a été détectée dans une dMEC synthétisée par

des CSMs (Harvey et al. 2013) ce facteur de croissance promouvant plutôt l'activité ostéoclastique et donc la résorption osseuse (Hinoi et al. 2012).

5 Projet de recherche

Différentes stratégies d'ingénierie tissulaire sont à l'étude pour promouvoir la réparation de grands défauts osseux. Le laboratoire Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire étudie plusieurs de ces stratégies, parmi lesquelles l'optimisation de la fonctionnalité des CSMs après implantation. L'étude que j'ai développée fait partie d'une thématique en collaboration avec d'autres laboratoires, portant sur l'étude/évaluation de nouveaux supports de BMP-2 pour améliorer la formation osseuse (utilisation de LbL à base PLL/acide hyaluronique, utilisation d'une céramique naturelle à base de carbonate de calcium (squelette de corail) pour délivrer la BMP-2 ; couplage de la BMP-2 à une céramique d'HA). L'étude présentée ici a pour objectif de déterminer si une matrice extracellulaire décellularisée, issue de la culture de cellules stromales mésenchymateuses peut retenir de la BMP-2 et promouvoir la synthèse osseuse. En effet, de nombreux travaux ont étudié les effets de certains composants de la MEC individuellement, mais peu se sont intéressés à la MEC intégrale. Nous avons donc dans un premier temps évalué la capacité d'une supplémentation en acide ascorbique (AA2P) à augmenter la synthèse de MEC par des CSMs, puis l'effet d'un protocole de décellularisation sur le contenu de cette MEC. Le potentiel de cette MEC-AA2P décellularisée (dMEC-AA2P) à retenir la rhBMP-2 et à induire une formation osseuse a ensuite été évalué dans un modèle d'implantation ectopique chez la souris. Pour finir, nous avons comparé deux dMEC qualitativement différentes, la dMEC-AA2P et une dMEC minéralisée, obtenue par la culture des CSMs en milieu ostéogénique pendant 21 jours (dMEC-OS), pour leur capacité à retenir la BMP-2 et à induire une formation osseuse dans notre modèle *in vivo*.

Matériel et méthodes

1 Culture cellulaire

1.1 Obtention des Cellules Stromales Mésoenchymateuses humaines

Les CSMs sont issues de patients ayant subi une chirurgie orthopédique pour raison traumatologique à l'hôpital Lariboisière de Paris et après leur consentement éclairé. Les résidus d'alésage du canal médullaire (lors de la pose d'une prothèse ou d'un clou centromédullaire) contenant la moelle osseuse sont mis en culture dans du « milieu complet » (α -MEM (Sigma-Aldrich) contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, GE Healthcare) et un mélange d'antibiotiques (ATB ; pénicilline 100U/ml et streptomycine 100 μ g/ml ; Sigma-Aldrich)), à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO₂. Après prolifération, lorsque les cellules arrivent à 80% de confluence, les cellules de chaque patient sont congelées individuellement dans une solution contenant 80% SVF, 10% de α -MEM et 10% diméthyl sulfoxyde (DMSO). On considère alors que ces cellules sont au passage 0, P0.

1.2 Obtention du « pool » de CSMs

Les expériences de cette étude ont été réalisées avec un mélange de cellules de 3 patients (3 hommes de 16, 16 et 22ans). Pour la constitution du pool, une ampoule de chaque patient au passage 0 a été décongelée puis remise en culture dans du milieu complet. Arrivées à 80% de confluence, les cellules de chaque patient sont trypsinées puis comptées, mises en commun avec un ratio de 1/3, puis remises en culture à la concentration de 5000 cellules par cm² (passage 1, P1). Après amplification, les cellules ont été congelées en vue des expériences qui ont été réalisées entre le passage 2 et le passage 5.

1.3 Production des matrices extracellulaires (MEC)

1.3.1 MEC sur fond de puits

Trois milieux ont été utilisés pour la synthèse de MEC : (i) le milieu complet, (ii) un milieu promouvant la synthèse de matrice extracellulaire (Milieu complet plus 1mM acide ascorbique 2-phosphate ; milieu AA2P) ou (iii) un milieu promouvant la différenciation ostéogénique (Lonza ; milieu OS). Les CSMs sontensemencées à 25 000 cellules/cm² dans des plaques 48 puits Falcon (Becton Dickinson) dans du milieu complet. Le lendemain, et selon les expériences, le milieu est remplacé par un milieu complet, AA2P ou OS et les cellules sont ainsi cultivées dans leur milieu respectif pendant 21 jours en changeant le milieu tous les 2 ou 3 jours.

1.3.2 MEC sur les implants en trois dimensions

Pour les expériences *in vivo*, les CSM ont été cultivées directement sur des implants tridimensionnels présentant une surface d'échange élevée. Nous avons choisi des implants en PCL (Poly(ϵ -CaproLactone), 3D PCL-insert™, 3D Biotek) pour ses propriétés non ostéogène d'une part, et d'autre part radio-transparente, facilitant ainsi l'analyse de la formation osseuse. Ces implants sont composés de fibres de 300 μ m de diamètre agencées de façon à créer des pores de 300 μ m également. Des implants cylindriques de 9 mm de diamètre x 1,6 mm de hauteur (\emptyset 9 mm, correspondant au diamètre d'un puits d'une plaque 48 puits) ou de 5,2 mm de diamètre x 1,6 mm de hauteur (\emptyset 5.2 mm, correspondant au diamètre d'un puits d'une plaque 96 puits) ont été utilisés. Ceux-ci développent une surface d'échange de 7,7 cm² / 2 cm² (contre 1 cm² pour un puits d'une plaque 48-puits et 0,32 cm² pour un puits d'une plaque 96-puits). On a donc un rapport de surface de 7,7 / 6,25 entre les implants et les puits. Ce rapport est utilisé pour calculer le nombre de cellulesensemencées (figure 19). Le volume total calculé des implants est de 102 mm³ vs 34 mm³, le volume « utile » excluant les fibres de PCL c'est-à-dire la porosité de l'implant représentant de 60 à 70% de ce volume.

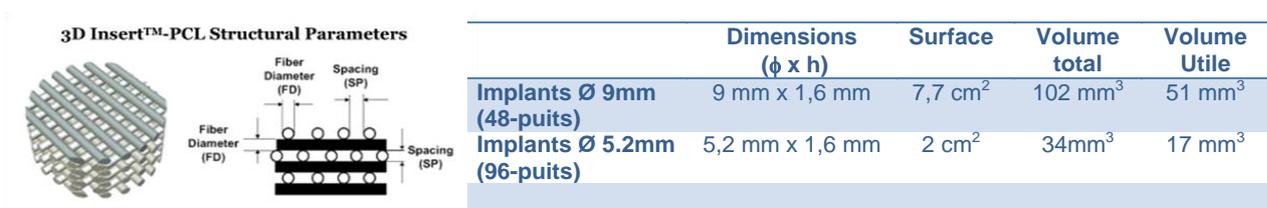


Figure 19 : Schéma et caractéristiques des implants PCL.

Pour les implants de ϕ 9 mm, une goutte de 50 μ l de milieu complet contenant 200 000 cellules est déposée sur les implants qui sont incubés dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂ pendant 3 heures afin que les cellules pénètrent dans les implants. 250 μ l de milieu complet sont alors ajoutés et les implants cellularisés sont incubés encore 24 h. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu AA2P ou OS et les cellules sont ainsi cultivées dans leur milieu respectif pendant 21 jours en changeant le milieu tous les 2 ou 3 jours. Pour les implants de ϕ 5,2 mm, 70000 cellules sontensemencées et cultivées selon un protocole identique.

1.4 Obtention des matrices extracellulaires décellularisées (dMEC)

Après 21 jours de culture dans les conditions sus-mentionnées en plaque 48 puits, les couches cellulaires sont lavées 2 fois dans du PBS, puis sont traitées par une solution de décellularisation contenant 20 mM NH₄OH et 0.25% de Triton X-100 (Sigma Aldrich), pendant 10 minutes à 37°C suivi de deux lavages au PBS. Les plaques sont ensuite séchées sous hotte, mises sous vide et congelées. Pour les implants 3D-PCL, le même protocole est utilisé, en augmentant le temps de contact de la solution de décellularisation (2 x 15 min) et les temps de lavage (3 x 15min).

1.5 Utilisation de la BMP-2 recombinante

La rhBMP-2 (recombinant human Bone Morphogenic Protein) utilisée provient d'une source commerciale à visée thérapeutique (InductOs® 12mg, Medtronic, France). Elle se présente sous forme lyophilisée à 4 % w/w avec comme excipients 0,5 % saccharose, 2,5% glycine, 25 mM acide glutamique, 1,875 mM chlorure de sodium et 0,01 % polysorbate 80. Elle a été resuspendue dans une solution d'HCl à 1 mM (pH3) puis aliquotée et congelée à -80°C.

1.5.1 Marquage en fluorescence

La BMP-2 a été marquée en fluorescence en utilisant une réaction de pontage des amines à l'aide d'un N-hydroxysuccinimide ester (NHS-Ester). Pour ce faire, un aliquot de BMP-2 (200

µg de BMP-2 dans 100 µl) est dialysé (Slide-a-lyzer, 10000 MWCO, Thermo Scientific) contre une solution d'HCl 1 mM pendant 24 h pour éliminer les excipients, en particulier la glycine qui pourrait interférer avec la réaction NHS-amine. 4,5 µl de tampon borate 0,67M sont ensuite ajoutés à la BMP-2 pour augmenter le pH jusqu'à 8,5. La solution de BMP-2 est alors incubée avec 25 µg de Dylight 800 (ou 488) NHS-ester (Thermo Scientific) à température ambiante pendant 2h ; elle est ensuite réacidifiée par ajout de HCl 1mM puis dialysée contre de l' HCl 1 mM pendant 24 h en renouvelant l'HCl 3 fois. La concentration de la BMP-2 marquée (BMP-2-FL800 ou BMP-2-FL488) a été déterminée par un dosage de protéines selon la méthode du Bicinchoninic Acid (Pierce BCA protein assay kit, Thermo Scientific).

1.5.2 Rétention de la BMP-2 sur les dMEC

Les plaques ou les implants décellularisés sont incubés avec une solution de rhBMP-2 diluée dans du PBS-BSA 0,5% w/v aux concentrations précisées dans le tableau 5 pendant 30-60 min à température ambiante. Les surnageants sont alors récupérés et congelés en attente du dosage de la rhBMP-2 non retenue par ELISA.

Tableau 5 : Conditions d'incubation de la rhBMP-2

	Concentration	Volume	Quantité initiale
Plaque 48 puits	4 µg/ml	250 µl	1 µg
Implant Ø 9 mm	50µg/ml	250 µl	12.5 µg
Implant Ø 5,2 mm	10-50µg/ml	100 µl	1-5 µg

2 Colorations et histologie

2.1 Coloration au Rouge Alizarine

Le rouge alizarin S (Sigma-Aldrich) est un colorant qui lie préférentiellement le calcium. Il est couramment utilisé pour visualiser, en donnant une coloration rouge, la minéralisation de la MEC par les cellules osseuses qui est un marqueur de la différenciation ostéogénique. Les cellules sont fixées par ajout d'une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 15 min, puis colorées avec une solution aqueuse de rouge Alizarine S 2% pH 4.2 pendant 15 min à température ambiante. Les puits sont alors extensivement lavés à l'eau permutée puis séchés. Une photographie est alors réalisée avec un microscope numérique (KEYENCE VHX200)

2.2 Coloration Von Kossa

La coloration dite de Von Kossa est une coloration au nitrate d'argent : les ions Ag^{2+} vont remplacer les ions Ca^{2+} présents dans des sels de phosphate ou de carbonate de calcium. Elle est donc aussi utilisée pour visualiser la minéralisation des matrices ou tissus. Après fixation par une solution de PFA 4% pendant 15 min, les cellules sont colorées par l'ajout d'une solution de nitrate d'argent à 2% placée sous éclairage direct jusqu'à l'apparition d'une coloration marron-noire due aux dépôts d'argent métallique. Les puits sont alors lavés à l'eau puis imagés avec un microscope numérique.

2.3 Coloration à l'Oil Red O

L'Oil Red O (Sigma-Aldrich) est un colorant liposoluble ayant une affinité particulière pour les lipides neutres. Il est utilisé pour colorer en rouge les vésicules lipidiques intracellulaires, dont la présence est reconnue comme un marqueur de la différenciation adipocytaire. A partir d'une solution stock à 0,5% dans de l'isopropanol, une solution est préparée à 0,3% dans de l'eau permutée. Après filtration, cette solution est utilisée pour colorer pendant 30 min les cellules préalablement fixées au PFA 4%. Après 2 lavages à l'eau, les puits sont rapidement photographiés à l'aide d'un microscope numérique.

2.4 Coloration à la Safranine O

La Safranine O (Sigma-Aldrich) est un colorant cationique orthochromatique qui se lie de façon stochiométrique aux glycosaminoglycanes (GAGs) chargés négativement (Kiviranta et al. 1985). Après fixation par la PFA 4%, les cellules (et leurs MECs) ou les dMECs sont colorées par ajout d'une solution de 0,5% Safranine O diluée dans 0,1 M d'Acétate de sodium, pH 5,2 pendant 1h à température ambiante. Après des lavages extensifs à l'eau, les puits mis à sec sont photographiés avec un microscope numérique (KEYENCE VHX200). Après l'acquisition, le colorant est extrait par une solution d'HCl 72 mM préparée dans un mélange d'éthanol et d'eau distillée (50/50 vol/vol) pendant 1h à température ambiante sous agitation. L'absorbance de la solution extraite est alors mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 530 nm. La valeur obtenue, proportionnelle à la quantité de GAGs, est exprimée en unités arbitraires (a.u).

2.5 Coloration au Rouge Sirius /Vert Rapide FCF

Le contenu de la MEC en collagène fibrillaire total a été évalué par la coloration Sirius Red/Fast Green FCF (López-De León and Rojkind 1985). Le Sirius Red est un colorant acide liant fortement les groupements basiques des fibres de collagène et le Fast Green FCF est un

colorant anionique se liant aux résidus cationiques des protéines. Après fixation par la PFA 4%, les cellules (et leurs MEC) ou les dMEC sont colorées par ajout d'une solution contenant 0,1% Direct Red 80 (Sirius red, Sigma-Aldrich) et 0,1% Fast Green FCF (Sigma-Aldrich) dans de l'acide picrique saturé pendant 1h à température ambiante. Après des lavages extensifs à l'eau, les puits mis à sec sont photographiés avec un microscope numérique (KEYENCE VHX200). Après l'acquisition, les colorants sont extraits par une solution de NaOH 0.1 M /Méthanol (50/50 : vol/vol) pendant 1h à température ambiante sous agitation. L'absorbance de la solution extraite est alors mesurée au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes 540 nm (Sirius Red) et 605 nm (Fast Green FCF). Le Fast Green absorbant aussi en partie à 540 nm, le calcul de la quantité de collagène fibrillaire se fait suivant la formule $DO_{540} - (DO_{605} * 0.291)$ et est exprimée en unités arbitraires (a.u.).

2.6 Coloration histologique : Bleu de Stévenel et Picrofuchine de Van Gieson

Après avoir été fixés dans la formaline 10%, les implants sont déshydratés, inclus dans une résine de Polyméthacrylate de méthyle (PMMA), puis coupés tous les 300 µm à l'aide d'une scie circulaire à lame diamantée (Leitz 1600, Leica Inst. Nussloch) dans l'axe transversale. Les coupes sont alors montées sur lames, poncées jusqu'à 100 µm, polies et colorées au Bleu de Stévenel et Picrofuchine de Van Gieson. Cette coloration permet l'analyse de la formation osseuse, la picro-fuschine colorant le collagène et en particulier le tissu osseux.

2.7 Coloration histologique : Trichrome de Masson

Après avoir été fixés dans la formaline 10%, les implants sont décalcifiés dans une solution d'EDTA à 12.5% à 4°C pendant 24h puis déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 7 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome et sont colorées au trichrome de Masson. Cette coloration associe trois colorants, un colorant nucléaire violet (hématoxyline), un colorant cytoplasmique rouge (fuchsine ponceau) et un colorant des fibres de collagène bleu (bleu d'aniline).

3 Analyses par cytofluorimétrie et par microscopie

3.1 Cytofluorimétrie

Les CSMs sont entre autre caractérisées par l'expression d'un certain nombre de molécules à leur surface. En particulier, selon la société internationale pour la thérapie cellulaire.(The International Society for Cellular Therapy), elles doivent exprimer CD90, CD73, CD105, et ne

pas exprimer CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLADR (Dominici et al. 2006). Pour analyser l'expression de certains de ces marqueurs à la surface de nos cellules, les CSM sont trypsinées, lavées en PBS –BSA 1%, puis incubées avec un mélange contenant les anticorps anti-CD90-FITC, anti-CD73 PE, anti-CD45-PE-Vio770 et anti-CD105-Vioblue (Miltenyi Biotech) ou avec leurs isotypes contrôles, pendant 15 min à 4°C selon les recommandations du fournisseur. Après dilution dans du PBS-BSA, chaque échantillon (10 000 événements/échantillon) a été analysé avec un cytomètre Attune (Applied Biosystems). Pour l'analyse des résultats, les paramètres de taille et de granulosité ont été utilisés pour réaliser une zone d'intérêt incluant les cellules (et excluant les débris), et le nombre de cellules positives et négatives pour chaque fluorochrome a été défini en considérant les échantillons incubés avec les isotypes contrôles comme négatifs. Pour s'affranchir des problèmes de chevauchement des spectres d'émission des différents fluorochromes, chaque anticorps a été utilisé individuellement dans une expérience contrôle et une matrice de compensation (comportant les pourcentages de chevauchement entre les différents fluorochromes) a été réalisée.

3.2 Microscopie à fluorescence

3.2.1 Visualisation de la répartition cellulaire

Pour visualiser la répartition cellulaire au sein d'un implant, un marquage à l'AcétoxyMéthyl ester de Calcéine (Calcein AM, Molecular probes) est réalisé. La Calcéine AM, non fluorescente et perméante grâce au groupement AM rentre dans toutes les cellules puis est hydrolysée par les estérases cellulaires en donnant de la calcéine, produit hydrophile, ne pouvant plus sortir des cellules et émettant une fluorescence verte. Ce marqueur est considéré comme un marqueur de viabilité cellulaire mais permet aussi de visualiser les cellules en microscopie. Pour réaliser ce marquage, l'implant est lavé au PBS puis incubé pendant 30 min à 37°C avec 1 μ M Calcein AM. Après lavage au PBS, les cellules vivantes sont visualisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence NIKON TE2000 équipé d'un cube de filtres pour la GFP (Ex. 472/30-DM 495-Em.520/35) et d'une caméra couleur DMX1200F (NIKON)

3.2.2 Visualisation de la BMP-2 retenue sur le dMEC

Après décellularisation, les dMEC sont incubées avec 1 μ g de BMP-2-FL488 dans PBS-BSA 0,5 % 1h à température ambiante puis fixées avec une solution de PFA à 4%. Un anticorps anti-fibronectin est ajouté puis incubé 1h à RT. Après lavages, un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome (Fluoprobes 547, Interchim) a été ajouté, incubé 1h à RT. Après lavages, la BMP-2-488, fluorescente en vert, et la fibronectine, fluorescente en rouge, ont été

visualisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence NIKON TE2000 équipé d'un cube de filtres pour la GFP (Ex. 472/30-DM 495-Em.520/35) et d'une caméra couleur DMX1200F (NIKON).

3.3 Microscopie électronique

Les analyses de microscopies électroniques ont été réalisées sur la plateforme du LISE (Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, UMR 8235) à l'UMPC, avec l'aide de Françoise Pilier. Les implants décellularisés ont été lavés dans un tampon cacodylate de sodium (0.1 mM pH7.4) puis fixés avec une solution de glutaraldéhyde à 2.5%. Après fixation et lavages, les implants ont été séchés à l'air libre puis recouvert de particules d'or à l'aide d'un pulvérisateur cathodique (EMSCOPE SC 500; Elexience). Les échantillons ont alors été observés avec un microscope électronique à balayage (505 Philips MEB, FEI Company).

4 Techniques biochimiques

4.1 ELISA

Pour évaluer la quantité de BMP-2 retenue dans les dMEC, le dosage de la quantité de BMP-2 dans la fraction non retenue (surnageant) a été réalisé par la technique ELISA selon les instructions du fournisseur (rhBMP-2 DUOSET, R&D Systems). Brièvement, les échantillons sont dilués 2000 fois dans du PBS 0,5% BSA puis incubés 2 heures dans des puits pré-coatés avec un anticorps de capture anti-BMP-2. Après 3 lavages en PBS-tween 0,05%, les puits sont incubés en présence d'un second anticorps anti-BMP-2 biotinylé pendant 2 heures. Les puits sont à nouveau lavés 3 fois et incubés avec le complexe streptavidine-HRP pendant 20 minutes, lavés encore 3 fois. La coloration est révélée par ajout du substrat 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) pendant 20 min. La coloration est arrêtée avec de l'acide sulfurique 2N puis l'absorbance de chaque puits est lue à 450 nm avec une correction à 540 nm par un lecteur de microplaques (μ quant, Bio-tek). Une gamme étalon utilisant la même BMP-2 (rhBMP-2, Medtronic) et diluée dans le même milieu que celui des échantillons à tester est réalisée en parallèle.

4.2 Dosage de l'activité phosphatase alcaline

Les cellules C2C12 sont des myoblastes murins qui, sous l'influence de BMP-2, ont la capacité de se différencier dans la voie ostéoblastique. De part cette différenciation, elles expriment rapidement (dès 3 jours de contact avec la BMP-2) la phosphatase alcaline (PAL). Le dosage

de l'activité PAL chez les C2C12 induite par la BMP-2 est donc une méthode aisée pour évaluer l'activité biologique de la BMP-2 (Katagiri et al. 2013).

Les C2C12 sont cultivées en milieu DMEM (à 5g/l de glucose) contenant 10% de SVF. Pour évaluer l'activité biologique de la BMP-2 chargée dans les dMEC (en 48-puits), 20 000 cellules C2C12 sontensemencées sur les dMEC-BMP-2 dans un milieu DMEM 5g/l glucose contenant 2% de SVF. En parallèle, une gamme est réalisée : 20 000 cellules C2C12 sontensemencées en 48-puits et mises immédiatement en présence d'une gamme de BMP-2 soluble (de 50 à 1000 ng/ml). La moitié du milieu est remplacé par du DMEM 5g/l glucose contenant 2% de SVF à J3 et les cellules sont lysées à J6 avec un tampon de lyse PAL (100 mM tampon carbonate de sodium pH 10.2, 1 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, Sigma Aldrich). Le dosage de l'activité PAL de chaque échantillon est réalisé en utilisant comme substrat le paranitrophényl phosphate (pnpp, 7 mM final) qui est converti en paranitrophénol (pnp) en présence d'AMP (750 mM) et de MgCl₂ (1 mM). La quantité de pnp produite est quantifiée par lecture de la DO à 410 nm. Pour corriger la valeur d'activité en fonction du nombre de cellules dans le puits, un dosage de l'ADN est réalisé sur chaque échantillon en utilisant un intercalant fluorescent de l'ADN (Kit Cyquant, Molecular probes).

4.3 Dosage de l'activité BRE-LUC

L'activité SMAD-dépendante de la BMP-2 est mesurée en utilisant la lignée C2C12-BRE/luc. C'est une lignée dérivée de C2C12 ayant été transfectée de façon stable avec le gène rapporteur Luciférase sous le contrôle du promoteur BMP-responsive-element (BRE) du gène ID1 (Logeart-Avramoglou et al. 2006). 60 000 cellules C2C12-BRE/luc sont déposées sur les dMEC pré-chargées avec 3 µg de BMP-2 (dans les 24-puits), puis incubées pendant 24h. Après lavage des puits au PBS, une solution de luciférine à 150 µg/ml est ajoutée et la luminescence émise est mesurée après 20 min avec un imageur à fluorescence/luminescence Lumina II (Perkin Elmer).

5 Etudes in vivo

5.1 Implantations sous cutanée chez la souris

Les expérimentations sur animaux vivants ont été effectuées à l'animalerie Villemin de l'UFR de médecine de l'Université Paris Diderot, en conformité avec les autorités françaises compétentes pour le soin et l'expérimentation sur les animaux de laboratoire (agrément animalerie # C75-10-01). Les animaux ont été entretenus conformément aux dispositions

applicables de la Loi sur le bien-être des animaux. Le protocole suivant a été approuvé par le comité d'éthique Villemin-Lariboisière et a reçu l'autorisation du ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#6607-2016070410411411 v4).

Les souris Nude (RJ:NMRI-nu (nu/nu), Janvier, France) femelles âgées de 9 semaines (poids moyen de 27 g) reçoivent une pré-analgésie par injection en sous cutanée de 0,05 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®0,3mg/mL, Axience, France). 30 min après, elles sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange contenant 5mg/kg de xylazine (Rompun 2%, Bayer Healthcare) et 70 mg/kg de kétamine (Imalgène 500, Merial) puis désinfectées avec une solution de Povidone iodée (Vétédine, Vétoquinol). Les animaux sont placés sur tapis chauffant pour limiter les pertes thermiques. Dans des conditions d'asepsie stricte (champs et instruments stériles), 4 incisions de 0,3 cm sont réalisées à 1 cm de la colonne, 2 sur chaque flanc espacés de 2 cm. Après tunnélisation, les implants sont mis en place de façon aléatoire et l'incision est refermée par des points séparés (Ethilon 4.0). Chaque souris est identifiée par une boucle numérotée fixée à l'oreille. Une analgésie post-opératoire est faite par une injection SC de 0,05 mg/kg de buprénorphine. Les souris sont surveillées sur tapis chauffant jusqu'à leur réveil complet de l'anesthésie puis remises dans leurs cages. Un suivi des animaux (poids, cicatrisation, infection..) est réalisé pendant 3 jours post-opératoires puis deux fois par semaine.

5.2 Suivi longitudinal de la formation osseuse.

Aux temps mentionnés (J7/J14/J28/J42/J56 suivant les expériences), une évaluation *in vivo* de la formation osseuse est réalisée pour chaque implant par microtomographie à rayon X *in vivo* à l'aide d'un microscanner (Skyscan 1172, Skyscan). Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane 3% véhiculé par un mélange O₂/air 50/50 à un débit de 2L/min, placées dans le microscanner puis imagées avec les paramètres d'irradiation suivants : filtre d'Aluminium 0.5 mm, Voltage 50 KV, Ampérage 350 µA, temps d'acquisition 350 ms. Un pas de rotation de 0.7°C et une résolution de 37µm sont aussi utilisés. Après acquisition, les animaux sont remis en cage et surveillés jusqu'à réveil complet.

5.3 Traitement numérique des données du microscanner à rayon X

L'acquisition au microscanner dans les conditions mentionnées génère 283 images par échantillon. La première étape pour analyser ces images est de « reconstruire » l'échantillon en 3 dimensions à partir des données brutes. Après reconstruction avec le logiciel NRecon (Skyscan, Aartselaar, Belgique), une méthode d'analyse d'images consistant à déterminer un

seuil de niveau de gris permettant de distinguer l'os néoformé du reste du tissu environnant a été utilisée à l'aide du logiciel CTAn (Skyscan, Aartselaar, Belgique). Cette méthode d'analyse permet donc une binarisation de l'échantillon en deux catégories « os » et « non os ». Le volume occupé par le tissu osseux au sein de l'échantillon est alors quantifié, c'est le volume osseux.

5.4 Suivi longitudinal de la libération de la BMP-2 *in vivo*.

Pour évaluer la durée de rétention de la BMP-2 sur le site d'implantation et suivre la cinétique de libération de la BMP-2 *in vivo*, les implants de Ø 5,2 mm sont incubés avec 4 µg de BMP-2 et 1 µg de rhBMP-2-FL800 pendant 1 heure. Avant implantation, la fluorescence de l'implant et de la fraction non retenue est mesurée par imagerie en fluorescence à l'aide d'un imageur en luminescence/fluorescence *in vivo* (IVIS lumina II, Perkin Elmer) en utilisant un filtre d'excitation de 745nm±10nm et un filtre d'émission 810-875nm. Après implantation, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane, puis imagées aux temps J0/J1/J2/J3/J4/J5/J6/J7/J8/J11/J12. Les valeurs de fluorescence obtenues sont exprimées en termes d'efficacité (Efficiency) qui correspond au ratio entre le nombre de photons émis par la source lumineuse et le nombre de photons reçus par la caméra. Ce calcul permet de s'affranchir de la non-homogénéité de l'illumination.

6 Analyses Statistiques

Les données sont décrites selon la moyenne ± écart-type et les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Etats-Unis). Le t-test paramétrique a été utilisé pour analyser les données provenant de deux échantillons indépendants. Le test ANOVA à 1 entrée suivi du test post-hoc de Tukey a été utilisé pour comparer les moyennes de trois groupes ou plus. Les données de la cinétique quantitative ont été analysées à l'aide de l'ANOVA à 2 entrées suivie du test post-hoc de Tukey. Pour toutes les analyses, les différences avec un seuil $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

1 La matrice extracellulaire sécrétée comme plateforme de libération de BMP-2

1.1 Caractérisation du pool de cellules stromales mésenchymateuses.

Les cellules stromales mésenchymateuses sont caractérisées d'après les recommandations de la « Société internationale pour la thérapie cellulaire » par trois critères : l'adhérence au plastique, la différenciation vers le phénotype ostéoblastique, adipogénique et chondrogénique ; et l'expression (CD90, CD73 et CD105) ou l'absence d'expression (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLADR) de certains marqueurs phénotypiques membranaires. Nous avons donc en premier lieu caractérisé notre pool de CSMs. La caractérisation phénotypique des MSC a été réalisée par cytofluorimétrie multiparamétrique en utilisant les anticorps anti-CD45 (i.e. non exprimé par les CSMs), anti-CD90, anti-CD73, et anti-CD105. Les marqueurs endothéliaux (CD34), monocytaires (CD14) et lymphocytaire B (CD19) n'ont pas été testés. Comme observé sur la figure 20, plus de 97% de la population est négative pour CD45 et positive pour CD90, CD73 et CD105

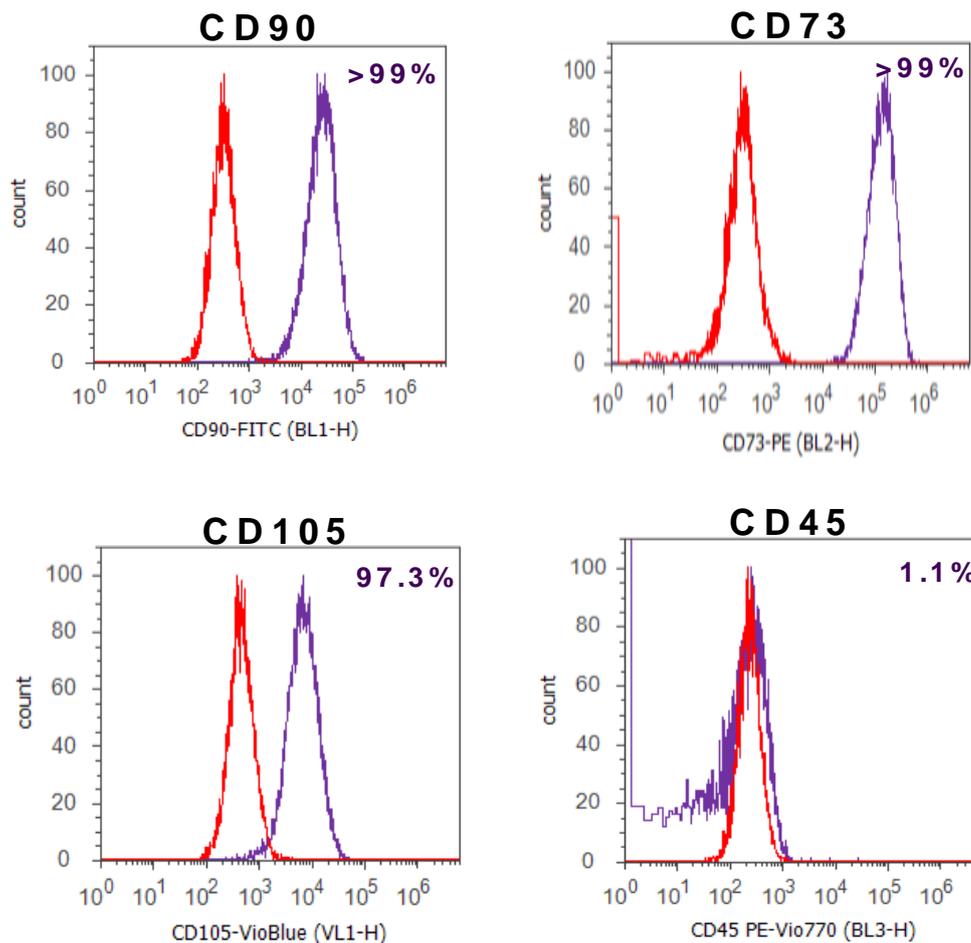


Figure 20 : Caractérisation des CSMs : Expression des marqueurs de membranes CD90/CD73/CD105 et CD45.

Les CSMs au passage 3 ont été marquées par les anticorps anti-CD90-FITC, anti-CD73-PE, anti-CD105-VioBlue et anti-CD45-PEvio770 puis analysées par cytométrie multiparamétrique. Les graphiques représentent le nombre de cellules en fonction de la fluorescence. Rouge=isotypes contrôles ; violet= Anticorps pertinents.

Pour mettre en évidence le potentiel de différenciation des CSMs, celles-ci ont été cultivées dans un milieu supplémenté par des inducteurs de différenciation ostéogénique (OS), adipogénique (AD) ou chondrogénique (CH) (Figure 21). Après 21 jours de culture dans le milieu OS, la coloration au rouge Alizarine montre la présence d'un fort marquage rouge qui dénote la présence de dépôts calciques. De plus, la coloration Von Kossa, réalisée aussi à J21, montre la présence de nodules marrons-noirs dénotant la présence de cristaux (phosphate ou carbonate) de calcium. Prises ensemble, ces deux colorations indiquent que le pool de CSMs utilisé est capable de se différencier vers la voie ostéogénique et d'induire une minéralisation phosphocalcique de la matrice extracellulaire. Après 21 jours de culture dans un milieu AD, la

coloration à l'Oil Red O a permis de mettre en évidence des vacuoles lipidiques rouges, démontrant donc que la différenciation vers la voie adipogénique est effective. Après 21 jours de culture dans un milieu CH, la coloration à la Safranin O a permis de mettre en évidence une présence importante de GAG, signe de différenciation dans la voie chondrogénique.

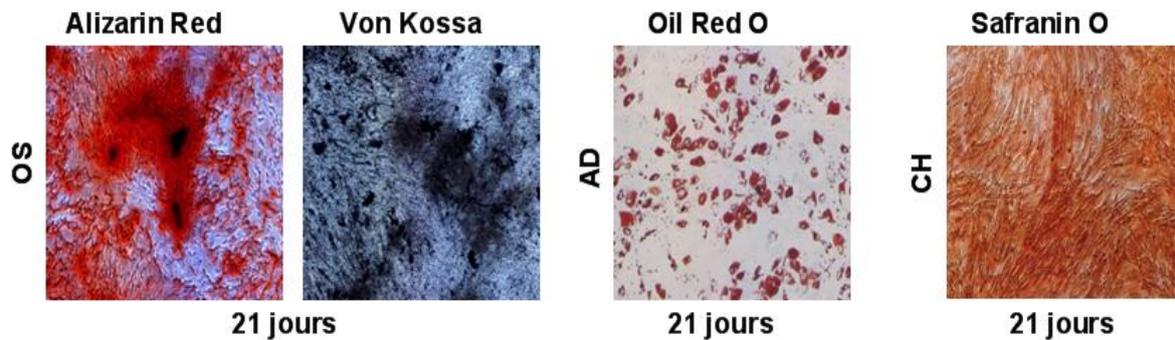


Figure 21: Caractérisation des CSMs : Potentiel de différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique.

Les CSMs ont été cultivées 21 jours dans les milieux promouvant la différenciation OS, AD ou CH, puis fixées et colorées. Les colorations Alizarin Red et Von kossa sont des marqueurs de la minéralisation, la coloration Oil red O marque les vésicules lipidiques, et la coloration Safranin O marque les GAG.

1.2 Caractérisation de MECs dérivées des CSMs

Afin de stimuler la synthèse de matrice extracellulaire, de l'acide ascorbique (AA2P, 1 mM) a été ajouté au milieu complet pendant les 21 jours de culture. Pour évaluer l'effet de l'ajout d'AA2P sur la synthèse de la MEC, trois paramètres ont été analysés, le contenu protéique, le contenu en collagène fibrillaire et le contenu en GAG. Le contenu en collagène fibrillaire total et le contenu protéique, révélés par la coloration Sirius Red (pour le collagène) / Fast green (pour les protéines) (López-De León and Rojkind 1985) est fortement augmenté lors de la culture en présence d'AA2P par rapport à la condition en absence d'AA2P. De même, le contenu en GAG de la MEC, révélé par la coloration Safranin O, augmente fortement lors de la culture en présence d'AA2P (Figure 22).

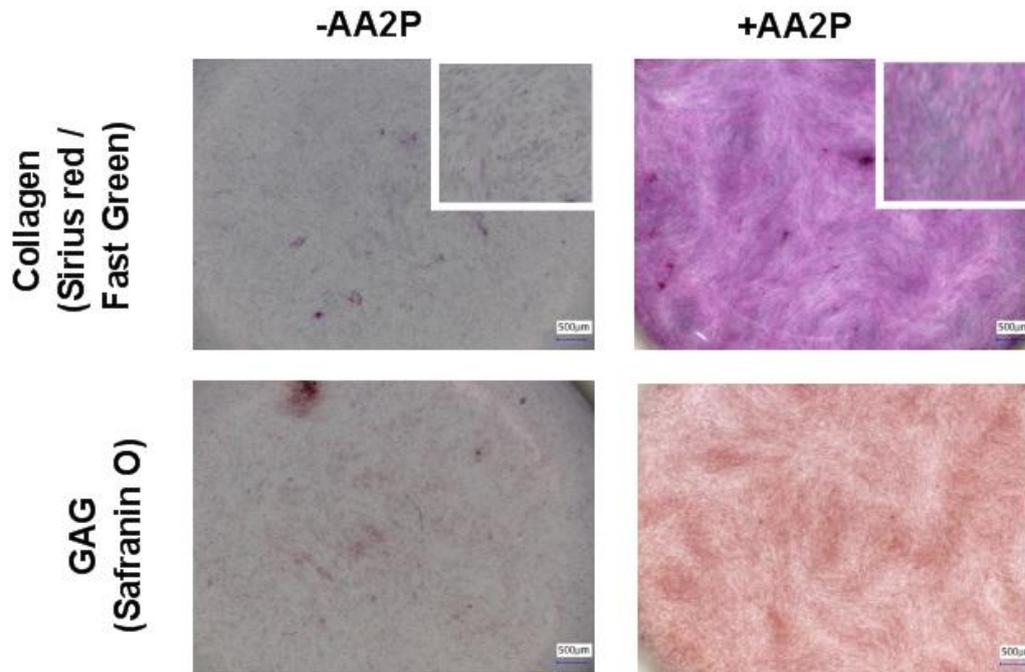


Figure 22 : Visualisation du contenu en collagène fibrillaire et en protéines et en GAG.

Les CSM ont été cultivées 21 jours dans le milieu complet supplémenté ou non par 1mM d'AA2P, puis fixées et colorées. La coloration Sirius Red/Fast Green marque le collagène fibrillaire et les protéines totales, respectivement. La coloration Safranin O marque les GAG.

Après extraction, les colorants Sirius Red/Fast Green et Safranin O ont été quantifiés par spectrophotométrie (Figure 23). Cette quantification confirme que la présence d'AA2P dans le milieu de culture induit une augmentation significative de la synthèse de protéines totales, de collagène fibrillaire, et de GAG.

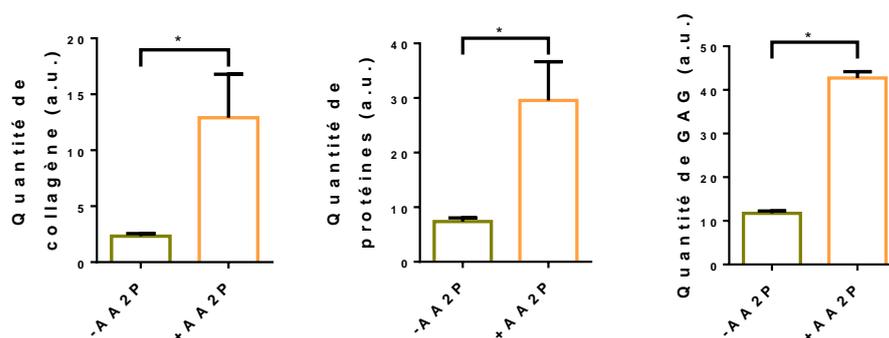


Figure 23 : Quantification de la synthèse de matrice extracellulaire.

Les CSMs ont été cultivées 21 jours dans le milieu complet supplémenté ou non par 1mM AA2P. Les colorants Sirius Red /Fast green (collagène fibrillaire /protéines) et Safranin O (GAG) ont été solubilisés et leur DO mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre N=5 . t-test * : p<0.05.

1.3 Effet de la décellularisation sur la MEC

Pour utiliser une MEC comme support d'un facteur de croissance, la première étape consiste à éliminer les cellules qui l'ont produite et leurs composants (membranes, cytosol, ADN) afin de limiter la réaction inflammatoire. Les MEC obtenues par la culture des CSMs en présence ou non d'AA2P ont donc été décellularisées (dMEC) à l'aide d'une solution composée de Triton X-100 en présence de chlorure d'ammonium. Ces dMEC, ainsi que les MEC non décellularisées (ndMEC) ont été colorées comme précédemment avec le Sirius red/Fast Green et la Safranine O. La quantification des colorations (Figure 24) a permis de mettre en évidence que la quantité de collagène synthétisée en présence d'AA2P est peu affectée (-11,5%) par le processus de décellularisation alors que le contenu en protéines totales et en GAG de la MEC AA2P est fortement diminué (-63 vs -73% respectivement) par ce traitement. Dans la condition contrôle, sans AA2P, le processus de décellularisation entraîne une diminution similaire à la condition AA2P concernant le contenu en GAG (-73%) mais par contre, cette diminution est plus importante concernant le contenu en protéines (-80%) mais surtout le contenu en collagène (-85%). Ainsi, après le processus de décellularisation, une MEC synthétisée en présence d'AA2P contient 40 fois plus de collagène, 9 fois plus de protéines totales et 3,7 fois plus de GAG qu'une MEC synthétisée en absence de supplémentation AA2P. L'acide ascorbique a donc bien eu l'effet escompté en augmentant la synthèse de MEC mais le protocole de décellularisation utilisé dans cette étude modifie significativement sa composition. Seule la dMEC AA2P a été utilisée par la suite.

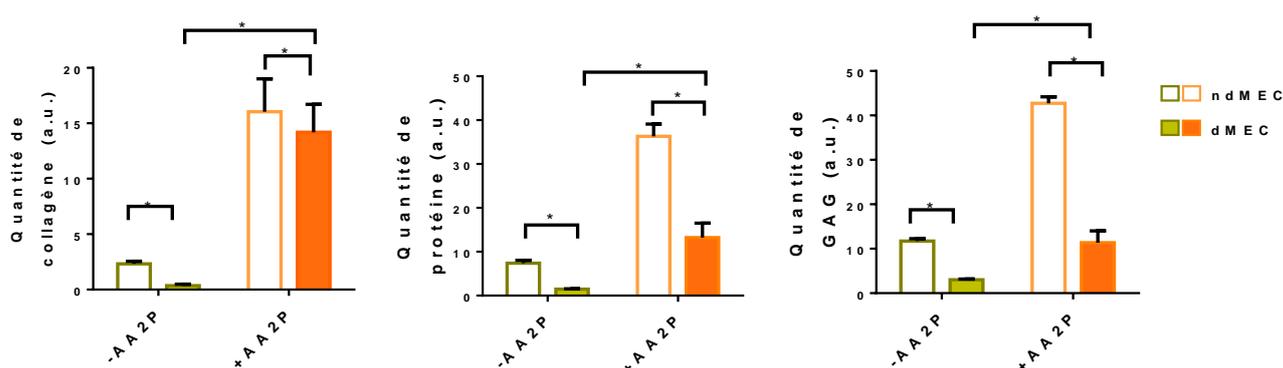


Figure 24 : Quantification de la matrice extracellulaire avant/après décellularisation

Les MEC obtenues dans les mêmes conditions que précédemment ont été décellularisées puis colorées avec le Sirius Red/Fast green pour le collagène et les protéines et la Safranin O pour les GAG. Après extraction, la DO des colorants a été mesurée au spectrophotomètre puis comparée aux valeurs obtenues avant décellularisation. ndMEC : MEC non décellularisée, dMEC : MEC décellularisée. N=4 t-test * p<0.05.

1.4 Capacité de la dMEC à retenir la rhBMP-2

Afin de mettre en évidence la possible rétention de rhBMP-2 sur cette dMEC AA2P, une solution de rhBMP-2 a été mise en contact avec celle-ci, puis après incubation pendant 30-45 min à température ambiante, la fraction non retenue (c'est-à-dire la solution contenant la rhBMP-2 qui n'a pas été retenue sur la dMEC) a été prélevée puis dosée par ELISA. La figure 25 présente la concentration de cette fraction non retenue (26A) et le pourcentage de rétention (26B) calculé suivant la formule :

$$\left[1 - \left(\frac{\text{Fraction non retenue}}{\text{Sham}} \right) \right] \times 100$$

avec Sham = solution de rhBMP-2 diluée à la concentration utile et incubée en tube durant le même temps que les dMECs et

Solution initiale = solution de rhBMP-2 diluée à la concentration utile dans PBS-0.5% BSA et congelée immédiatement après préparation.

Après incubation avec une solution à 4µg/ml de rhBMP-2 (soit 1 µg/puits, 1,3 µg/cm²), il apparaît qu'environ 60% de la rhBMP-2 est retenue sur la dMEC. Les domaines de liaisons possibles de la BMP-2 à la dMEC n'étant pas totalement définis, il se peut que l'orientation de la rhBMP-2, lorsqu'elle est accrochée à la dMEC, ne permette plus la liaison à son récepteur. Il est donc important de savoir si la rhBMP-2 retenue maintient son activité biologique.

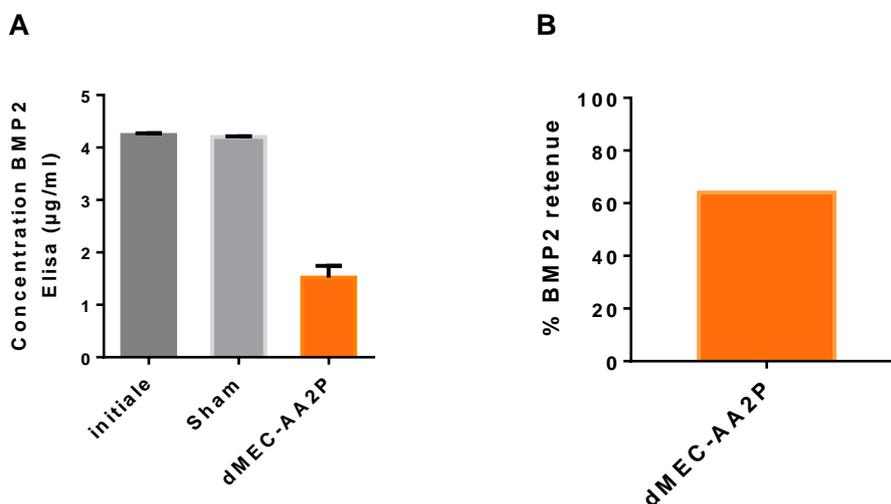


Figure 25 : Rétention de la BMP-2 sur une MEC décellularisée.

Les dMEC issues de culture de hMSC en présence d'acide ascorbique ont été incubées 30-45 min à RT en présence de 4µg/ml de BMP-2 (i.e 1µg total, 1,3µg/cm²). La quantité de BMP-2 non retenue a été dosée par ELISA. A. Concentration de BMP-2 non retenue. Solution initiale = solution de rhBMP-2 diluée à la concentration utile dans PBS-0.5% BSA et congelée immédiatement après préparation. Sham = solution de rhBMP-2 diluée à la concentration utile et incubée en tube durant le même temps que les dMECs ; dMEC-AA2P: solution de rhBMP-2 diluée à la concentration utile et incubée sur la dMEC-AA2P B. Pourcentage de rétention. N=3.

Pour cela, des cellules myoblastiques murines C2C12-BRE/Luc, exprimant le gène rapporteur Luciférase sous contrôle du promoteur BRE (BMP responsive element), ont été utilisées. Ces cellules, en présence de BMP-2, démontrent une augmentation dose dépendante de l'expression de la luciférase (Figure 26A), reflétant l'activation de la voie canonique, SMAD dépendante des BMPs (Logeart-Avramoglou et al. 2006). Les cellules C2C12-BRE/Luc ont été ensemencées sur la dMEC préincubée ou non avec la rhBMP-2 et cultivées pendant 24h. Après incubation avec le substrat luciférine, les cellules ont été imagées à l'aide d'un imageur en luminescence (imageur Lumina II). Le signal luminescent émis par les cellules cultivées sur la dMEC-rhBMP-2 s'est révélé être hors de la limite de linéarité de la gamme réalisée en parallèle avec la BMP-2 soluble (Luminescence moyenne obtenue en présence de rhBMP-2 : 96650). Cependant, ce signal est (au minimum) 6 fois supérieur à celui émis en absence de rhBMP-2, démontrant que la BMP-2 retenue reste biologiquement active (Figure 26).

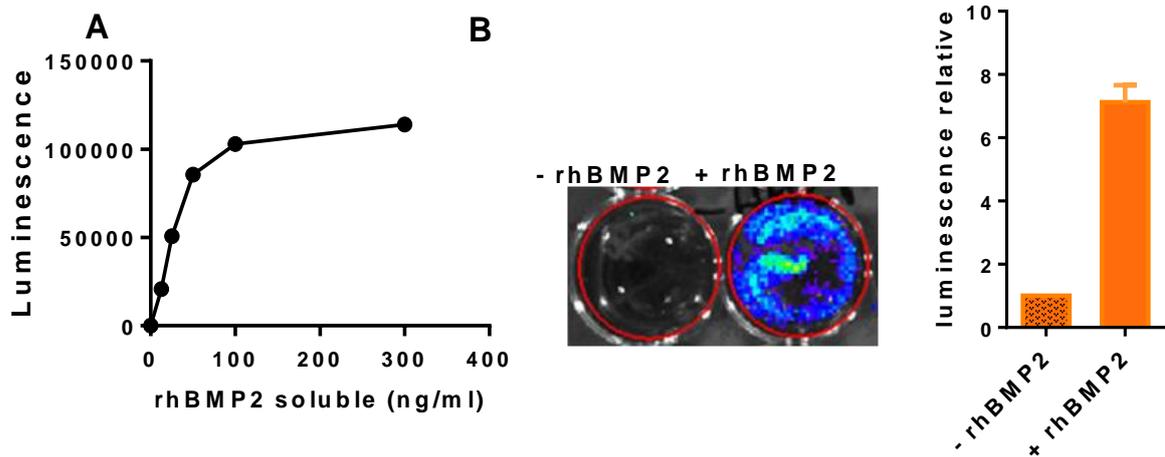


Figure 26 : Activité de la BMP-2 retenue.

A. Luminescence émise par les C2C12/BRE/Luc en présence d'une gamme de rhBMP-2 soluble. **B.** Les dMEC ont été incubées avec $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de rhBMP-2, puis incubées avec 60000 cellules C2C12-BRE/luc pendant 24h, puis imagées en présence du substrat luciférine. Image représentative des cellules C2C12 ensemencées sur une dMEC avec ou sans rhBMP-2. **C.** Quantification du flux de photons émis (Luminescence moyenne obtenue en présence de rhBMP-2 96650) N=2.

Pour confirmer le maintien de l'activité biologique de la rhBMP-2 retenue sur la dMEC-AA2P et s'affranchir de la faible gamme de linéarité des C2C12 BRE/luc, un autre marqueur de son activité a été utilisé. Les cellules myoblastiques C2C12 natives, en présence de rhBMP-2, démontrent une augmentation dose dépendante de l'activité de la Phosphatase Alcaline (PAL) jusqu'à environ 800 ng/ml (Figure 27A). Les dMEC ont été préincubées avec des doses croissantes de rhBMP-2, la fraction non retenue a été prélevée pour être dosée en ELISA

(Figure 27B) puis les dMEC ont été lavées,ensemencées avec les cellules C2C12 puis incubées pendant 6 jours. L'activité de la PAL a alors été mesurée après lyse cellulaire. Un contrôle, consistant à incuber la même quantité de rhBMP-2 sur un puits sans dMEC a été utilisé (TC-PS, tissu culture polystyrene). Les quantités de rhBMP-2 retenues dosées par ELISA s'avèrent être similaire entre la condition TC-PS et la condition dMEC AA2P aux faibles concentrations de rhBMP-2 initiale (1 µg/ml, 0.25 µg/puits et 0.25 µg/ml, 625 ng/puits) correspondant à environ 70% de la BMP-2 initiale chargée. Cependant, elle est supérieure pour la condition dMEC-AA2P lorsque la concentration de rhBMP-2 est plus élevée (4 µg/ml, 1 µg/puits). Dans cette condition, le pourcentage de rhBMP-2 retenu est de 58,5% contre 44% pour la condition TC-PS. L'activité PAL des cellules C2C12 augmente lorsque la concentration initiale de chargement de BMP-2 sur la dMEC augmente, confirmant que la rhBMP-2 retenue est toujours bioactive d'une part et que la rétention de BMP-2 sur la dMEC est dose dépendante d'autre part (Figure 27C). Par ailleurs, l'activité PAL des cellules C2C12ensemencées sur le TC-PS préincubé avec les faibles concentrations de rhBMP-2 est négligeable. Par contre, pré-incubé avec la plus forte concentration de rhBMP-2, une activité PAL non négligeable est mesurée sur TC-PS, activité PAL néanmoins 3 fois inférieure à celle obtenue sur la dMEC-AA2P. Il semble donc que la rhBMP-2 se lie aussi au plastique de culture cellulaire et qu'une partie seulement de cette rhBMP-2 est éliminée lors de l'étape de lavage qui précède l'ensemencement des cellules C2C12. Cette rétention est possiblement due aux charges positives à la surface du polystyrène créées par le traitement des plastiques de culture. Pour confirmer que la rhBMP-2 se lie effectivement à la dMEC, de la rhBMP-2 fluorescente (rhBMP-2-FL488) a été ajoutée à la dMEC, celle-ci étant visualisée à l'aide d'un anticorps anti-fibronectine couplé à un fluorochrome (Figure 27D). Les images prises en microscopie à fluorescence montrent qu'effectivement, les deux fluorochromes mettent en évidence la même structure, démontrant ainsi qu'effectivement le BMP-2 se lie bien spécifiquement à la MEC.

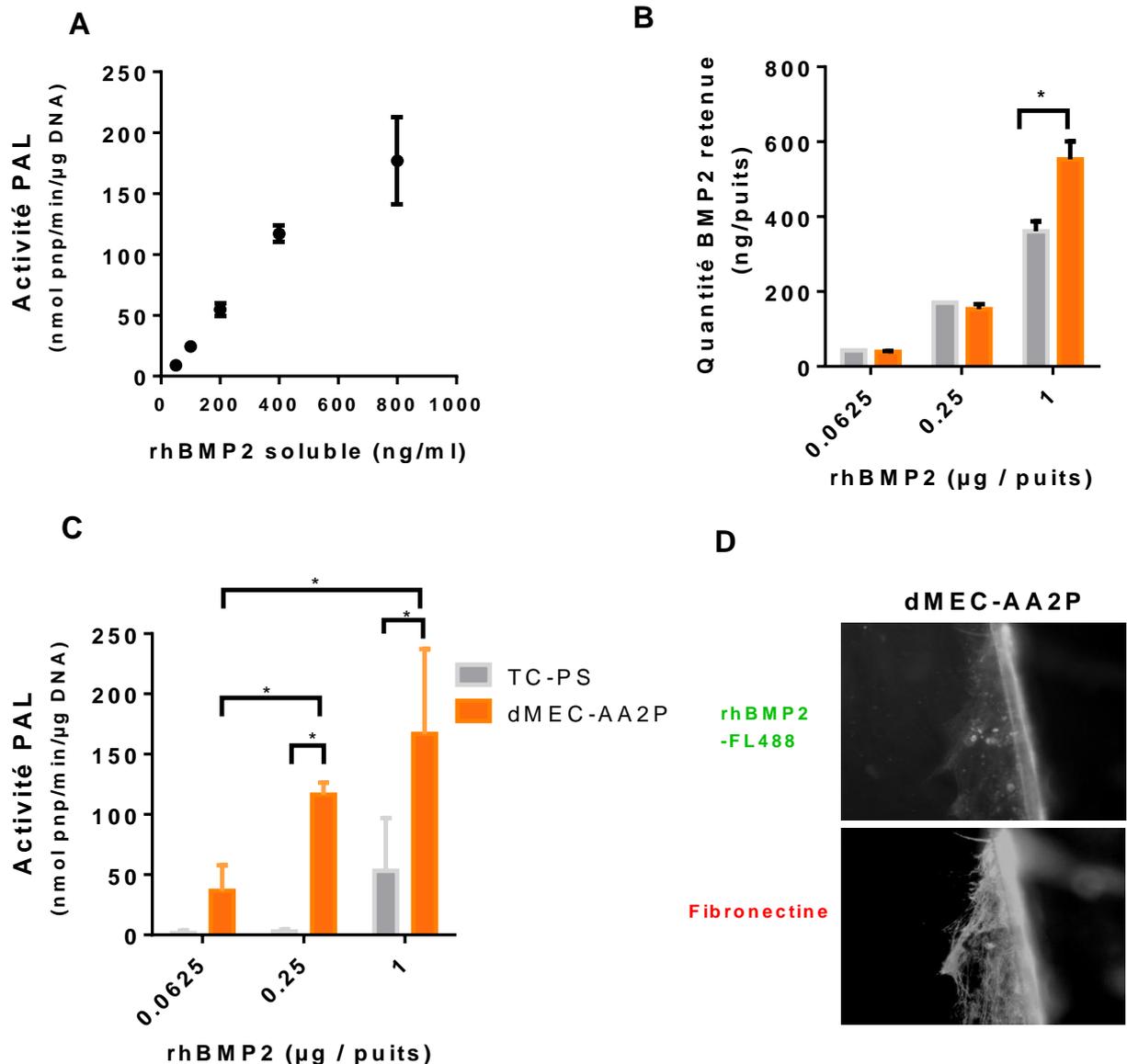


Figure 27 : Rétention et activité phosphatase alcaline de la rhBMP-2 retenue : effet dose.

A. Activité phosphatase alcaline (Gamme) : Les cellules C2C12 ont été ensemencées, incubées pendant 6 jours avec des quantités de rhBMP-2 soluble croissantes, lysées et leur activité PAL a été déterminée. B. Dosage ELISA. Les dMEC ont été incubées avec des doses croissantes de rhBMP-2, ($0.08\mu\text{g}/\text{cm}^2/0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2, 1.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$), puis la fraction non retenue a été dosée par ELISA t-test * <0.05 . C. Après lavage, les dMEC préincubées ont été ensemencées avec des cellules C2C12, incubées pendant 6 jours, lysées et leur activité PAL a été déterminée. Le plastique de culture (TC-PS) a été utilisé comme contrôle. (N=5 2 ways ANOVA, * $p<0.05$). D. Visualisation en épifluorescence. La dMEC a été incubée avec de la rhBMP-2-FL488, fixée, incubée avec un anticorps anti-fibronectine pour visualiser la MEC, puis un anticorps secondaire, et analysée en microscopie.

Nous avons donc pu montrer, *in vitro*, que la rhBMP-2 est capable de se lier à la dMEC de façon dose dépendante et qu'elle est biologiquement active faisant de ce complexe dMEC-BMP-2 un produit d'ingénierie tissulaire osseuse (PITO). En clinique, la BMP-2 est associée à une éponge de collagène. Lors de son utilisation chez le patient, l'éponge de collagène et la

rhBMP-2 sont fournis séparément, nécessitant l'intervention du chirurgien pour sa préparation extemporanément à son application. Nous nous sommes donc demandé si le complexe dMEC-rhBMP-2 était lyophilisable tout en conservant sa bioactivité et faciliter ainsi son utilisation cliniquement.

1.5 Lyophilisation du complexe dMEC-rhBMP-2

Pour évaluer cette possibilité, une dMEC préincubée avec la rhBMP-2 a été lyophilisée et comparée à une dMEC fraîche également préincubée. Des cellules C2C12 ont été ensemencées sur ces différentes dMEC puis incubées pendant 6 jours et leur activité PAL respective a alors été mesurée. Elles s'avèrent être équivalentes avant et après lyophilisation (Figure 28).

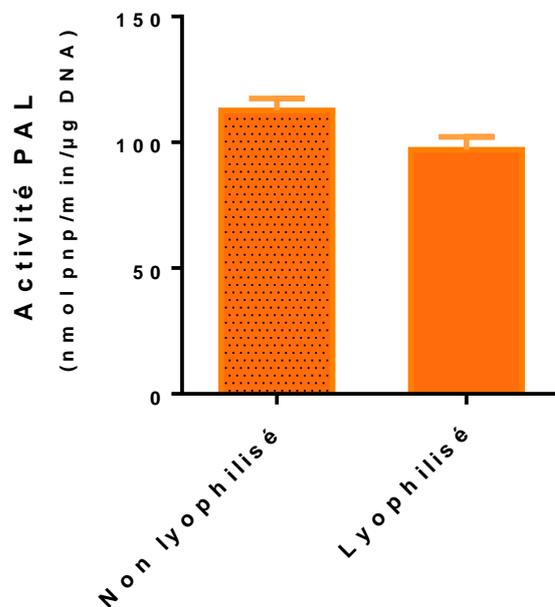


Figure 28 : Effet de la lyophilisation sur l'activité de rhBMP-2 retenue.

Les dMEC ont été incubées avec la rhBMP-2 ($1.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$) puis lyophilisées ou non. Les cellules C2C12 ont été ensemencées sur les dMEC puis cultivées pendant 6 jours, après quoi l'activité PAL a été mesurée. (N=3)

Nous avons donc montré que le complexe dMEC-rhBMP-2 est biologiquement actif et lyophilisable, ce qui est potentiellement intéressant pour une application en clinique. Pour s'assurer de l'intérêt de ce complexe, nous avons voulu savoir s'il était en mesure d'induire une formation osseuse *in vivo*.

1.6 Potentiel ostéoinducteur d'un PITO PCL-dMEC-BMP-2 *in vivo*

Nous avons utilisé comme support de la dMEC une matrice en polycaprolactone (PCL) très poreuse dans les 3 dimensions. Celle-ci se présente sous la forme d'un disque formé d'un maillage de fibres de PCL toutes espacées de 300 μm (Figure 19). L'intérêt de ce matériau est qu'il est radio-transparent, permettant un suivi longitudinal en microtomographie à rayon X lorsqu'il est implanté chez l'animal. Aussi, ce matériau n'est pas résorbable, ni ostéo-conducteur, ni ostéo-inducteur *per se*. Les CSMs ont été cultivées sur ces implants (\varnothing 5.2mm) en présence d'AA2P pendant 21 jours. Ils ont ensuite été décellularisés (PCL-dMEC-AA2P) puis incubés avec des doses croissantes de rhBMP-2 (1 μg , 2 μg et 5 μg rhBMP-2, figure 29A). Après incubation des PITO avec la rhBMP-2, la fraction non retenue a été dosée en ELISA et révèle que 30% de la rhBMP-2 a été retenue quelque soit la dose de BMP-2 initiale alors qu'environ 60% était retenue dans le modèle en 2 dimensions (voir figure 25). Les quantités de rhBMP-2 retenues et donc implantées sont présentées figure 29A et vont de 300 ng à 1.7 μg par PITO. Ces PITO ont ensuite été implantés en site ectopique chez la souris et un suivi de la formation osseuse a été réalisé en microtomographie à rayon X toutes les deux semaines pendant 2 mois. Cette méthode non invasive permet de mesurer différents paramètres, en particulier le volume osseux, (Figure 29C) c'est à dire le volume occupé par l'os au sein de l'implant. Les résultats obtenus indiquent tout d'abord qu'il n'y a aucune formation osseuse dans la condition PCL dECM en l'absence de BMP-2, et ce, quelque soit le temps d'analyse. Au contraire, en présence de rhBMP-2, la formation osseuse débute dès 14 jours, mais uniquement dans la condition avec la concentration de BMP-2 la plus élevée (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μg initial, 1.7 μg retenu). Aux plus faibles doses, une formation osseuse existe, cependant, elle est faible et n'est significativement différente de la condition PCL dECM qu'à partir de 28 jours et uniquement pour la dose de 2 μg initiale. Au dernier temps analysé, i.e. 6 semaines, la quantité d'os formée dans la meilleure condition est de 4.3 mm^3 pour un implant d'environ 21 mm^3 « utile » (correspondant au volume des pores, qui est d'environ 60% à 70%).

A

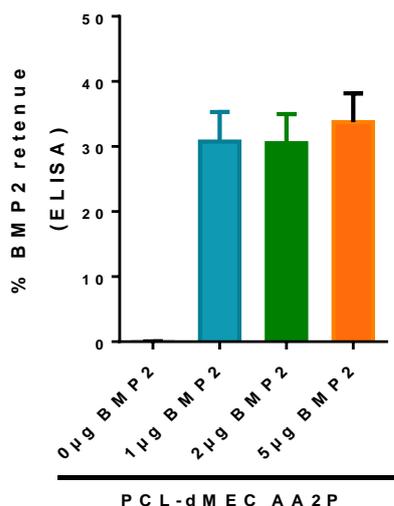
Concentration Initiale rhBMP2	Quantité initiale \$	Quantité implantée\$	Quantité par Volume*\$	Quantité par surface**\$
50 µg/ml	5 µg	1.7 µg	50 ng/mm ³	850 ng/cm ²
20 µg/ml	2 µg	0.61µg	18 ng/mm ³	305 ng/cm ²
10 µg/ml	1 µg	0.3 µg	8.8 ng/mm ³	150 ng/cm ²

\$: pour l'implant utilisé : Ø = 5.2 mm, l = 1.6 mm dans un volume d'incubation de 100 µl

* : Pour un volume d'implant de 34mm³, ce volume ayant une porosité de 60 à 70 %

** : Surface de croissance cellulaire donnée par le constructeur = 2 cm²

B



C

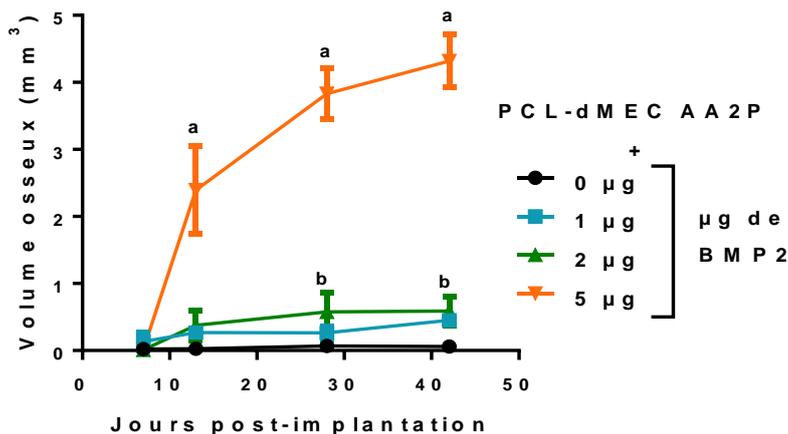


Figure 29 : Rétention de la BMP-2 sur des implants PCL-dMEC-AA2P et formation osseuse *in vivo*.

A. Les implants PCL recouverts d'une dMEC ont été incubés avec une dose croissante de rhBMP-2. B. La BMP-2 non retenue a été dosée par ELISA et le pourcentage de rétention est présenté. C. Après implantation, les souris ont été imagées à J7/J14/J28/J42 par microtomographie à rayon X. Le volume osseux est présenté. N=4

Nous avons donc montré qu'une MEC synthétisée par des CSMs puis décellularisée a la capacité de retenir la BMP-2, que l'activité de cette BMP-2 est conservée y compris après lyophilisation, et que finalement un produit d'ingénierie tissulaire osseuse composé d'une matrice extracellulaire décellularisée et de rhBMP-2 induit une formation osseuse *in vivo*.

Nous avons comparé dans la deuxième partie une MEC synthétisée par des CSMs cultivées en condition promouvant la différenciation ostéogénique (OS) avec une MEC produite par des CSM cultivées comme précédemment, en présence d'AA2P. En effet, la condition OS pourrait augmenter la rétention de BMP-2 car les minéraux de phosphate de calcium synthétisés par les CSMs dans cette condition pourraient avoir une forte affinité pour la BMP-2 comme c'est le cas pour l'hydroxyapatite synthétique. De plus, une matrice extracellulaire minéralisée est plus

proche de l'environnement naturel des cellules ostéocompétentes de l'hôte et pourrait participer au recrutement de ces cellules et permettre une formation osseuse plus importante.

2 De l'intérêt d'utiliser une MEC minéralisée ou non.

2.1 Caractérisation des dMEC in vitro

Les différentes matrices extracellulaires ont été obtenues après culture en condition AA2P ou OS pendant 21 jours, temps suffisant pour obtenir une minéralisation de la MEC OS. Le contenu en collagène fibrillaire, en protéines, et en GAG a été déterminé avant et après décellularisation comme précédemment après coloration avec le Sirius Red/Fast Green et la Safranine O (Figure 30). Tout d'abord, en comparant les deux conditions avant décellularisation, il apparaît que les synthèses de collagène, de protéines et de GAG sont plus faibles dans la condition OS que dans la condition AA2P

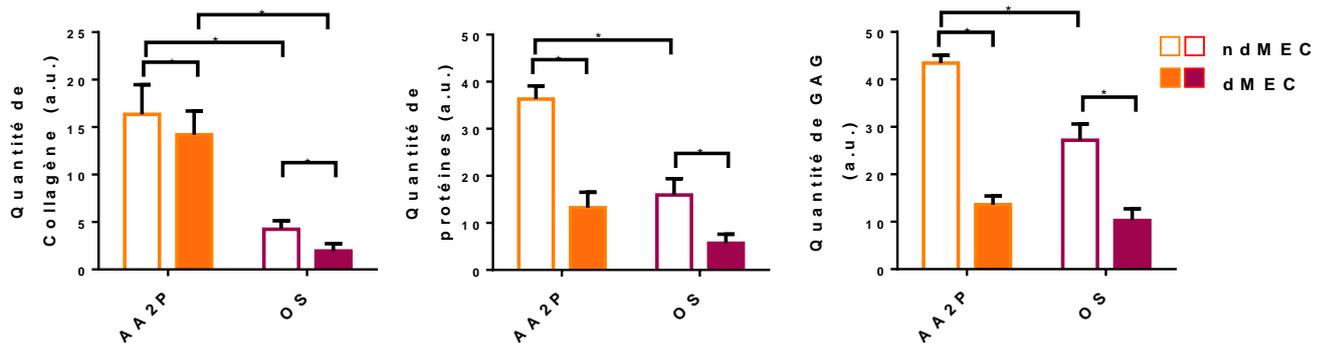


Figure 30 : Comparaison de la production de collagène et de GAG avant et après décellularisation.

Les CSMs ont été cultivées pendant 21 jours en présence d'AA2P ou dans un milieu promouvant la différenciation ostéogénique, décellularisées ou pas puis colorées avec le sirius red/Fast green ou la safranin O. N=4 * : $p < 0.05$ RM 2ways ANOVA +bonferonni post Hoc test.

Ensuite, en comparant les deux conditions avant et après décellularisation, il apparaît que le processus de décellularisation induit une plus forte diminution du contenu en collagène dans la condition OS que dans la condition AA2P (-54% vs -13%). A l'inverse, la quantité de GAG baisse légèrement plus dans la condition AA2P (-69%) que dans la condition OS (-62%) après décellularisation. Le contenu en protéines totales est quant à lui affecté de la même manière par la décellularisation (-63% vs -64%) dans les deux conditions. Ainsi, la dMEC-AA2P contient 7.3 fois plus de collagène fibrillaire, 2.3 fois plus de protéines totales et 1.3 fois plus de GAG que la dMEC-OS bien que la différence ne soit significative que pour le contenu en collagène.

Les deux types de dMEC ont donc un profil matriciel différent quantitativement, mais aussi qualitativement puisque la dMEC-OS est potentiellement minéralisée contrairement à la dMEC AA2P.

Nous avons voulu savoir si ces différents profils de dMEC avaient un effet sur leur potentiel de rétention de BMP-2. Les deux types de dMEC ont donc été pré-incubés avec de la rhBMP-2. Après avoir prélevé puis dosé par ELISA la fraction non retenue, la capacité des dMEC-AA2P et OS chargées en BMP-2 à induire l'activité PAL chez les cellules C2C12 a été mesurée. Le dosage de rhBMP-2 par ELISA indique que le pourcentage de rétention de BMP-2 par les deux dMECs est proche (46% vs 55% pour dMEC-AA2P vs dMEC-OS, respectivement) (Figure 31A). Comme attendu, en absence de BMP-2, l'activité PAL des C2C12 est quasi nulle. En présence de BMP-2, les activités PAL des C2C12 cultivées sur les deux dMECs sont élevées et similaires (Figure 31B). Ceci tend à démontrer que la BMP-2 ne se lie pas préférentiellement à une matrice extracellulaire minéralisée.

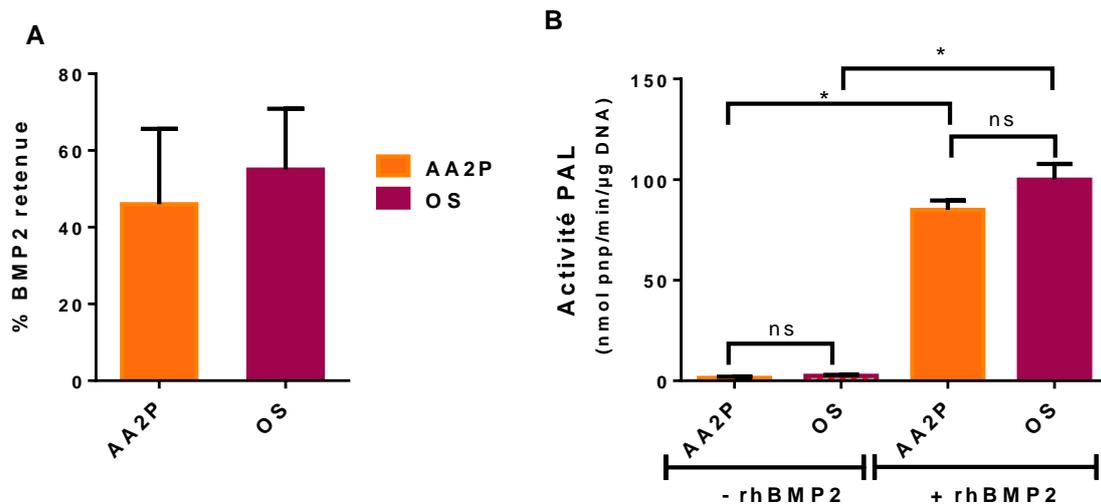


Figure 31 : Rétention et bioactivité de la rhBMP-2 dans les dMECs-AA2P et -OS.

Les dMECs-AA2P et -OS ont été incubées avec 1µg de rhBMP-2, puis la fraction non retenue a été dosée par ELISA. N=3 t-test * p<0.05 Après lavage, les dMEC préincubées ont étéensemencées avec des cellules C2C12, incubées pendant 6 jours, lysées et leur activité PAL a été déterminée. N=3 one way ANOVA + bonferonni post-Hoc test *p<0.05

2.2 Comparaison fonctionnelle des PITOs.

Malgré cette similitude, nous avons décidé de comparer la capacité de la dMEC-AA2P et de la dMEC-OS pré-incubée avec la rhBMP-2 à induire une formation osseuse *in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé les mêmes types d'implants en PCL que précédemment. Nous avons d'abord

caractérisé nos PITO pour savoir (i) si les cellules ensemencées en 3 dimensions survivent dans les deux conditions de culture, (ii) si les cellules en condition OS produisent bien une MEC minéralisée sur les implants en PCL et (iii) si celle ci est morphologiquement différente de la MEC-AA2P.

2.2.1 Caractérisation des implants

2.2.1.1 Viabilité des cellules sur les implants

Les CSMs ont été ensemencées sur les matrices PCL en milieu complet. Après 24h et avant la mise en culture avec le milieu OS ou AA2P, la répartition et la viabilité des cellules a été visualisée par un marquage à la Calcein-AM. Ce fluorochrome a la particularité de n'être fluorescent que dans les cellules vivantes, actives métaboliquement. Les images prises en microscopie à fluorescence montrent une forte densité cellulaire et la présence de ponts cellulaires entre les fibres de PCL. Cependant, la répartition cellulaire n'est pas totalement homogène (Figure 32). Après 21 jours de culture dans les milieux AA2P et OS (Figure 33), un tapis cellulaire est toujours présent avec une densité cellulaire visuellement équivalente dans les deux conditions. Une observation à plus fort grossissement fait apparaître que les cellules ne semblent pas spécifiquement alignées dans le sens des fibres de PCL.

J1

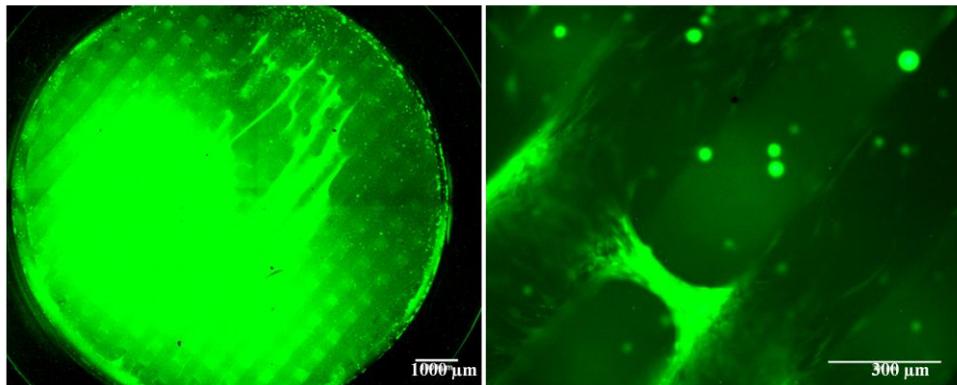


Figure 32 : Répartition et viabilité des cellules 24h post ensemencement.

Les cellules sur les implants PCL ont été incubées avec 1 μ M de Calcein AM puis visualisées en microscopie à épifluorescence.

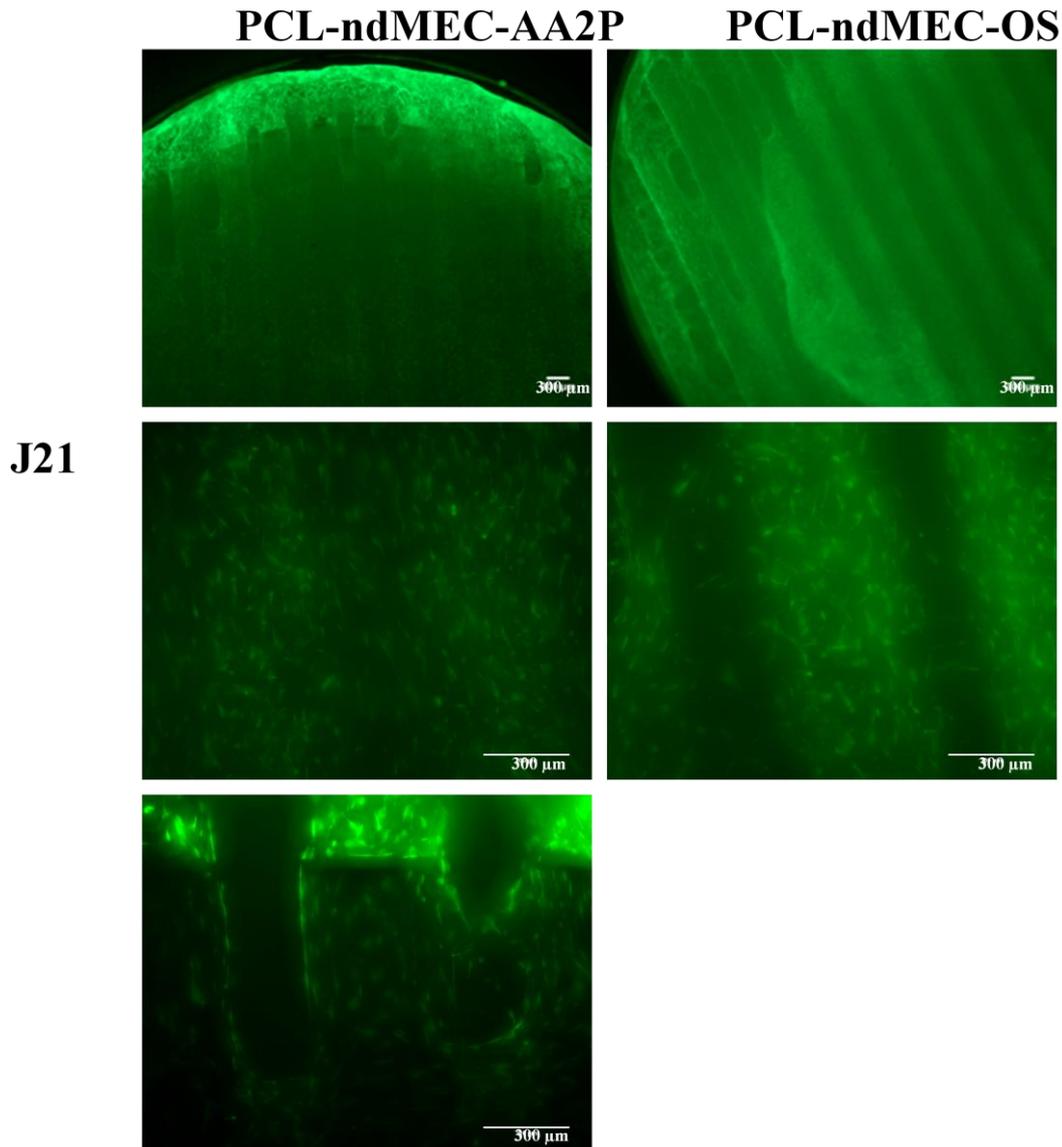


Figure 33 : Répartition et viabilité des cellules après 21 jours de culture en milieu AA2P ou OS. Les cellules sur les implants PCL ont été incubées avec 1 μ M de Calcein AM puis visualisées en microscopie à épifluorescence.

2.2.1.2 Analyse des PITO en Microscopie Electronique à Balayage

Le marquage à la Calcéine AM ne permet pas d'observer la matrice extracellulaire. Pour évaluer les différences morphologiques entre les deux types de MEC produites, les implants ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB) après avoir été décellularisés.

Aux faibles grossissements (Figure 34, 100X), il apparaît que la dMEC est visible sur les fibres de PCL, des ponts de matrice cellulaire entre les fibres étant également bien visibles pour les deux types de culture. Les images prises à plus fort grossissement révèlent aussi une différence de structure des deux MEC, la condition AA2P produisant une MEC composée de fibres fines alors que la condition OS produit des fibres plus épaisses et contenant de nombreux nodules minéralisés (5000X, flèches rouges).

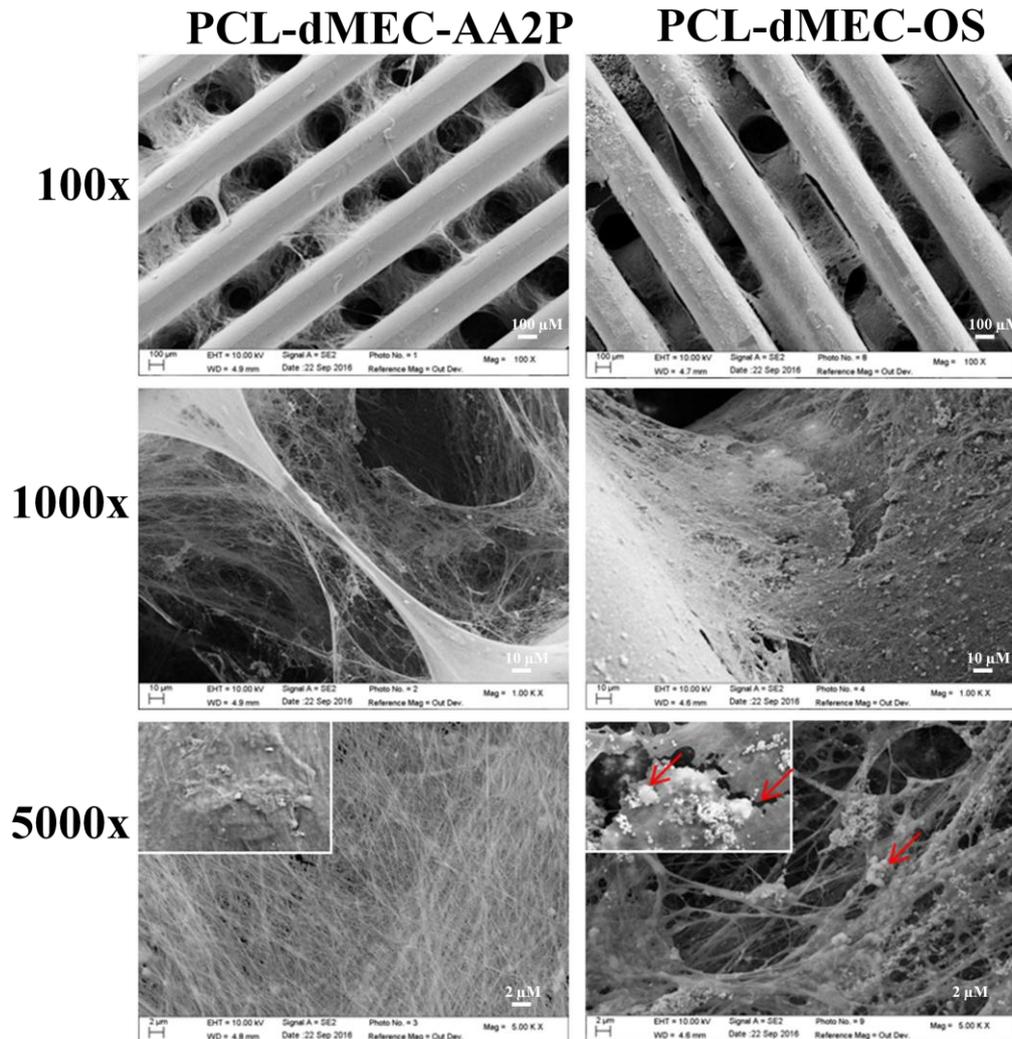


Figure 34 : Microscopie électronique à balayage (MEB) des implants décellularisés. Après décellularisation, les PITOS PCL-dMEC-AA2P et OS ont été fixés, recouverts de particules d'or et analysés en MEB.

2.2.2 Capacité des PITOs à retenir la rhBMP-2

Les résultats obtenus *in vitro* en 2D et 3D montrent une différence quantitative (Figure 30) et qualitative (Figure 34) entre les deux types de matrices extracellulaires testées. Nous avons donc voulu savoir si ces différences de structure et de composition influent sur la rétention de BMP-2. Pour ce faire, des implants PCL de \varnothing 10 mm ont été ensemencés avec des CSMs puis incubés 21 jours dans les milieux AA2P ou OS. Ils ont été décellularisés, puis incubés avec 12,5 μ g de rhBMP-2, donnant lieu aux PITOs « PCL-dMEC-AA2P-BMP-2 » et « PCL-dMEC-OS-BMP-2 ». Un contrôle composé d'un implant PCL, sans dMEC, incubé avec la rhBMP-2 a aussi été utilisé (PCL-BMP-2). Après l'incubation, la fraction non retenue a été dosée par ELISA et montre que 85% de la BMP-2 est retenue sur ces implants, quelque soit la condition

de culture (Figure 35). Aussi, 16% de la BMP-2 chargée initialement est retenu dans les implants 3DPCL sans dMEC.

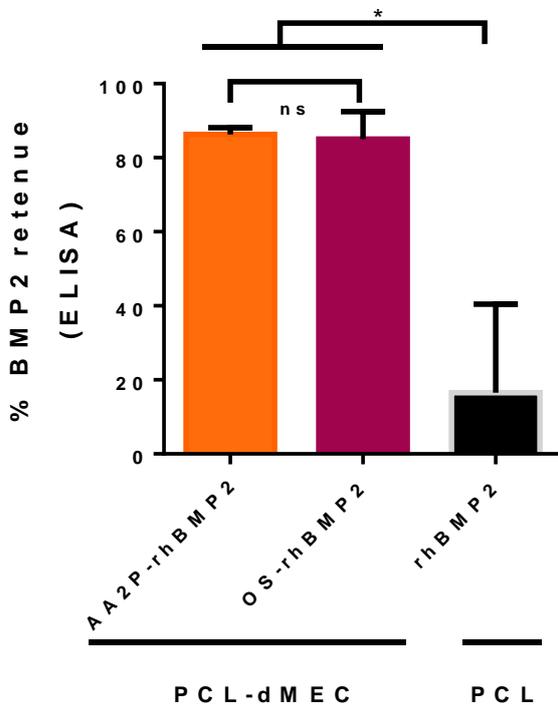


Figure 35 Rétention de la BMP-2 sur des implants PCL, PCL-dECM-AA2P et PCL-dECM-OS.

Les implants PCL (Ø 10 mm) recouverts d'une dMEC synthétisée par les CSMs en condition AA2P ou OS ont été incubés avec 12.5µg de rhBMP-2. Un contrôle PCL sans dECM a été utilisé. La fraction non retenue a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en pourcentage de rétention. N=4 * : p<0.05

2.2.3 Analyse de la formation osseuse in vivo

Les résultats précédents obtenus *in vitro* en 2D et 3D montrent une différence quantitative et qualitative entre les deux types de matrice avec cependant une rétention de BMP-2 du même ordre. Nous avons donc voulu savoir si la capacité d'induction de la formation osseuse des deux types de PITO était aussi similaire. Les PITO préalablement formés ont été implantés en sous cutané chez la souris et un suivi longitudinal de la formation osseuse par microtomographie à rayon X a été réalisé (Figure 36A). Dès 15 jours après implantation, une formation osseuse est présente dans les trois conditions, y compris dans la condition PCL-BMP-2, i.e. sans dMEC, ce qui démontre qu'une fraction de la rhBMP-2 est vraiment retenue dans cette condition et qui confirme les résultats précédents obtenus sur le taux de rétention de la rhBMP-2 par le PCL. Cependant, cette formation osseuse est bien inférieure à celle obtenue pour les PITO PCL-dMEC-AA2P-BMP-2 et PCL-dMEC-OS-BMP-2 (4,4 et 2,2 fois inférieure

à J15) et pour lesquels aucune différence significative n'est visible quelque soit le temps analysé. Néanmoins, une tendance à une formation osseuse plus rapide pour les PITO PCL-dMEC-AA2P-BMP-2 est visible puisque le pic de formation osseuse est atteint dès 15 jours alors que ce maximum est atteint à 40 jours pour les PITO PCL-dMEC-OS-BMP-2. L'analyse de la reconstruction en 3 dimensions des images de microscanner a été réalisée pour évaluer la répartition de l'os néoformé. Les deux types de PITO présentent une majorité de formation osseuse autour des fibres de PCL localisées à l'extérieur de l'implant (Figure 36B, flèches blanches) et peu ou pas de formation osseuse au centre de l'implant (flèches rouges).

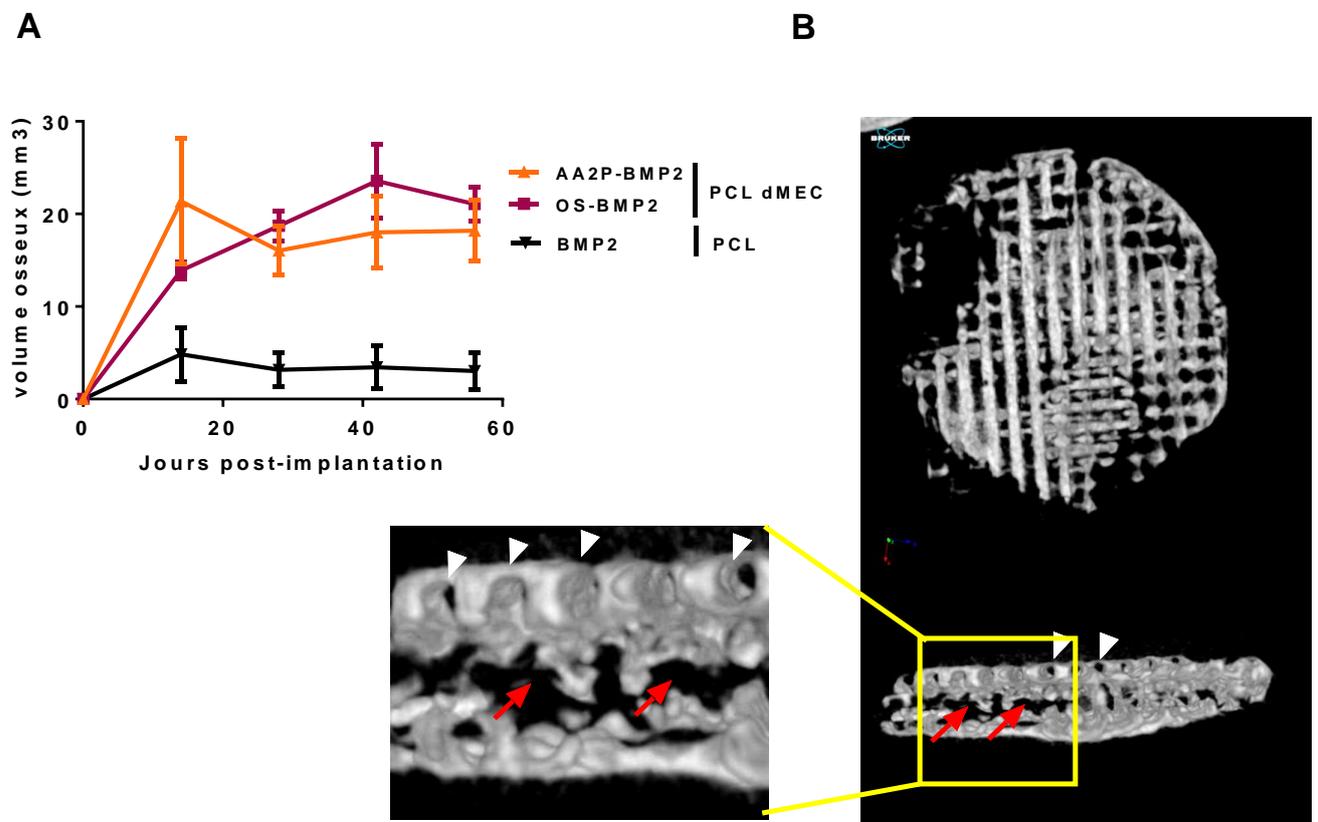


Figure 36 Analyse de la formation osseuse en microtomographie à rayon X.

Après l'implantation des PITO PCL-dMEC-AA2P-BMP-2, PCL-dMEC-OS-BMP-2 et PCL-BMP-2, les souris ont été imagées toutes les 2 semaines par microtomographie. A. Cinétique de la formation osseuse (volume osseux). B. Visualisation d'un implant après reconstruction. Les flèches blanches montrent des fibres de PCL extérieures entièrement recouverte d'os. Les flèches rouges montrent des fibres de PCL au centre de l'implant partiellement recouvertes d'os. N=4

Pour confirmer ces résultats, une étude qualitative histologique a été réalisée. Après explantation, les PITO ont été fixés, coupés en deux puis un demi-échantillon a été inclus dans une résine de méthyl-méthacrylate puis coloré au Bleu Stevenel et Picrofuschine de Van

Gieson. L'autre moitié de chaque échantillon a été décalcifié, inclus en paraffine puis coloré avec le Trichrome de Masson.

L'inclusion en résine permet de réaliser des coupes épaisses (100 μm) et de visualiser la formation osseuse sur tissu non décalcifié, ce qui permet de limiter les changements de structure de l'implant liés à la décalcification et à la coupe fine. Les coupes histologiques (figure 37) mettent en évidence une quantité de tissu osseux (coloré en rouge) plus importante pour les PITO_s PCL-dECM-AA2P-BMP-2 et PCL-dECM-OS-BMP-2 que pour les PITO_s PCL-BMP-2. Aussi, il ne semble pas y avoir de différences entre les deux PITO_s AA2P et OS ce qui confirme les résultats de l'analyse en microscanner. Du point de vue macroscopique, le tissu osseux est observé sur les bords de l'implant, avec, dans de rares zones, du tissu osseux présent à l'intérieur de l'implant (par exemple PCL-dECM-OS-BMP-2, zone zoomée). A une échelle microscopique, ce tissu osseux semble apposé directement aux fibres de PCL (flèches noires).

L'inclusion en paraffine permet de réaliser des coupes fines (7 μm) et de mettre en évidence d'autres informations à l'échelle de la cellule (Figure 38). Tout d'abord, le tissu osseux (coloré en bleu) apparaît lamellaire et comporte de nombreux ostéocytes enchâssés (flèche noires). Ensuite, bordant le tissu osseux, de nombreux ostéoblastes et/ou cellules bordantes sont présents (flèches rouges). Finalement, on remarque la présence de vaisseaux sanguins (BV) et de moelle osseuse (BM) comportant de nombreux adipocytes.

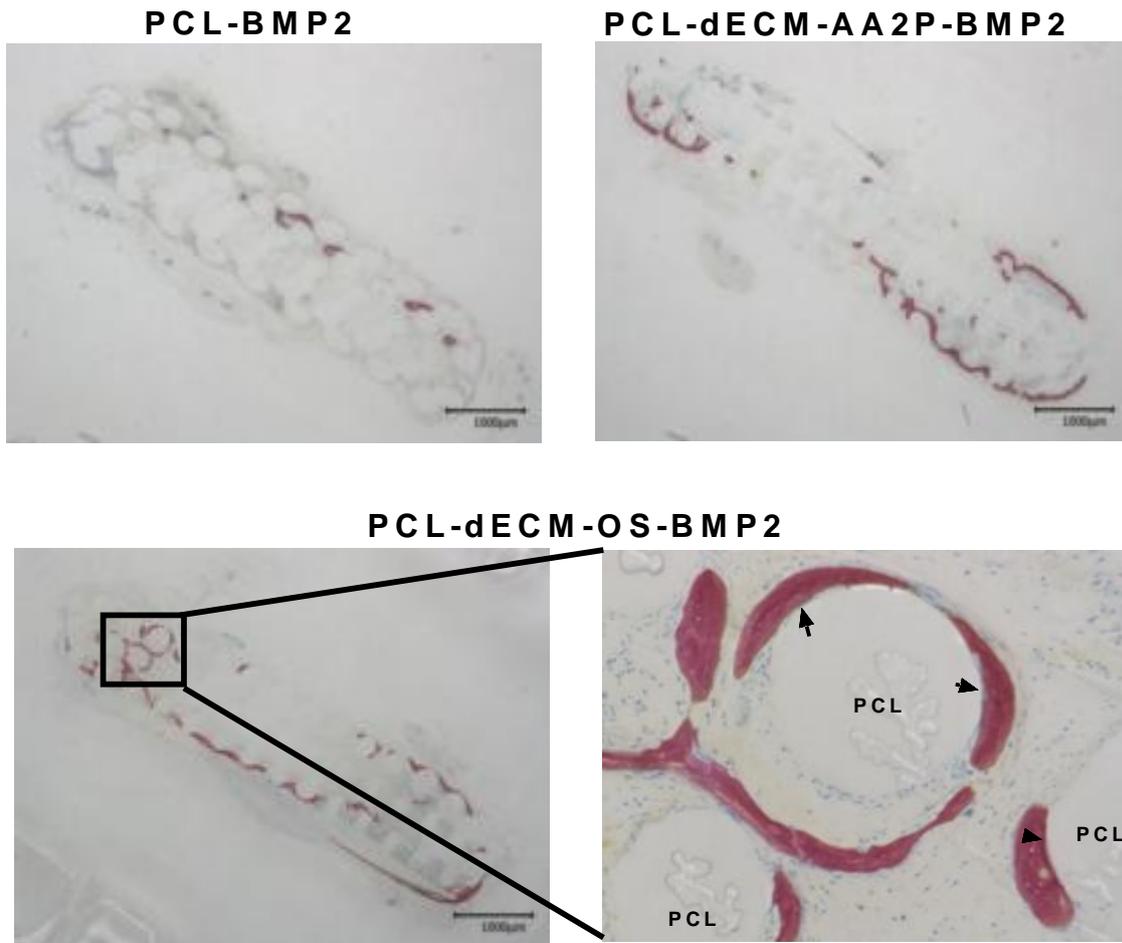


Figure 37 Visualisation du tissu osseux par histologie en méthyl-méthacrylate et coloration à la Picrofuschine de Van Gieson

Photographies de coupes de 100 µm des implants inclus en résine de méthyl méthacrylate à 8 semaines post-implantation et colorées au Bleu Stevenel et Picrofuschine de Van Gieson. L'os apparait en rouge (collagène) et les noyaux cellulaires en bleu. Les flèches indiquent une zone d'apposition du tissu osseux au matériau PCL.

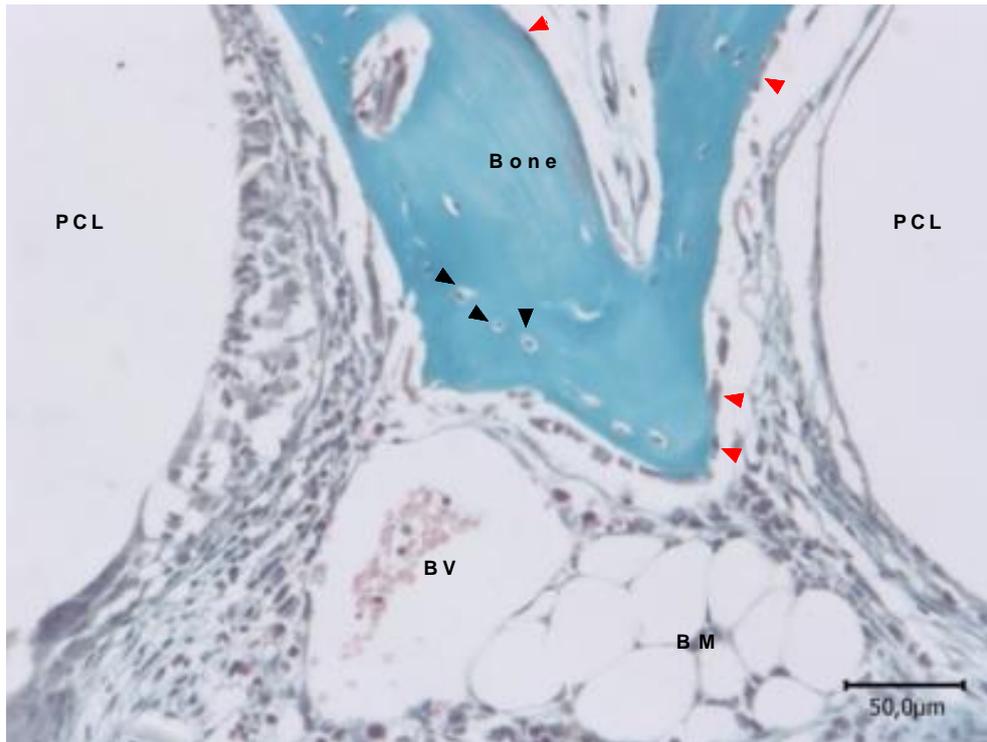


Figure 38 : Visualisation des implants par histologie en paraffine et coloration au trichrome de Masson.

Photographies de coupes de 7 µm des implants décalcifiés inclus en paraffine à 8 semaines post-implantation et colorées au trichrome de Masson. L'os apparaît en Bleu (collagène), les noyaux cellulaires en bleu/noir, le cytoplasme en rouge et les globules rouges en rose. Les flèches noires montrent des ostéocytes. Les flèches rouges montrent des ostéoblastes / cellules bordantes. (BV : vaisseaux sanguins, BM : moelle osseuse-adipocytes, PCL : polycaprolactone

2.2.4 Libération de la BMP-2 *in vivo*

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative sur le plan de la formation osseuse entre les PITO AA2P et OS. Cependant, il semble que la cinétique de formation soit plus rapide pour les PITO PCL-dMEC-AA2P BMP-2. Nous nous sommes donc demandés si cette différence pourrait être due à une différence dans la cinétique de libération de la BMP-2. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé une autre méthode pour déterminer la quantité de BMP-2 présente sur le PITO, basée sur la fluorescence et permettant un suivi longitudinal *in vivo*. Pour ce faire, une série de PITO de Ø 5.2 mm, cultivée dans les mêmes conditions a été décellularisée, puis incubée avec 4 µg de rhBMP-2 et 1 µg rhBMP-2 couplé à un fluorochrome émettant dans le proche-infra-rouge (rhBMP-2-FL800) pendant 1 heure. Tout d'abord, le taux de rétention a été calculé. Après l'incubation avec le mélange rhBMP-2/rhBMP-2-800, les PITO ont été prélevés et leur fluorescence a été mesurée à l'aide de l'imageur Lumina II. En parallèle, la fluorescence de la fraction non retenue après l'incubation (environ 80% du volume initial) a aussi été mesurée. Le pourcentage de rétention est alors défini par :

$$\text{Taux de rétention (\%)} = \left[\frac{\text{Fluorescence du PITO}}{\text{Fluorescence du PITO} + \text{Fluorescence non retenue}} \right] \times 100$$

La fluorescence des PITO_s PCL-dMEC-AA2P et PCL-dMEC-OS représente 44% et 51% de la fluorescence initiale respectivement (figure 39A); la quantité de BMP-2 retenue est donc supérieure pour la condition OS par rapport à la condition AA2P. Aussi, il faut noter que ces taux de rétention sont inférieurs de presque moitié à ceux obtenus par la technique ELISA.

Après la préincubation avec le mélange rhBMP-2/rhBMP-2-FL800, les PITO_s ont été implantés en sous cutanée chez la souris et une image en fluorescence a été prise immédiatement après l'implantation puis aux temps mentionnés. Les résultats montrent que la fluorescence résiduelle (normalisée par rapport à celle obtenue à J0, figure 39B) sur les PITO_s diminue progressivement de façon quasi linéaire quelle que soit la condition expérimentale. La libération semble quand même légèrement plus lente dans la condition OS puisqu'il faut 11 jours pour atteindre le seuil de 50% de fluorescence initiale alors qu'il en faut 8 dans la condition AA2P.

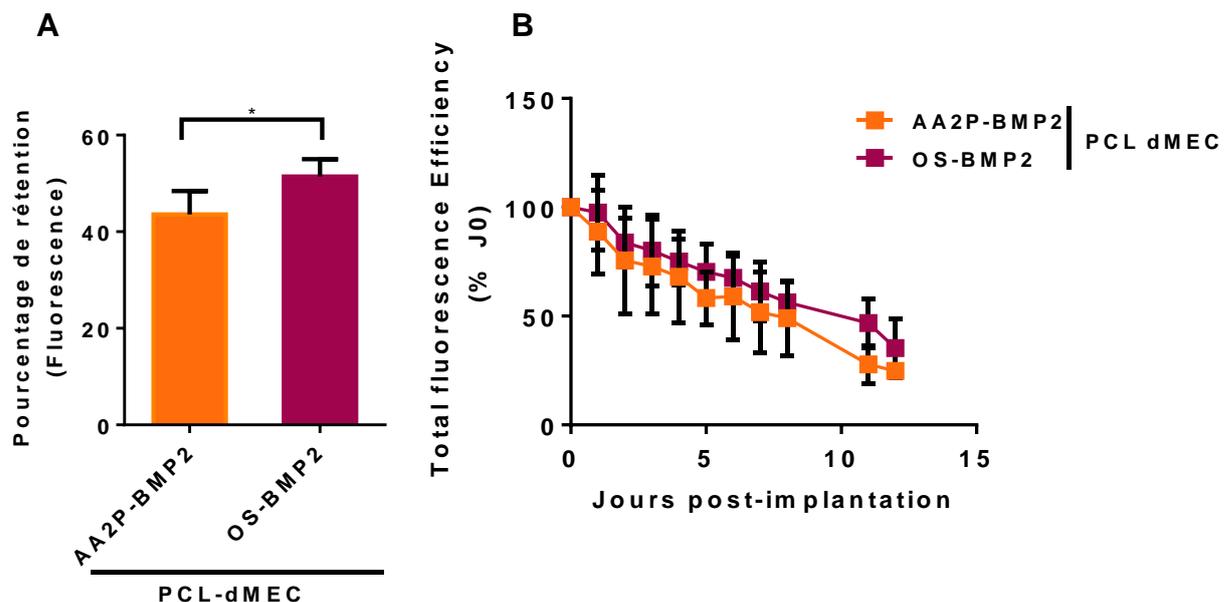


Figure 39 : Rétention et suivi de la BMP-2 *in vivo* par fluorescence proche infra-rouge

Les implants PCL recouverts d'une dMEC synthétisée par les CSMs en condition AA2P ou OS ont été incubés avec 4µg de rhBMP-2 et 1µg rhBMP-2-FL800. La fluorescence du PITO ainsi que de la fraction non retenue a été mesurée par imagerie. Les résultats sont présentés en pourcentage de rétention. B. Les souris ont été imagées aux temps J0/J1/2/3/4/5/6/7/8/11/12 et la fluorescence de chaque PITO a été rapportée à sa fluorescence à J0. N=5

Discussion

1 Problématique générale

Les grandes pertes de tissu osseux suite à un traumatisme, une tumeur ou une infection représentent une cause importante d'invalidité et de handicap. L'autogreffe de tissu osseux est toujours le traitement de référence pour réparer ces grands défauts osseux mais celui-ci souffre d'inconvénients, en particulier, une morbidité importante au site prélèvement du greffon et une quantité limitée de celui-ci. L'utilisation de matériaux substitués osseux est l'alternative usuelle pour la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale; néanmoins, ces matériaux sont dépourvus de propriété biologique ostéo-inductrice, limitant leur efficacité à la réparation de défauts de petite taille. Une approche en médecine régénérative osseuse consiste à rendre ces matériaux implantables biologiquement actifs, en leur associant des molécules ostéo-inductrices, telle que la Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). La BMP-2 est utilisée en clinique dans certaines pathologies mais se heurte à des effets secondaires importants (ossification hétérotopique, formation de pseudo-kystes/œdèmes) en raison des fortes doses utilisées. Il est donc nécessaire d'évaluer de nouveaux matériaux supports, synthétiques ou naturels et démontrant une meilleure rétention, permettant ainsi de diminuer les doses de BMP-2 implantées. Dans ce cadre, une stratégie récente consiste à recouvrir les matériaux de biofilms, constitués de couches alternées (LbL, Layer by Layer) de poly(L-lysine) (PLL) et de hyaluronane, stratégie qui s'est montrée performante pour retenir la BMP-2 et induire une formation osseuse à leur contact.

Une autre stratégie serait d'utiliser comme véhicule de BMP-2 une matrice extracellulaire complète et complexe, plutôt qu'un composant unique purifié issu de la matrice extracellulaire comme le sont le collagène, les héparanes sulfates ou la fibronectine, tous déjà étudiés comme

vecteur de libération de BMP-2. C'est l'objet de ce projet qui est d'étudier une MEC produite par des cellules stromales mésenchymateuses. L'utilisation d'une MEC permet d'allier plusieurs avantages. D'une part, la multiplicité des composants de la MEC pourrait permettre de retenir la BMP-2 avec toute une gamme d'affinité, puis de la libérer progressivement. D'autre part, elle présente de nombreux effets cellulaires. En particulier, plusieurs de ses composants tels que certains GAG, peuvent moduler les effets biologiques de la BMP-2. Par ailleurs, son architecture, ses propriétés mécaniques et sa composition, adaptées aux cellules, favorisent l'adhésion des cellules de l'hôte et peuvent moduler la prolifération ou la différenciation des cellules progénitrices (CSMs ou progéniteurs endothéliaux) qui vont participer à la formation osseuse

2 Synthèse de la MEC.

Dans ce projet, deux MEC obtenues selon deux conditions de culture différentes (en présence d'acide ascorbique et en condition ostéogénique) ont été évaluées. La supplémentation en acide ascorbique lors de la culture des CSMs est justifiée car, il est maintenant clairement établi que cette molécule augmente la synthèse de collagène (Clerck and Jones 1980), permettant d'obtenir une MEC plus importante. Cependant, son effet sur la synthèse des GAGs et des protéoglycanes est moins bien établi avec quand même un effet positif sur la sécrétion de sulfate de dermatan par les fibroblastes (Schafer et al. 1966). Par ailleurs, la production de MEC en condition ostéogénique se justifie pour plusieurs raisons. D'une part, la MEC minéralisée, c'est-à-dire chargée de cristaux d'hydroxyapatite, est de composition potentiellement plus proche des conditions physiologiques du tissu osseux puisque produite par des cellules en voie de différenciation ostéogénique. D'autre part, il est connu que l'hydroxyapatite synthétique (céramique proche de la partie minérale de l'os) a une affinité forte pour les protéines, et en particulier pour la BMP-2. Enfin, l'affinité d'une MEC produite par des ostéoblastes pour la BMP-2 a déjà été mesurée (Bhat et al. 2011) et, dans un contexte plus proche de notre travail, une MEC décellularisée minéralisée, produite par des CSMs en condition ostéogénique, a déjà été utilisée pour retenir de la BMP-2 (Kang et al. 2011). Cependant, la synthèse de cette MEC a été réalisée par culture sur une céramique (β -TCP), elle-même pouvant retenir de la BMP-2. Dans ce travail de Kang et al, il est montré que les profils de rétention / désorption de la BMP-2 varient selon la présence de dMEC sur le β -TCP, démontrant l'intérêt de celle-ci pour retenir la rhBMP-2. Cependant, aucune information n'est

disponible concernant l'intérêt d'utiliser une matrice obtenue en condition de différenciation ostéogénique plutôt qu'une matrice « simple », i.e. non minéralisée.

Nous avons tout d'abord confirmé que la culture des CSMs en présence d'acide ascorbique (AA2P) induit une augmentation du contenu en collagène total, mais aussi de celui en GAGs et en protéines totales, données moins décrites dans la littérature. Le contenu spécifique de la MEC n'a cependant pas été analysé. Dans le contexte qui nous intéresse, à savoir, la rétention de BMP-2 sur une MEC décellularisée, il serait intéressant de définir quels types de collagène, de protéoglycanes, et d'autres composants sont augmentés. En effet, l'affinité de la BMP-2 est différente suivant les types de collagène, de GAG et même de protéoglycanes. Aussi, certaines protéines de la MEC (fibronectin, fibrillin, tableau 4) ont une affinité pour la BMP-2.

Afin de moduler cette composition, nous avons choisi de comparer cette MEC issue de la culture de CSMs en présence d'AA2P et une MEC issue de la culture de CSMs en conditions favorisant la différenciation ostéogénique (OS). Ces deux conditions de culture contiennent de l'acide ascorbique et on aurait pu s'attendre à un contenu en collagène et en GAG proche pour les deux MEC. Cela n'est pas le cas puisque la MEC est beaucoup moins riche en collagène et en GAG dans la condition OS que dans la condition AA2P. Plusieurs explications sont possibles. Tout d'abord, en condition physiologique, lors du processus d'ossification endochondrale, la MEC est d'abord synthétisée puis, lors de sa minéralisation, cette MEC est remodelée, ce qui se traduit par une diminution du collagène II (Mwale et al. 2002). Il est donc possible, dans nos conditions *in vitro*, qu'un phénomène similaire se produise et que le contenu de la MEC soit maximal à un temps plus précoce que 21 jours. De plus, dans des modèles de différenciation ostéogénique *in vitro*, il a été montré que la présence de β -glycérophosphate (présent dans le milieu OS) induit une diminution de la synthèse de collagène (Tenenbaum 1987). Hormis cette différence de quantité, une autre différence importante existe entre les deux types de MEC. En effet, celle synthétisée en condition OS contient des cristaux de phosphate de calcium (observés en microscopie électronique à balayage) qui pourraient retenir la BMP-2 comme c'est le cas pour l'hydroxyapatite synthétique.

L'avantage de la MEC comme support de rétention de la BMP-2, est que sa composition ainsi que son architecture est beaucoup plus complexe qu'une matrice à base d'une protéine purifiée comme le collagène par exemple. Ainsi, sa composition peut être modulée facilement, en utilisant différents types cellulaires ou en modifiant les conditions de culture.

Nous avons choisi les CSMs car ce sont des cellules fibroblastiques, pouvant sécréter une matrice extracellulaire abondante, et qu'elles ont la capacité de se différencier vers différentes lignées cellulaires (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes) et donc potentiellement de sécréter des MECs qualitativement différentes. Les fibroblastes, cellules particulièrement actives dans la production de MEC, figurent parmi les autres types cellulaires qui pourraient aussi être utilisés pour produire une dMEC affine à la BMP-2. Les chondrocytes ou des CSMs différenciées en chondrocytes sont également intéressants car dans le cas de l'ossification endochondrale, ce sont les chondrocytes qui synthétisent la matrice qui sera minéralisée ensuite par les ostéoblastes. De plus, ces cellules produisent une MEC qualitativement différente (riche en collagène de type II et IX) des cellules ostéoblastiques.

Comme démontré par nos résultats, des conditions de culture spécifiques influent sur la synthèse de MEC. Des études ont montré que la culture des cellules dans un milieu en présence de macromolécules telles que les carraghénanes ou les dextrans, qui ont pour effet d'augmenter l'encombrement moléculaire (molecular crowding) du milieu et ainsi d'augmenter virtuellement la concentration locale des facteurs de croissance, favorise la synthèse de MEC (Prewitz et al. 2015). Cependant, des expériences préliminaires réalisées au laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence une différence nette par rapport à la culture en condition AA2P en termes de production globale de MEC. Par ailleurs, des facteurs de croissance comme le TGF β (important pour la différenciation chondrogénique), le FGF, l'IGF, ou le PDGF AB (Emoto et al. 1998, Shimabukuro et al. 2008) peuvent aussi être ajouté au milieu de culture pour favoriser la synthèse de certains composants de la MEC et favoriser éventuellement la rétention de BMP-2.

Il serait donc intéressant d'étudier ces différentes MECs (provenant de cellules ou de conditions de culture différentes) pour évaluer leurs potentiels de rétention/libération de BMP-2 ainsi que le potentiel de formation osseuse des complexes MECs-BMP-2.

3 Décellularisation de la MEC

Pour être utilisée comme support de BMP-2, la MEC doit être décellularisée. Ce processus est nécessaire pour éliminer les cellules, et surtout tous les composants cellulaires pouvant induire une réaction immunitaire ou une inflammation excessive. En particulier, il est établi que la présence d'ADN peut avoir des effets délétères en promouvant une forte inflammation ce qui peut inhiber la réparation tissulaire. La limite acceptée dans la littérature est de 50 ng d'ADN/mg de dMEC (Crapo et al. 2011). Dans notre système en deux dimensions sur fond de

puits, la dMEC obtenue en présence d'acide ascorbique présente un niveau de contamination en ADN de l'ordre de 100 ng par puits pour une quantité de MEC d'environ 0.5 mg, soit 4 fois plus que la limite recommandée (données non présentées dans ce rapport). Dans le modèle en trois dimensions sur implants PCL, la quantité d'ADN résiduelle n'a pas été mesurée et, bien que la présence de cellules semble limitée comme le montre les images de MEB, il est probable que le taux d'ADN soit aussi supérieur au taux préconisé. Aussi, malgré le fait qu'on ne puisse exclure des différences de contenu en ADN entre les différents types d'implants (AA2P vs OS), une formation osseuse est visible dans les deux cas dès la deuxième semaine, ce qui semble exclure une inflammation trop excessive. De plus, les souris utilisées sont thymo-déficientes et n'ont que très peu de lymphocytes T, limitant la réponse immunitaire adaptative cellulaire et donc l'amplification de la réaction inflammatoire aigüe.

Le processus de décellularisation utilisé (20mM NH₄OH, 0.25 % Triton X-100) est un protocole classiquement utilisé dans la littérature (Bhat et al. 2011, Lin et al. 2012, Decaris et al. 2012a) et est favorablement comparé à des méthodes utilisant d'autres détergents comme le SDS (Xu et al. 2014a) ou des processus physiques (Lyophilisation, données personnelles). Cependant, ce protocole élimine une grande partie des composants de la MEC, en particulier les protéines non-collagéniques et les glycosaminoglycanes. Une partie des protéoglycanes que décorent ces GAGs est liée à la membrane plasmique des cellules (en particulier le glypican et le syndécan), ce qui explique leur élimination lors du processus de décellularisation et la diminution associée du taux de GAGs. Malgré tout, il est probable que le processus de décellularisation puisse être optimisé. Une autre technique plus récente consistant à induire la mort des cellules « naturellement », par apoptose, a été utilisée avec succès. La MEC synthétisée est alors beaucoup mieux préservée (Bourgine et al. 2014). Cependant cette technique nécessite une ingénierie génétique par la sur-expression d'un gène suicide et est donc difficilement adaptable aux cellules primaires.

Nous avons aussi constaté que la décellularisation a peu d'effet sur le contenu en collagène fibrillaire lorsque la culture est réalisée en présence d'acide ascorbique. Par contre, 54% et même 85% du collagène fibrillaire est éliminé lorsque la culture est réalisée en condition ostéogénique et contrôle (sans acide ascorbique) respectivement. Une explication possible serait que plus la synthèse de MEC est importante, plus son compactage est important, rendant son élimination plus difficile. Les images des dMECs sur les implants en PCL obtenues par MEB conforteraient cette idée car on note clairement que les fibres matricielles en condition AA2P sont beaucoup plus denses qu'en condition ostéogénique. Quoi qu'il en soit, le protocole

de décellularisation utilisé a permis d'obtenir des dMEC ayant des caractéristiques différentes ; la dMEC-AA2P comportant 7,3 fois plus de collagène fibrillaire, 2,3 fois plus de protéines totales et 1,3 fois plus de GAG que la dMEC-OS, permettant ainsi de comparer les conditions.

4 Rétention de rhBMP-2 et dose utilisée

La libération des facteurs de croissance au cours de la réparation osseuse suit une séquence bien précise (Dimitriou et al. 2005). La BMP-2, est décrite comme étant une des premières BMPs libérées sur le site de lésion et est impliquée tout au long du processus de réparation. Du reste, un modèle de KO de BMP-2 a montré qu'en son absence, la réparation de fracture ne se fait pas (Tsuji et al. 2006). Les diverses propriétés de la BMP-2 permettent le recrutement des progéniteurs endothéliaux et des CSMs, puis la différenciation des CSMs en ostéoblastes. Elle a aussi été proposée comme régulant l'expression des autres BMPs. Cet état de fait guide aujourd'hui les recherches sur la rétention et la libération contrôlée de la BMP-2 dans l'ingénierie osseuse.

Nous avons montré qu'une MEC non minéralisée puis décellularisée est en mesure de retenir la BMP-2 de façon dose dépendante. La quantité maximum de BMP-2 retenue sur la dMEC-AA2P produite en 2 dimensions (sur fond de puits) dans nos conditions est d'environ 750 ng/cm² pour une concentration initiale de 4 µg/ml. Ce taux de rétention est proche des valeurs obtenues en utilisant des films obtenus par LbL de poly(L -lysine)/hyaluronan mais en utilisant entre 12 à 100 µg/ml de concentration initiale (Crouzier et al. 2011, Almodóvar et al. 2014). Cependant, nos quantifications ont été réalisées par ELISA sur la fraction non retenue, alors que dans les études utilisant la stratégie LbL, la quantification de la BMP-2 retenue a été faite de façon directe, par lecture de BMP-2 marquée à la fluorescence, après un lavage extensif. Nous avons entrepris, à titre comparatif, la quantification directe dans nos MECs de la BMP-2 fluorescente. Les multiples composants de la MEC sont susceptibles de lier la BMP-2 par différents domaines protéiques, certaines configurations ne permettant pas l'activation des récepteurs. Il était donc important de vérifier que la bioactivité de la molécule chargée est préservée. En utilisant deux modèles cellulaires différents permettant d'évaluer la réponse cellulaire à la BMP-2 via la voie canonique (expression de luciférase sur cellules C2C12-BRE/luc) et non-canonique (activité PAL sur les C2C12), notre étude montre que la BMP-2 retenue par la dMEC, après lavage, reste active. De plus, ce complexe MEC-BMP-2 reste également actif après lyophilisation, ce point étant important en vue d'un usage en clinique.

Nous avons ensuite validé l'intérêt de ce produit d'ingénierie osseuse *in vivo* en évaluant la formation osseuse induite dans le modèle d'implantation ectopique chez la souris. Pour cela, la MEC a été synthétisée (puis décellularisée) sur un support en polycaprolactone (PCL) très poreux dans les 3 dimensions. Ce support est radio-transparent, non-résorbable, ni ostéo-conducteur, ni ostéo-inducteur *per se*. Après implantation, une importante formation osseuse est observée à la dose la plus élevée (1,7 µg implanté). Les plus faibles doses choisies (300ng et 600 ng rhBMP-2 implantée) ont induit une formation osseuse minimale selon une cinétique de formation lente, bien que réelle (figure 10). Selon la littérature, dans ce modèle d'implantation en site ectopique, sans ajout de cellules ni de matériaux ostéoconducteurs, le minimum requis pour obtenir une formation osseuse est de l'ordre de 1 µg de rhBMP-2, incorporé dans un hydrogel de gélatine (Yamamoto et al. 2003) ou dans un gel d'alginate hépariné ((Jeon et al. 2008) et tableau en annexe). Bien que la comparaison entre les modèles soit difficile (hydrogel *vs* implant solide recouvert de dMEC), l'adsorption de BMP-2 sur la dMEC permettrait donc de diminuer d'un facteur 2 à 3 la quantité la plus basse de BMP-2 nécessaire à une formation osseuse. Deux raisons peuvent expliquer ce phénomène. Il se peut que les composants de la MEC augmentent l'effet de la BMP-2 sur les cellules ostéoblastiques (par exemple les héparanes sulfates, connus pour potentialiser l'effet de la BMP-2) ou bien que les progéniteurs endothéliaux (Xu et al. 2014b) ou ostéoblastiques, recrutés par le potentiel chimio-attracteur de la BMP-2, trouvent sur la dMEC un environnement propice à leur prolifération et/ou leur différenciation. Cependant, l'avantage de la dMEC pour diminuer les doses de BMP-2 n'est pas ici totalement démontré. En effet, l'implant PCL sans dMEC, qui retient 16.5 % de la BMP-2 (figure 16), soit environ 2 µg, induit lui aussi une formation osseuse minimale. Il se pourrait donc que quelque soit le support, la BMP-2 soit capable d'induire une formation osseuse à des doses comprises entre 300 ng et 2 µg. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour évaluer si, à quantité de BMP-2 égale, l'apport de MEC a réellement un effet potentialisateur sur la formation osseuse induite par la BMP-2. Par exemple, l'analyse des cellules recrutées dans l'implant à des temps précoces apporterait des informations intéressantes.

Enfin, nous avons évalué la formation osseuse en histologie 8 semaines après implantation. Les PITO_s PCL-dMEC-AA2P et PCL-dMEC-OS ne présentent pas de différences majeures, et l'on observe un os mature, généralement accolé aux fibres de PCL, bordé d'ostéoblastes et contenant des ostéocytes enchâssés. Une vascularisation et une hématopoïèse semble aussi présente puisqu'on remarque de nombreux vaisseaux et adipocytes. Il faut cependant noter que

ces résultats sont qualitatifs, et qu'une quantification de la vascularisation et de la présence d'adipocytes serait nécessaire.

5 Libération de la BMP-2

Bien que peu de preuves soit établies, le paradigme actuel veut que la BMP-2 soit idéalement libérée en deux temps : une libération initiale importante ou « Burst release » puis une libération à un niveau moindre sur la durée (Uludag et al. 1999). *In vivo*, dans le modèle ectopique utilisé, nous avons suivi la rétention de la BMP-2 en utilisant une BMP-2 couplée à un fluorochrome émettant dans le proche infra-rouge. De façon étonnante, nous n'avons pas détecté de libération rapide mais une diminution relativement linéaire de la fluorescence des PITO en fonction du temps, avec la moitié de la fluorescence encore présente à J8 pour la condition dMEC-AA2P et à J10 pour la condition dMEC-OS. Dans un modèle de défaut fémoral chez le rat, en utilisant la même technique de fluorescence, la demi-vie de la libération est plutôt de 2 à 3 jours en utilisant comme implant une éponge de collagène ou un gel d'alginate (Boerckel et al. 2011a). La MEC décellularisée semble donc permettre une rétention à plus long terme de la BMP-2 sur le site d'implantation.

6 Comparaison entre dMEC-AA2P et dMEC-OS

Les résultats présentés dans ce rapport font état d'un taux de rétention équivalent de BMP-2 sur les deux matrices dMEC-OS et dMEC-AA2P, d'une bioactivité de BMP-2 *in vitro* similaire, et d'une formation osseuse induite par la BMP-2 *in vivo* proche entre les deux dMEC. Il faut cependant nuancer ce propos car les résultats sont présentés dans un contexte d'"ingénierie tissulaire osseuse", c'est-à-dire pour mimer une procédure clinique. Pour ce faire, le nombre de cellules initialementensemencées et le temps de culture ont été fixés et les conditions expérimentales comparées directement sans normalisation par la quantité de MEC produite. Il en résulte qu'en terme "biologique", la dMEC-OS retient plus de BMP-2 que la dMEC-AA2P puisque la quantité de BMP-2 retenue par puits est identique mais que la quantité de MEC présente est plus faible dans la condition ostéogénique, au moins *in vitro*. Des résultats préliminaires, non présentés dans ce manuscrit, où une dMEC a été produite dans un milieu OS sans β -glycerophosphate (source de Pi, indispensable à la minéralisation *in vitro*) suggèrent que la partie minérale de la dMEC OS n'est pas responsable de la rétention de la BMP-2. En effet, l'activité PAL est similaire entre des C2C12 cultivées sur une dMEC OS+ β -glycerophosphate ou sur une dMEC OS- β -glycerophosphate toutes deux pré-incubées avec la même quantité de

BMP-2. Ceci suggère, qu'intrinsèquement, la partie organique de la dMEC OS est plus affine à la BMP-2 que la dMEC AA2P, et que la présence de cristaux d'HA ne jouerait pas de rôle prépondérant sur la rétention de la BMP-2 par la dMEC OS. Pour confirmer ces résultats, des expériences où la MEC-OS serait déminéralisée après avoir été décellularisée sont envisagées. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la présence (ou l'absence) de β -glycerophosphate (la source de phosphate du milieu ostéogénique) peut aussi avoir un effet sur la composition de la MEC ce qui invaliderait notre hypothèse.

7 Améliorations possibles

Les dMEC utilisées ont été produites par des CSMs poolées issues de 3 patients différents afin de limiter la variabilité individuelle et utilisées à des passages proches (entre P2 et P5). Dans un contexte clinique, les CSMs prélevées peuvent avoir des caractéristiques différentes suivant le patient. En particulier, le taux de prolifération et le potentiel de différenciation ostéoblastique est très variable d'un patient à l'autre. Un des intérêts d'utiliser une thérapie comme la BMP-2 est justement le fait de ne pas implanter de cellules chez le patient. En effet, l'amplification ex-vivo de cellules est longue, coûteuse et peut engendrer des modifications génétiques de ces cellules, ajoutant un risque pour le patient. Dans un souci d'industrialisation et pour limiter ces inconvénients, l'emploi de CSMs allogéniques pourrait être envisagé. En effet des banques de CSMs commencent à être entreprises et leur utilisation permettrait d'avoir des lots de dMEC parfaitement caractérisées. D'autres types cellulaires pourraient être envisagés comme les CSMs issus de cellules pluripotente induites (IPS) qui ont l'avantage d'être amplifiable à volonté et de ne pas poser de problèmes éthiques contrairement aux cellules dérivées de cellules souches embryonnaires (ESC).

8 Conclusion

Nous avons montré que la MEC décellularisée est un vecteur intéressant pour la délivrance de BMP-2 et pourrait permettre de diminuer les doses utilisées (et donc les effets secondaires) en clinique pour traiter les pertes de substances osseuses. Aujourd'hui la plupart des recherches se focalise sur la libération d'un facteur de croissance unique qui est souvent la BMP-2 (et plus rarement la BMP7) en raison de son rôle clé très en amont dans le processus de réparation osseuse. Trois stratégies de libération de BMP-2 par des matériaux sont généralement envisagées : (i) les hydrogels, comme l'éponge de collagène, ont l'avantage de retenir initialement la totalité de la BMP-2 mise en présence et de la libérer par diffusion et

dégradation de l'hydrogel ; son inconvénient principal étant la libération rapide de la BMP-2, (ii) l'immobilisation de la BMP-2 sur le matériau qui permet une présence sur un plus long terme mais ne permet pas à la BMP-2 de diffuser librement est aussi utilisé, (iii) enfin, plus récemment, l'encapsulation de la BMP-2 permettrait une diffusion sur plus long terme, tout en permettant la diffusion (Begam et al. 2017). L'utilisation de la MEC décellularisée permet l'immobilisation de la BMP-2, et pourrait être utilisée pour recouvrir un matériau, si tant est que celui-ci supporte l'adhésion et la croissance cellulaire nécessaire à la synthèse de la MEC. De surcroît, cette dernière apporte une composante éventuellement activatrice des cellules progénitrices de l'hôte recrutées sur l'implant. Finalement, l'intérêt de l'utilisation d'une MEC est aussi, théoriquement, de pouvoir lier différents facteurs de croissance selon son affinité propre à telle ou telle molécule (i.e. protéine ou GAG) de la MEC. Aussi, cette stratégie pourrait, *in fine*, permettre la conception de système de libération complexe, multi-facteurs, permettant la libération des facteurs de croissance dans l'ordre naturel du besoin.

Bibliographie

- Ainola, M. M., J. A. Mandelin, M. P. Liljeström, T. F. Li, M. V. J. Hukkanen, and Y. T. Konttinen. 2005. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. *Clinical and experimental rheumatology* 23:644–650.
- Almodóvar, J., R. Guillot, C. Monge, J. Vollaire, S. Selimović, J.-L. Coll, A. Khademhosseini, and C. Picart. 2014. Spatial patterning of BMP-2 and BMP-7 on biopolymeric films and the guidance of muscle cell fate. *Biomaterials* 35:3975–3985.
- Bae, H. W., L. Zhao, L. E. A. Kanim, P. Wong, R. B. Delamarter, and E. G. Dawson. 2006. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)* 31:1299–306; discussion 1307–8.
- Bányai, L., P. Sonderegger, and L. Patthy. 2010. Agrin binds BMP-2, BMP4 and TGFbeta1. *PLoS One* 5:e10758.
- Begam, H., S. K. Nandi, B. Kundu, and A. Chanda. 2017. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Materials Science and Engineering: C* 70:856–869.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, and P. Anversa. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763–776.
- Bhat, A., S. A. Boyadjiev, C. W. Senders, and J. K. Leach. 2011. Differential growth factor adsorption to calvarial osteoblast-secreted extracellular matrices instructs osteoblastic behavior. *PLoS One* 6:e25990.
- Boccafoschi, F., L. Fusaro, C. Mosca, M. Bosetti, P. Chevallier, D. Mantovani, and M. Cannas. 2012. The biological response of poly(L-lactide) films modified by different biomolecules: role of the coating strategy. *J Biomed Mater Res A* 100:2373–2381.
- Boerckel, J. D., Y. M. Kolambkar, K. M. Dupont, B. A. Uhrig, E. A. Phelps, H. Y. Stevens, A. J. García, and R. E. Guldberg. 2011a. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32:5241–5251.
- Boerckel, J. D., Y. M. Kolambkar, K. M. Dupont, B. A. Uhrig, E. A. Phelps, H. Y. Stevens, A. J. Garcia, and R. E. Guldberg. 2011b. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32:5241–5251.
- Bouletreau, P. J., S. M. Warren, J. A. Spector, D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, and M. T. Longaker. 2002. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110:139–148.
- Bourgine, P. E., C. Scotti, S. Pigeot, L. A. Tchang, A. Todorov, and I. Martin. 2014. Osteoinductivity of engineered cartilaginous templates devitalized by inducible apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Bouyer, M., R. Guillot, J. Lavaud, C. Plettinx, C. Olivier, V. Curry, J. Boutonnat, J.-L. Coll, F. Peyrin, J. Jossier, G. Bettega, and C. Picart. 2016. Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials* 104:168–181.
- Bozo, I. Y., R. V. Deev, A. Y. Drobyshev, A. A. Isaev, and I. I. Eremin. 2016. World's First Clinical Case of Gene-Activated Bone Substitute Application. *Case Reports in Dentistry* 2016:1–6.

- Bramono, D. S., S. Murali, B. Rai, L. Ling, W. T. Poh, Z. X. Lim, G. S. Stein, V. Nurcombe, A. J. van Wijnen, and S. M. Cool. 2012. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Bone* 50:954–964.
- Brochmann, E. J., K. Behnam, and S. S. Murray. 2009. Bone morphogenetic protein-2 activity is regulated by secreted phosphoprotein-24 kd, an extracellular pseudoreceptor, the gene for which maps to a region of the human genome important for bone quality. *Metabolism* 58:644–650.
- Cancela, M. L., V. Laizá, and N. Conceição. 2014. Matrix Gla protein and osteocalcin: from gene duplication to neofunctionalization. *Arch Biochem Biophys* 561:56–63.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9:641–650.
- Carreira, A. C., G. G. Alves, W. F. Zambuzzi, M. C. Sogayar, and J. M. Granjeiro. 2014. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* 561:64–73.
- Chen, X.-D., V. Dusevich, J. Q. Feng, S. C. Manolagas, and R. L. Jilka. 2007. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res* 22:1943–1956.
- Choi, J. S., H.-J. Yang, B. S. Kim, J. D. Kim, J. Y. Kim, B. Yoo, K. Park, H. Y. Lee, and Y. W. Cho. 2009. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. *J Control Release* 139:2–7.
- Clerck, Y. A. de, and P. A. Jones. 1980. The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cells. *Biochem J* 186:217–225.
- Clough, B. H., M. R. McCarley, U. Krause, S. Zeitouni, J. J. Froese, E. P. McNeill, C. D. Chaput, H. W. Sampson, and C. A. Gregory. 2014. Bone Regeneration with Osteogenically Enhanced Mesenchymal Stem Cells and Their Extracellular Matrix Proteins. *J Bone Miner Res*.
- Cranford, S. W., J. de Boer, C. van Blitterswijk, and M. J. Buehler. 2013. Materiomics: an -omics approach to biomaterials research. *Adv Mater* 25:802–824.
- Crapo, P. M., T. W. Gilbert, and S. F. Badylak. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32:3233–3243.
- Crouzier, T., L. Fourel, T. Boudou, C. Albigès-Rizo, and C. Picart. 2011. Presentation of BMP-2 from a soft biopolymeric film unveils its activity on cell adhesion and migration. *Adv Mater* 23:H111–H118.
- Crouzier, T., K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, and C. Picart. 2009. Layer-by-layer films as a biomimetic reservoir for rhBMP-2 delivery: controlled differentiation of myoblasts to osteoblasts. *Small* 5:598–608.
- Datta, N., H. L. Holtorf, V. I. Sikavitsas, J. A. Jansen, and A. G. Mikos. 2005. Effect of bone extracellular matrix synthesized *in vitro* on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials* 26:971–977.
- Ben-David, D., S. Srouji, K. Shapira-Schweitzer, O. Kossover, E. Ivanir, G. Kuhn, R. Müller, D. Seliktar, and E. Livne. 2013. Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix. *Biomaterials* 34:2902–2910.
- Decaris, M. L., B. Y. Binder, M. A. Soicher, A. Bhat, and J. K. Leach. 2012a. Cell-derived matrix coatings for polymeric scaffolds. *Tissue Eng Part A* 18:2148–2157.
- Decaris, M. L., A. Mojadedi, A. Bhat, and J. K. Leach. 2012b. Transferable cell-secreted extracellular matrices enhance osteogenic differentiation. *Acta Biomater* 8:744–752.
- Decarlo, A. A., M. Belousova, A. L. Ellis, D. Petersen, H. Grenett, P. Hardigan, R. O’Grady, M. Lord, and J. M. Whitelock. 2012. Perlecan domain 1 recombinant proteoglycan augments BMP-2 activity and osteogenesis. *BMC Biotechnol* 12:60.

- Deev, R., A. Drobyshev, I. Bozo, and A. Isaev. 2015. Ordinary and Activated Bone Grafts: Applied Classification and the Main Features. *Biomed Res Int* 2015:365050.
- Delaisse, J.-M. 2014. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep* 3:561.
- Dimitriou, R., G. I. Mataliotakis, A. G. Angoules, N. K. Kanakaris, and P. V. Giannoudis. 2011. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 42 Suppl 2:3–15.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis, and P. V. Giannoudis. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392–1404.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- Emoto, N., H. Onose, H. Yamada, S. Minami, T. Tsushima, and I. Wakabayashi. 1998. Growth factors increase pericellular proteoglycans independently of their mitogenic effects on A10 rat vascular smooth muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 30:47–54.
- Epstein, N. E. 2013. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. *Surg Neurol Int* 4:S343–S352.
- Everts, V., J. Delaissé, W. Korper, D. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, and W. Beertsen. 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17:77–90.
- Ferrier, J., S. Xia, E. Lagan, J. Aubin, and J. Heersche. 1994. Displacement and translocation of osteoblast-like cells by osteoclasts. *J Bone Miner Res* 9:1397–1405.
- Fiedler, J., G. Röderer, K.-P. Günther, and R. E. Brenner. 2002. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:305–312.
- Finkenzeller, G., S. Hager, and G. B. Stark. 2012. Effects of bone morphogenetic protein 2 on human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 84:81–85.
- Friedenstein, A. 1980. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Haematol Blood Transfus* 25:19–29.
- Friedenstein, A., R. Chailakhyan, and U. Gerasimov. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20:263–272.
- Friedenstein, A., U. Deriglasova, N. Kulagina, A. Panasuk, S. Rudakowa, E. Lurić, and I. Ruadkow. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 2:83–92.
- Friess, W., H. Uludag, S. Foskett, and R. Biron. 1999a. Bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) using absorbable collagen sponges (ACS): influence of processing on ACS characteristics and formulation. *Pharm Dev Technol* 4:387–396.
- Friess, W., H. Uludag, S. Foskett, R. Biron, and C. Sargeant. 1999b. Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers. *Int J Pharm* 185:51–60.
- Gibbs, D. M. R., C. R. M. Black, G. Hulsart-Billstrom, P. Shi, E. Scarpa, R. O. C. Oreffo, and J. Dawson. 2016. Bone induction at physiological doses of BMP through localization by clay nanoparticle gels. *Biomaterials* 99:16–23.
- Ginebra, M., T. Traykova, and J. Planell. 2006. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release* 113:102–110.
- Glimcher, M. J. 1987. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instructional course lectures* 36:49–69.

- Granero-Molta, F., J. A. Weis, M. I. Miga, B. Landis, T. J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E. D. Jansen, D. P. Mortlock, and A. Spagnoli. 2009. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 27:1887–1898.
- Groen, N., M. Guvendiren, H. Rabitz, W. J. Welsh, J. Kohn, and J. de Boer. 2016. Stepping into the omics era: Opportunities and challenges for biomaterials science and engineering. *Acta Biomater* 34:133–142.
- Gronthos, S., D. Franklin, H. Leddy, P. Robey, R. Storms, and J. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54–63.
- Gruber, H. E., F. K. Gettys, H. E. Montijo, J. S. Starman, E. Bayoumi, K. J. Nelson, G. L. Hoelscher, W. K. Ramp, N. Zinchenko, J. A. Ingram, M. J. Bosse, and J. F. Kellam. 2013. Genomewide molecular and biologic characterization of biomembrane formation adjacent to a methacrylate spacer in the rat femoral segmental defect model. *Journal of orthopaedic trauma* 27:290–297.
- Gruber, H. E., G. Ode, G. Hoelscher, J. Ingram, S. Bethea, and M. J. Bosse. 2016. Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. *Bone and Joint Research* 5:106–115.
- Guillemin, G., A. Meunier, P. Dallant, P. Christel, J. Pouliquen, and L. Sedel. 1989. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res* 23:765–779.
- Guo, Y., Q. Zeng, Y. Yan, L. Shen, L. Liu, R. Li, X. Zhang, J. Wu, J. Guan, and S. Huang. 2013. Proliferative effect and osteoinductive potential of extracellular matrix coated on cell culture plates. *Springerplus* 2:303.
- Hang, Q., Y. Zhou, S. Hou, D. Zhang, X. Yang, J. Chen, Z. Ben, C. Cheng, and A. Shen. 2013. Asparagine-linked glycosylation of bone morphogenetic protein-2 is required for secretion and osteoblast differentiation. *Glycobiology* 24:292–304.
- Harada, S., and G. A. Rodan. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349–355.
- Harvey, A., T.-Y. Yen, I. Aizman, C. Tate, and C. Case. 2013. Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism. *PLoS One* 8:e79283.
- Heymann, D., G. Pradal, and M. Benahmed. 1999. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol Histopathol* 14:871–877.
- Hiepen, C., D. Yadin, P. Rikeit, G. Dörpholz, and P. Knaus. 2016. Actions from head to toe: An update on Bone/Body Morphogenetic Proteins in health and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 27:1–11.
- Hinoi, E., H. Ochi, T. Takarada, E. Nakatani, T. Iezaki, H. Nakajima, H. Fujita, Y. Takahata, S. Hidano, T. Kobayashi, S. Takeda, and Y. Yoneda. 2012. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia. *J Bone Miner Res* 27:938–949.
- Hintze, V., S. A. Samsonov, M. Anselmi, S. Moeller, J. Becher, M. Schnabelrauch, D. Scharnweber, and M. T. Pisabarro. 2014. Sulfated glycosaminoglycans exploit the conformational plasticity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and alter the interaction profile with its receptor. *Biomacromolecules* 15:3083–3092.
- Hollinger, J., and M. E. Wong. 1996. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:594–606.
- Holzappel, B. M., J. C. Reichert, J.-T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, and D. W. Hutmacher. 2013. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev* 65:581–603.

- Jeon, O., S. J. Song, H. S. Yang, S.-H. Bhang, S.-W. Kang, M. A. Sung, J. H. Lee, and B.-S. Kim. 2008. Long-term delivery enhances *in vivo* osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 369:774–780.
- Kang, Y., S. Kim, A. Khademhosseini, and Y. Yang. 2011. Creation of bony microenvironment with CaP and cell-derived ECM to enhance human bone-marrow MSC behavior and delivery of BMP-2. *Biomaterials* 32:6119–6130.
- Karger, C., T. Kishi, L. Schneider, F. Fitoussi, A.-C. Masquelet, French Society of Orthopaedic Surgery, and T. (SoFCOT). 2012. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res* 98:97–102.
- Katagiri, T., M. Imada, T. Yanai, T. Suda, N. Takahashi, and R. Kamijo. 2002. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7:949–960.
- Katagiri, W., M. Osugi, T. Kawai, and M. Ueda. 2013. Novel cell-free regeneration of bone using stem cell-derived growth factors. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28:1009–1016.
- Keller, T. S., Z. Mao, and D. M. Spengler. 1990. Youngtextquotesingles modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone. *Journal of Orthopaedic Research* 8:592–603.
- Kimura, Y., N. Miyazaki, N. Hayashi, S. Otsuru, K. Tamai, Y. Kaneda, and Y. Tabata. 2010. Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein-2 Enhances Recruitment of Osteogenic Progenitor Cells for De Novo Generation of Bone Tissue. *Tissue Engineering Part A* 16:1263–1270.
- Kisiel, M., A. S. Klar, M. Ventura, J. Buijs, M.-K. Mafina, S. M. Cool, and J. Hilborn. 2013. Complexation and sequestration of BMP-2 from an ECM mimetic hyaluronan gel for improved bone formation. *PLoS One* 8:e78551.
- Kiviranta, I., J. Jurvelin, M. Tammi, A. M. Säämänen, and H. J. Helminen. 1985. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82:249–255.
- Kon, E., A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research* 49:328–337.
- Kraitzer, A. (n.d.). Calcium sulfate bone void filler: Past and Future clinical use.
- Kwon, S.-H., Y.-K. Jun, S.-H. Hong, and H.-E. Kim. 2003. Synthesis and dissolution behavior of -TCP and HA/-TCP composite powders. *Journal of the European Ceramic Society* 23:1039–1045.
- Lai, Y., Y. Sun, C. M. Skinner, E. L. Son, Z. Lu, R. S. Tuan, R. L. Jilka, J. Ling, and X.-D. Chen. 2010. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix *ex vivo*: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19:1095–1107.
- Lee, K. 2014. A Pilot Study to Compare the Activity of Different Bone Morphogenetic Protein Bioimplants *In vivo*.
- Lee, K.-S., S.-H. Hong, and S.-C. Bae. 2002. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21:7156–7163.
- Lin, H., G. Yang, J. Tan, and R. S. Tuan. 2012. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials* 33:4480–4489.

- Logeart-Avramoglou, D., M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, and H. Petite. 2006. An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* 349:78–86.
- López-De León, A., and M. Rojkind. 1985. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 33:737–743.
- Lu, H., T. Hoshiba, N. Kawazoe, I. Koda, M. Song, and G. Chen. 2011. Cultured cell-derived extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 32:9658–9666.
- Luu, H. H., W.-X. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo, Z.-L. Deng, K. A. Sharff, A. G. Montag, R. C. Haydon, and T.-C. He. 2007. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25:665–677.
- Makhdom, A. M., L. Nayef, M. Tabrizian, and R. C. Hamdy. 2015. The potential roles of nanobiomaterials in distraction osteogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11:1–18.
- Martino, M. M., P. S. Briquez, E. Güç, F. Tortelli, W. W. Kilarski, S. Metzger, J. J. Rice, G. A. Kuhn, R. Müller, M. A. Swartz, and J. A. Hubbell. 2014. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science* 343:885–888.
- Marycz, K., M. Markedziak, J. Grzesiak, A. Lis, and A. Smieszek. 2016. Biphasic Polyurethane/Poly lactide Sponges Doped with Nano-Hydroxyapatite (nHAp) Combined with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Stem Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers* 8:339.
- Mathews, S., R. Bhone, P. K. Gupta, and S. Totey. 2011. A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 414:270–276.
- Mavis, B., T. T. Demirtaş, M. Gökçe, G. Önderoğlu, G. Gökçe, and U. Colak. 2009. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomater* 5:3098–3111.
- McKay, J. WF Peckham SM Marotta. 2006. Overview of rhBMP-2. In: *The science of rhBMP-2*.
- Miguez, P. A., M. Terajima, H. Nagaoka, J. A. R. Ferreira, K. Braswell, C. C. Ko, and M. Yamauchi. 2014. Recombinant biglycan promotes bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Dent Res* 93:406–411.
- Miguez, P. A., M. Terajima, H. Nagaoka, Y. Mochida, and M. Yamauchi. 2011. Role of glycosaminoglycans of biglycan in BMP-2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 405:262–266.
- Morin, R., D. Kaplan, and B. Perez-Ramirez. 2006. Bone morphogenetic protein-2 binds as multilayers to a collagen delivery matrix: an equilibrium thermodynamic analysis. *Biomacromolecules* 7:131–138.
- Mulloy, B., and C. C. Rider. 2015. The Bone Morphogenetic Proteins and Their Antagonists. *Vitam Horm* 99:63–90.
- Mwale, F., E. Tchetina, C. W. Wu, and A. R. Poole. 2002. The Assembly and Remodeling of the Extracellular Matrix in the Growth Plate in Relationship to Mineral Deposition and Cellular Hypertrophy: An In Situ Study of Collagens II and IX and Proteoglycan. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:275–283.
- Nakamura, Y., K. Tensho, H. Nakaya, M. Nawata, T. Okabe, and S. Wakitani. 2005. Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice. *Bone* 36:399–407.

- Neugebauer, J. M., S. Kwon, H.-S. Kim, N. Donley, A. Tilak, S. Sopory, and J. L. Christian. 2015. The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2307–E2316.
- Nohe, A., S. Hassel, M. Ehrlich, F. Neubauer, W. Sebald, Y. I. Henis, and P. Knaus. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277:5330–5338.
- Ozaki, Y., M. Nishimura, K. Sekiya, F. Suehiro, M. Kanawa, H. Nikawa, T. Hamada, and Y. Kato. 2007. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16:119–129.
- Paquet, J., M. Deschepper, A. Moya, D. Logeart-Avramoglou, C. Boisson-Vidal, and H. Petite. 2015. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med* 4:809–821.
- Parfitt, A. M. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry* 55:273–286.
- Patel, V. N., S. M. Knox, K. M. Likar, C. A. Lathrop, R. Hossain, S. Eftekhari, J. M. Whitelock, M. Elkin, I. Vlodysky, and M. P. Hoffman. 2007. Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during *ex vivo* submandibular gland branching morphogenesis. *Development* 134:4177–4186.
- Pati, F., T.-H. Song, G. Rijal, J. Jang, S. W. Kim, and D.-W. Cho. 2014. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 37C:230–241.
- Pelissier, P., A. Masquelet, R. Bareille, S. M. Pelissier, and J. Amedee. 2004. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 22:73–79.
- Peltier, L. 1961. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Clin Orthop* 21:1–31.
- Petite, H., V. Viateau, W. Bensaïd, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, and G. Guillemin. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18:959–963.
- Pivonka, P., and C. R. Dunstan. 2012. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. *Bonekey Rep* 1:221.
- Prewitz, M. C., A. Stißel, J. Friedrichs, N. Träber, S. Vogler, M. Bornhäuser, and C. Werner. 2015. Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma enhanced by macromolecular crowding. *Biomaterials* 73:60–69.
- Prideaux, M., D. M. Findlay, and G. J. Atkins. 2016. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol* 28:24–30.
- Rahman, M. S., N. Akhtar, H. M. Jamil, R. S. Banik, and S. M. Asaduzzaman. 2015. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res* 3:15005.
- Raida, M., A. Heymann, C. GÃnsfrac14nther, and D. Niederwieser. 2006. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 18:735–739.
- Rao Pattabhi, S., J. S. Martinez, and T. C. S. 3rd Keller. 2015. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation*.
- Ratanavaraporn, J., and Y. Tabata. 2012. Enhanced osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 by 2-O-desulfated heparin. *Acta biomaterialia* 8:173–182.
- Riddle, R. C., and T. L. Clemens. 2017. Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiological Reviews* 97:667–698.

- Rider, C. C., and B. Mulloy. 2010. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochemical Journal* 429:1–12.
- Rodríguez-Carballo, E., B. Gámez, and F. Ventura. 2016. p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Front Cell Dev Biol* 4:40.
- Rucci, N., and A. Teti. 2016. The “love-hate” relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biol* 52-54:176–190.
- Saeed, H., M. Ahsan, Z. Saleem, M. Iqtedar, M. Islam, Z. Danish, and A. M. Khan. 2016. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics-an update. *J Biomed Sci* 23:41.
- Sampath, T., N. Muthukumar, and A. Reddi. 1987. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7109–7113.
- Sanchez-Duffhues, G., C. Hiepen, P. Knaus, and P. Ten Dijke. 2015. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone* 80:43–59.
- Schafer, I. A., J. C. Sullivan, J. Svejcar, J. Kofoed, and W. van B. Robertson. 1966. Vitamin C-induced increase of dermatan sulfate in cultured Hurler’s fibroblasts. *Science* 153:1008–1010.
- Schliephake, H., J. W. Knebel, M. Aufderheide, and M. Tauscher. 2001. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 30:531–537.
- Schopper, C., F. Ziya-Ghazvini, W. Goriwoda, D. Moser, F. Wanschitz, E. Spassova, G. Lagogiannis, A. Auterith, and R. Ewers. 2005. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation—a long-term histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74:458–467.
- Schultheiss, J., C. Seebach, D. Henrich, K. Wilhelm, J. Barker, and J. Frank. 2011. Mesenchymal stem cell (MSC) and endothelial progenitor cell (EPC) growth and adhesion in six different bone graft substitutes. *Eur J Trauma Emerg Surg* 37:635–644.
- Shields, L. B. E., G. H. Raque, S. D. Glassman, M. Campbell, T. Vitaz, J. Harpring, and C. B. Shields. 2006. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 31:542–547.
- Shimabukuro, Y., T. Ichikawa, Y. Terashima, T. Iwayama, H. Oohara, T. Kajikawa, R. Kobayashi, H. Terashima, M. Takedachi, M. Terakura, T. Hashikawa, S. Yamada, and S. Murakami. 2008. Basic fibroblast growth factor regulates expression of heparan sulfate in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 27:232–241.
- Sieron, A. L., N. Louneva, and A. Fertala. 2002. Site-specific interaction of bone morphogenetic protein 2 with procollagen II. *Cytokine* 18:214–221.
- Silber, J. S., D. G. Anderson, S. D. Daffner, B. T. Brislin, J. M. Leland, A. S. Hilibrand, A. R. Vaccaro, and T. J. Albert. 2003. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 28:134–139.
- Sims, N. A., and T. J. Martin. 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3:481.
- Sogo, Y., A. Ito, T. Matsuno, A. Oyane, G. Tamazawa, T. Satoh, A. Yamazaki, E. Uchimura, and T. Ohno. 2007. Fibronectin-calcium phosphate composite layer on hydroxyapatite to enhance adhesion, cell spread and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biomed Mater* 2:116–123.

- Staines, K. A., V. E. MacRae, and C. Farquharson. 2012. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol* 214:241–255.
- Tenenbaum, H. C. 1987. Levamisole and inorganic pyrophosphate inhibit beta-glycerophosphate induced mineralization of bone formed *in vitro*. *Bone and mineral* 3:13–26.
- Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, K. Cox, S. Kakar, L. Gerstenfeld, T. Einhorn, C. J. Tabin, and V. Rosen. 2006. BMP-2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38:1424–1429.
- Uludag, H., D. D’Augusta, J. Golden, J. Li, G. Timony, R. Riedel, and J. Wozney. 2000. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 50:227–238.
- Uludag, H., D. D’Augusta, R. Palmer, G. Timony, and J. Wozney. 1999. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46:193–202.
- Urist, M. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893–899.
- Urist, M., Y. Huo, A. Brownell, W. Hohl, J. Buyske, A. Lietze, P. Tempst, M. Hunkapiller, and R. DeLange. 1984. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:371–375.
- Urist, M., and B. Strates. 1971. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50:1392–1406.
- Wang, E., V. Rosen, P. Cordes, R. Hewick, M. Kriz, D. Luxenberg, B. Sibley, and J. Wozney. 1988. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9484–9488.
- Wang, J., J. Guo, J. Liu, L. Wei, and G. Wu. 2014a. BMP-functionalised coatings to promote osteogenesis for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci* 15:10150–10168.
- Wang, R. N., J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J. Ye, Z. Yan, S. Denduluri, O. Idowu, M. Li, C. Shen, A. Hu, R. C. Haydon, R. Kang, J. Mok, M. J. Lee, H. L. Luu, and L. L. Shi. 2014b. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 1:87–105.
- Wen, Y., S. Xun, M. Haoye, S. Baichuan, C. Peng, L. Xuejian, Z. Kaihong, Y. Xuan, P. Jiang, and L. Shibi. 2017. 3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: a review. *Biomater. Sci.* 5:1690–1698.
- Whang, K., D. Tsai, E. Nam, M. Aitken, S. Sprague, P. Patel, and K. Healy. 1998. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 42:491–499.
- Whitelock, J. M., and R. V. Iozzo. 2005. Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem Rev* 105:2745–2764.
- Williams, B., J. Read, and J. Price. 1991. The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell. *Neuron* 7:685–693.
- Wozney, J., V. Rosen, A. Celeste, L. Mitscock, M. Whitters, R. Kriz, R. Hewick, and E. Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534.
- Xu, H., B. Xu, Q. Yang, X. Li, X. Ma, Q. Xia, Y. Zhang, C. Zhang, Y. Wu, and Y. Zhang. 2014a. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLoS One* 9:e86723.
- Xu, Y., M. Yan, Y. Gong, L. Chen, F. Zhao, and Z. Zhang. 2014b. Response of endothelial cells to decellularized extracellular matrix deposited by bone marrow mesenchymal stem cells. *International journal of clinical and experimental medicine* 7:4997–5003.

- Yadin, D., P. Knaus, and T. D. Mueller. 2016. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 27:13–34.
- Yamamoto, M., Y. Takahashi, and Y. Tabata. 2003. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 24:4375–4383.
- Yoshida, T., H. Miyaji, K. Otani, K. Inoue, K. Nakane, H. Nishimura, A. Ibara, A. Shimada, K. Ogawa, E. Nishida, T. Sugaya, L. Sun, B. Fugetsu, and M. Kawanami. 2014. Bone augmentation using a highly porous PLGA/-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *Journal of Periodontal Research* 50:265–273.
- Zara, J. N., R. K. Siu, X. Zhang, J. Shen, R. Ngo, M. Lee, W. Li, M. Chiang, J. Chung, J. Kwak, B. M. Wu, K. Ting, and C. Soo. 2011. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation *in vivo*. *Tissue Eng Part A* 17:1389–1399.
- Zhao, B., T. Katagiri, H. Toyoda, T. Takada, T. Yanai, T. Fukuda, U. Chung, T. Koike, K. Takaoka, and R. Kamijo. 2006. Heparin potentiates the *in vivo* ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 281:23246–23253.
- Zhou, X., Y. Cui, X. Zhou, and J. Han. 2012. Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models. *International Journal of Biological Sciences* 8:778–790.

Annexes

BMP-2 dose	Concentration $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ implant	CARRIER	Auteur	Référence
3 μg		Eponge collagène	de Choi H	(Choi et al. 2009)
1 μg 0.5 μg, pas d'os	12	Gélatine	Yamamoto M ¹	(Yamamoto et al. 2003)
1 μg	36	Alginate héparinée	Jeon O	(Jeon et al. 2008)
10 μg	50	Fibrine conjuguée à l'héparine	Lee JS	(Lee 2014)
3 μg	83	Gélatine héparinée	Ratanavaraporn J	(Ratanavaraporn and Tabata 2012)
5 μg	179	Eponge collagène	de Nakamura Y	(Nakamura et al. 2005)
5 μg	179	Eponge collagène héparinée	de Zhao B	(Zhao et al. 2006)
3μg	10	Hydrogel gélatine	de Kimura y	(Kimura et al. 2010)

Etude bibliographique des doses de BMP-2 implantée avec différents véhicules sans composante ostéo-conductrice dans le modèle ectopique chez la souris. Adapté de (Gibbs et al. 2016), et (Ben-David et al. 2013).