



HAL
open science

Stratégies cellulaires et environnementales pour le développement d'un substitut osseux prévascularisé

Anne-Sophie Willemin

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Willemin. Stratégies cellulaires et environnementales pour le développement d'un substitut osseux prévascularisé. Ingénierie biomédicale. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0191 . tel-02006517

HAL Id: tel-02006517

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02006517v1>

Submitted on 12 Oct 2023

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Anne-Sophie WILLEMIN**

**Stratégies cellulaires et environnementales pour le développement
d'un substitut osseux prévascularisé**

Soutenue le 21 septembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Laurent OBERT, MD, PhD, (PU-PH, EA 4268 INSERM, Besançon)

M. Stéphane DURUAL, PhD (Privat Docent, Division Biomatériaux, CUMD-UNIGE, Genève)

Examineurs :

Mme Delphine LOGEART-AVRAMOGLOU, PhD (CR CNRS, UMR CNRS 7052, B2OA, Paris)

Mr Laurent GALOIS, MD, PhD (PU-PH, UMR CNRS-UL 7365, Nancy)

M. Pierre GILLET, MD, PhD (PU-PH, UMR CNRS-UL 7365, directeur de thèse)

Mme Vanessa MOBY, DD, PhD (MCU-PH, UMR CNRS-UL 7365, co-directrice de thèse)

Membre invitée :

Mme Marthe ROUSSEAU, PhD (CR CNRS, UMR INSERM 1059, SAINBIOSE, St Etienne)

Biopôle de l'Université de Lorraine – Campus biologie-santé
9, Avenue de la Forêt de Haye BP 20199
54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex

Publications et communications issues de la thèse

Publications :

A-S. Willemin, G. Zhang, E. Velot, A. Bianchi, V. Decot, M. Rousseau, P. Gillet, V. Moby

The effect of nacre extract on cord blood-derived endothelial progenitor cells: a natural stimulus to promote angiogenesis?

Soumis à Angiogenesis

G. Dostert*, A-S. Willemin*, V. Jouan-Hureau, H. Louis, S. Hupont, P. Gillet, P. Menu, V. Decot, E. Velot, V. Moby

Evaluation of the pro-angiogenic effect of nanoscale extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells

Biomed Mater Eng. 2017;28(s1):S75-S79. doi: 10.3233/BME-171626.

G. Zhang, A. Brion, A-S. Willemin, M-H. Piet, V. Moby, A. Bianchi, D. Mainard, L. Galois, P. Gillet, M. Rousseau

Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution

J Biomed Mater Res A. 2017 Feb;105(2):662-671. doi: 10.1002/jbm.a.35939. Review

G. Zhang, A-S. Willemin, A. Brion, M-H. Piet, V. Moby, A. Bianchi, D. Mainard, L. Galois, P. Gillet, M. Rousseau

A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre Ethanol Soluble Matrix

J Struct Biol. 2016 Nov;196(2):127-137. doi: 10.1016/j.jsb.2016.03.016.

Communications orales :

A-S. Willemin, G. Zhang, A. Bianchi, M. Rousseau, S. Fleutot, F. Cleymand, E. Velot, P. Gillet, V. Moby

Nacre active compounds and chitosan scaffold for the development of an innovative bone substitute

Congrès de la Société Française des Biomatériaux Dentaires, 6-7 Juillet 2017, Paris (France)

A-S. Willemin, G. Zhang, A. Bianchi, M. Rousseau, E. Velot, P. Gillet, V. Moby

Étude des potentialités ostéogéniques des principes actifs issus de la nacre en ingénierie osseuse

Journée de la FR CNRS-UL 3209 BMCT, 15 Décembre 2016, Nancy (France)

A-S. Willemin, A. Brion, E. Velot, V. Decot, P. Gillet, V. Moby, M. Rousseau

Effets des principes actifs issus de la nacre sur la différenciation angiogénique des cellules progénitrices endothéliales et sur la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses

Journée de la FR CNRS-UL 3209 BMCT, 11 Septembre 2014, Nancy (France) **Prix de la meilleure communication orale**

Communications affichées :

A-S. Willemin, G. Zhang, A. Bianchi, M. Rousseau, S. Fleutot, F. Cleymand, E. Velot, P. Gillet, V. Moby

Nacre active compounds and chitosan scaffold for the development of an innovative bone substitute

Congrès de la Société Française des Biomatériaux Dentaire, 6-7 Juillet 2017, Paris (France)

A-S. Willemin, S. Fleutot, E. Velot, E. Arab-Tehrany, O. Ferry, P. Gillet, F. Cleymand, M. Rousseau, V. Moby

Nacre active compounds, stem cells and chitosan/hydroxyapatite hydrogel: a synergic combination for bone tissue engineering

XIIIth International Symposium on Biomineralization, 16-19 Septembre 2015, Grenade (Espagne)

A-S. Willemin, S. Fleutot, D. Boudemagh, E. Velot, V. Decot, P. Gillet, E. Arab-Tehrany, F. Cleymand, M. Rousseau, V. Moby

Development of a new functional bone substitute: nacre active compounds in combination with chitosan/hydroxyapatite nanoparticules scaffold and stem cells

European Materials Research Society 2015 Spring Meeting, 11-15 Mai 2015, Lille (France)

A-S. Willemin, S. Fleutot, D. Boudemagh, E. Velot, V. Decot, P. Gillet, E. Arab-Tehrany, F. Cleymand, M. Rousseau, V. Moby

A new alternative in bone regeneration: combination of chitosan/hydroxyapatite scaffold, nacre active compounds and stem cells

XVII^{ème} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, 04-06 Février 2015, Super-Besse (France) **Prix du meilleur flash poster**

A-S. Willemin, S. Fleutot, D. Boudemagh, E. Velot, V. Decot, P. Gillet, E. Arab-Tehrany, F. Cleymand, M. Rousseau, V. Moby

Development of a new functional bone substitute: nacre active compounds in combination with chitosan/hydroxyapatite nanoparticules scaffold and stem cells

SFNano French Society for nanomedicine annual meeting, 09-12 Décembre 2014, Nancy (France)

A-S. Willemin, S. Fleutot, D. Boudemagh, E. Velot, V. Decot, P. Gillet, E. Arab-Tehrany, F. Cleymand, M. Rousseau, V. Moby

Combining chitosan/hydroxyapatite scaffold, nacre active compounds and stem cells to develop functional bone substitute

Architected biomaterials, medical and tissue engineering, 04-05 Décembre 2014, Berlin (Allemagne)

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ang1 : Angiopoïétine-1

ARN : Acide ribonucléique

B-TCP : Phosphate tricalcique

BMP : *Bone morphogenic protein*

CE : Cellule endothéliale

CD : *cluster* de différenciation

CPE : Cellule progénitrice endothéliale

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

DHA : d'acide docosahexaénoïque

EBM-2 : *Endothelial growth basal medium-2*

EGF : *Epidermal growth factor*

EGM-2 : *Endothelial cell growth medium-2*

EPA : Acide eicosapentanoïque

ESM : *Ethanol soluble matrix*

FDA : *Food and drug administration*

FGF : *Fibroblast growth factor*

HA : hydroxyapatite

HDMEC : *Human dermal microvascular endothelial cells*

HSaVECs : *Human saphenous vein endothelial cells*

HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cell* Cellule endothéliale de la veine ombilicale humaine

IGF-1 : *Insulin growth factor*

MMP : métalloprotéinase matricielle

ISEV : *International Society for Extracellular Vesicles*

nEV : Vésicule extracellulaire de taille nanométrique

PECAM-1 : *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PDGF-BB : *Platelet derived growth factor-BB*

PLGA : acide poly(lactique-co-glycolique)

VE-cadhérine : *Vascular endothelial-cadherin*

VEC : Vésicule extracellulaire

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-2 : *Vascular endothelial growth factor receptor-2*

vWF : *von Willebrand factor*

Table des matières

I. INTRODUCTION GENERALE	1
II. ETAT DE L'ART	5
II. 1. Co-culture de cellules de la lignée endothéliale et de cellules ostéogéniques	8
II. 2. Matrice tridimensionnelle.....	13
II. 3. Milieu conditionné et vésicules extracellulaires : évolution vers matrice « <i>cell-free</i> »	14
II. 4. Stimulus environnementaux	20
III. RESULTATS	39
Chapitre 1. Étude des effets des principes actifs issus de la nacre (ESM) sur le potentiel angiogénique des cellules de la lignée endothéliale <i>in vitro</i>	39
1.1 Cellules endothéliales matures (HUVECs).....	39
1. 2 Cellules progénitrices endothéliales (CPEs)	45
Chapitre 2. Étude des effets des principes actifs issus de la nacre (ESM) sur la différenciation ostéogénique des CSMs	67
2. 1 Études <i>in vitro</i>	67
2. 2 Développement d'une nouvelle méthode d'identification des composés ostéogéniques présents dans l'ESM	71
Chapitre 3. Étude des effets stimulateurs des vésicules extracellulaires nanométriques sécrétées par les cellules souches mésenchymateuses <i>in vitro</i> sur les cellules de la lignée endothéliale	85
3. 1 Cellules endothéliales matures (HUVECs).....	85
3. 2 Cellules progénitrices endothéliales	93
Chapitre 4. Étude des effets <i>in vitro</i> de vésicules de taille nanométrique issues d'agroressources sur les cellules progénitrices endothéliales et les cellules souches mésenchymateuses.....	103
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	109

I. INTRODUCTION GENERALE

Le tissu osseux est un tissu présentant des caractéristiques d'auto-renouvellement étonnantes. Le tissu « ancien » est continuellement détruit par des cellules spécialisées, les ostéoclastes, et est remplacé par du tissu néoformé par les ostéoblastes. Il est également capable de se réparer après une lésion. En effet, un réalignement puis une immobilisation du membre suffisent en général à la réparation de l'os. Cette réparation passe par la mobilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) qui sous l'impulsion de facteurs ostéo-inducteurs (comme les « *Bone Morphogenic Protein* », BMP) vont se différencier en ostéoblastes. Cette réparation est possible à condition que des vaisseaux sanguins se trouvent à proximité de la lésion, afin de pouvoir acheminer les CSMs jusqu'au site touché. Cette condition constitue le principal facteur limitant de la réparation osseuse (Laurencin-Dalicioux 2010). En cas de pertes de substances osseuses de grande étendue (*critical-sized defects*) (pouvant atteindre plusieurs centimètres), la réparation nécessite alors d'être assistée. Le traitement de ces pertes osseuses constitue un véritable enjeu économique et thérapeutique, elles sont en effet responsables de plus de cent millions de procédures chirurgicales chaque année à travers le monde (Maisani et al. 2017).

A ce jour, le traitement de ces pertes de substances osseuses se fait par une greffe d'os autologue, qui constitue la référence. Elle consiste à prélever sur le patient lui-même un greffon, le plus souvent au niveau de la crête iliaque, puis de le positionner au niveau de la lésion. Cette technique n'engendre pas de réaction de rejet puisque le greffon provient du patient. Cependant, cette thérapeutique n'est pas parfaite et présente tout de même des inconvénients tels que : une morbidité post-opératoire importante, la nécessité d'une procédure invasive supplémentaire (deuxième site), un problème de disponibilité (présence en quantité limitée) et la présence d'une résorption difficile à anticiper (Sakkas et al. 2016). Pour faire face à ces inconvénients, des alternatives ont été recherchées : c'est ce qui a permis le développement des substituts osseux :

allogreffes, xéno-greffes, céramiques et matériaux composites principalement. Mais, aucun matériau à ce jour ne peut remplacer totalement l'os autogène. Depuis quelques années, les espoirs se tournent vers la création d'un substitut osseux associant une matrice, une co-culture de cellules de la lignée endothéliale et de la lignée ostéoblastique et des stimulus environnementaux afin de pallier les limites des différentes techniques actuelles : c'est tout l'enjeu de l'ingénierie tissulaire osseuse. Le point clé dans le développement de ce substitut est l'établissement d'un réseau vasculaire au sein de ce biomatériau. En effet, la vascularisation est un point crucial pendant la croissance et le développement de l'os. Les cellules endothéliales (CEs) étant faiblement disponibles, les chercheurs se sont tournés vers un autre type cellulaire capable de se différencier en CEs : les Cellules Progénitrices Endothéliales (CPEs), afin de les associer aux CSMs, cellules capables de se différencier en ostéoblastes.

Pour engendrer ces différenciations, un inducteur unique pourrait être utilisé : la nacre. Étudiée depuis le milieu des années 1980, la nacre a montré sa biocompatibilité et sa capacité à induire la formation d'un nouvel os *in vivo* lorsqu'elle était implantée au niveau de défaut osseux. Depuis, les études se sont concentrées sur les molécules présentes au sein de la nacre et responsables de ses propriétés ostéogéniques. Un extrait obtenu à partir de poudre de nacre a démontré sa capacité à restaurer la minéralisation d'ostéoblastes matures : ce sont les principes actifs issus de la nacre solubles dans l'éthanol (*Ethanol Soluble Matrix*, ESM). Cependant, l'effet de ces principes actifs sur la différenciation de cellules immatures vers un phénotype osseux ainsi que leur effet sur l'angiogenèse n'ont, à ce jour, jamais été étudiés.

Travaillant au sein d'un groupe de recherche en ingénierie vasculaire et ostéoarticulaire, nous avons voulu étudier le potentiel de l'ESM à stimuler à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse.

Pour cela des CPEs provenant du sang de cordon, et des CSMs provenant de la moelle osseuse et cultivées sous forme de sphère tridimensionnelle, en présence d'ESM ont été utilisées. Etant la première étudiante du groupe à travailler sur l'effet stimulateur de l'ESM sur les cellules de

la lignée endothéliale, il a fallu dans un premier temps étudier son influence sur un type de cellules de la lignée endothéliale, classiquement utilisé en culture et considéré comme des cellules de référence : les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs). Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de l'ESM sur les CPEs puis sur les CSMs cultivées sous forme de sphère tridimensionnelle.

En parallèle de ces travaux visant à développer un substitut osseux prévascularisé cellularisé, nous avons voulu nous affranchir d'une des deux composantes cellulaires en évaluant l'influence des vésicules extracellulaires de taille nanométrique (nEVs) issues des CSMs isolées à partir de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain sur les capacités angiogéniques des cellules de la lignée endothéliale (HUVECs puis CPEs (sang de cordon)). En effet, les CSMs représentent une source cellulaire intéressante pour la médecine régénérative. Cependant, il a été mis en évidence récemment que ce potentiel de régénération des CSMs est lié principalement aux effets paracrines des CSMs et donc aux produits de sécrétion de ces cellules : facteurs solubles et vésicules extracellulaires (VECs) (Vizoso et al. 2017). Parmi les facteurs solubles, des facteurs de croissance importants dans la régénération osseuse (BMP2 et *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) ont pu être identifiés. Parmi les VECs, une fraction spécifique a été étudiée de manière plus approfondie : les nEVs. Ces nEVs présentent une taille entre 30 et 150nm et expriment à leur surface les *clusters* de différenciation (CD)9, CD63 et CD81. Ces nEVs transportent des protéines, des acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) qui vont interagir avec les cellules environnantes et ainsi engendrer une modification du comportement de la cellule. Dans le cadre de ces travaux, nous avons choisi d'étudier le potentiel angiogénique des nEVs issus de CSMs de gelée de Wharton, afin d'utiliser des cellules ayant la même origine tissulaire : le cordon ombilical. Enfin, au cours de travaux préliminaires, nous avons évalué l'impact de nanoliposomes, nanovesicules

naturelles, sur l'activité métabolique, l'expression génique et protéique des CPEs et des CSMs. Ces nanovésicules pourraient servir de vecteurs à l'ESM afin de l'administrer au niveau du site d'intérêt ou afin de l'inclure au sein de biomatériaux.

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été de :

(1) évaluer l'effet des principes actifs issus de la nacre (ESM) sur le potentiel angiogénique de cellules endothéliales matures (les HUVECs) puis de CPEs issues du sang de cordon ombilical.

(2) déterminer l'effet de l'ESM sur la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de la moelle osseuse.

(3) étudier les effets stimulateurs des nEVs issues de CSMs de la gelée de Wharton du cordon ombilical sur le potentiel angiogénique des cellules de la lignée endothéliale (HUVECs et CPEs), jouant un rôle majeur dans la formation du réseau vasculaire.

(4) explorer au travers de travaux préliminaires l'impact de nanoliposomes issus de lécithines de colza sur l'activité métabolique, l'expression génique et protéique de CPEs et CSMs.

II. ETAT DE L'ART

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé et vascularisé qui subit deux phénomènes équilibrés tout au long de sa vie : le modelage et le remodelage. Cette capacité de remaniement permanent lui permet de s'auto-réparer en cas de lésion. Malheureusement dans le cas de pertes de substance de grande étendue (pseudarthrose, fentes palatines, ablation de tumeurs osseuses, traumatismes maxillo-faciaux, ...), ce potentiel de réparation est insuffisant. Cela conduit à une formation de cartilage ou à une nécrose ischémique. Il est alors nécessaire d'avoir recours à une greffe osseuse autologue (*gold standard*) ou à l'implantation de biomatériaux de substitution osseuse (allogreffe, xéngreffe, céramiques bioactives synthétiques, matériaux composites, matrices associées à des facteurs de croissance ostéoinducteurs) (Gómez-Barrena et al. 2015). Ces matériaux vont attirer et servir de support aux cellules de l'hôte. Néanmoins, dans certains cas, ces thérapeutiques ne sont pas suffisantes, la majorité des cellules ne survivant pas en raison d'une perfusion insuffisante du greffon ou substitut.

Le challenge actuel repose sur le développement, par le biais de l'ingénierie tissulaire, d'un substitut qui favoriserait la formation d'un nouvel os vascularisé, dont les caractéristiques biologiques et mécaniques seraient les plus proches possibles de celle de l'os natif. Il est donc indispensable de créer un réseau vasculaire au sein du substitut osseux afin de fournir un apport sanguin adéquat aux cellules présentes au sein du substitut (Orciani et al. 2017). Ce système vasculaire doit se connecter avec le système vasculaire de l'hôte pour garantir un apport suffisant en oxygène et nutriments aux cellules (Costa-Almeida et al. 2014). Dans les modèles de régénération osseuse, la vascularisation reste un des facteurs limitant. Pour surmonter ce problème, différentes approches ont été proposées, notamment :

- intégration de facteurs de croissance angiogénique au sein du substitut afin de stimuler la croissance des vaisseaux sanguins à partir de l'hôte après implantation *in vivo* (Wernike et al.

2010; Lenze et al. 2014). Le facteur angiogénique le plus fréquemment rencontré est le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Il peut être utilisé seul ou combiné à un facteur de croissance ostéogénique : les BMP (*Bone Morphogenic Protein*) notamment BMP2 ou 7 (Gothard et al. 2014). De nombreux travaux de la littérature démontrent l'efficacité de cette stratégie et sa capacité à stimuler la réparation osseuse : l'utilisation de substituts tels que des céramiques (phosphate de calcium biphasique) fonctionnalisées avec du VEGF a mis en évidence la capacité de ces substituts à libérer des facteurs angiogéniques au niveau du site d'implantation et à stimuler la vascularisation du biomatériau et la formation osseuse (Wernike et al. 2010). Des biomatériaux à base de polymères acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) délivrant du VEGF implantés au sein de lésions crâniennes chez le rat montrent une augmentation importante de la vascularisation ainsi qu'une augmentation de la formation de tissu minéralisé, comparativement aux biomatériaux implantés seuls (Murphy et al. 2004; Geiger et al. 2005; Zhang et al. 2016b; Khojasteh et al. 2016). L'utilisation des facteurs de croissance BMP2 et BMP7, associé à un support collagénique, est approuvée par la *Food Drug Administration* (FDA) dans le traitement des fusions spinales et des fractures des os longs (Begam et al. 2017). La principale limite à l'utilisation des BMP est leur utilisation à des doses supraphysiologiques ce qui entraîne des complications, telles que des réactions immunitaires et la formation d'os ectopique (Ben-David et al. 2013; James et al. 2016). Leur utilisation est également associée à un coût important.

- élaboration *in vitro* de substituts osseux prévascularisés qui seront connectés au système vasculaire de l'hôte après implantation.

C'est cette dernière approche que nous avons choisi de développer. Les points cruciaux sont le choix du type cellulaire, de la matrice et des stimulus environnementaux (biochimiques et/ou mécaniques) adéquats. L'utilisation conjointe de ces 3 acteurs permettra le développement d'un substitut osseux prévascularisé issu de l'ingénierie tissulaire.

Afin d'obtenir un substitut osseux vascularisé, une coculture de cellules ostéogéniques et de cellules de la lignée endothéliale sera réalisée au sein d'une matrice tridimensionnelle, exposée à des stimulus environnementaux (Figure 1). En effet, durant la croissance osseuse, des interactions synergiques existent entre les précurseurs ostéoblastiques et les cellules endothéliales permettant un développement coordonné du tissu minéralisé et de la vascularisation (Santos and Reis 2010). La régénération osseuse dépendrait donc d'interactions entre ces deux types cellulaires (Geris et al. 2008; Atesok et al. 2010). Les cellules de la lignée endothéliale ne sont pas capables à elles seules de former de l'os.

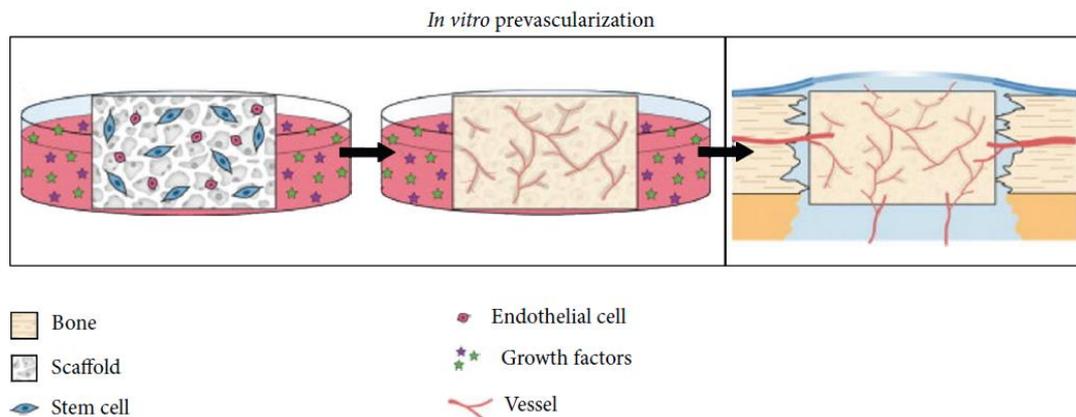


Figure 1 : Développement *in vitro* de substituts osseux prévascularisés (D'après (Yousefi et al. 2016)) : association d'une co-culture de cellules de la lignée endothéliale / cellules souches mésenchymateuses ensemencées au sein d'une matrice, et d'un environnement enrichi en facteurs de croissance.

II. 1. Co-culture de cellules de la lignée endothéliale et de cellules ostéogéniques

La co-culture en contact direct permet de simuler les relations entre les cellules dans le tissu vivant (Cenni et al. 2011). Ces systèmes de co-culture permettent de recréer un environnement le plus proche possible de celui rencontré *in vivo*, en mimant les processus physiologiques de la régénération osseuse et de l'angiogenèse (Dohle et al. 2010; Laranjeira et al. 2012), répondant ainsi au besoin de vascularisation immédiate.

Les cellules de la lignée endothéliale peuvent être soit des cellules endothéliales matures, comme les HUVECs (Villars et al. 2002; Guillotin et al. 2008), les cellules endothéliales issues de micro-vaisseaux présents dans la peau (HDMECs) (Kaigler et al. 2005) ou encore les cellules issues de la veine saphène (HSaVECs) (Guillotin et al. 2004), soit des cellules progénitrices endothéliales (CPEs) (Guerrero et al. 2013). A l'exception des HUVECs, les autres types de CEs sont rarement utilisés car ils nécessitent le sacrifice de structures vasculaires saines. Les CPEs ont été isolées à la fin des années 1990 pour la première fois par Asahara et al. (Asahara et al. 1997). Ces progéniteurs endothéliaux peuvent être isolés principalement du sang périphérique (Dong and Ha 2010), et du sang de cordon ombilical (Paprocka et al. 2011). La différenciation des CPEs vers les CEs se fait sous l'influence d'un facteur de croissance pro-angiogénique, le VEGF principalement. De nombreuses études ont déjà montré la capacité des CPEs à recréer un réseau vasculaire (Lavergne et al. 2011; Yin et al. 2015; Bai et al. 2015).

Les deux types cellulaires de la lignée endothéliale les plus utilisés sont les cellules endothéliales matures, HUVECs et les CPEs.

Les HUVECs constituent le type de CEs le plus utilisé dans les systèmes de co-culture pour étudier le développement d'un réseau vasculaire car elles sont faciles à utiliser. Les marqueurs

caractéristiques des cellules endothéliales incluent *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), *vascular endothelial-cadherin* (VE-cadhérine), *von Willebrand factor* (vWF), *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2), thrombomoduline, endogline (Lip and Blann 1997; Yancopoulos et al. 2000; Woodfin et al. 2007; Vestweber 2008; Nassiri et al. 2011; Martin et al. 2013). La co-existence de ces marqueurs est indispensable pour affirmer que les cellules sont bien des cellules endothéliales car la plupart de ces marqueurs ne sont pas exprimés exclusivement par les cellules endothéliales.

Les CPEs seront préférées aux HUVECs car ces dernières ne sont pas utilisables en clinique et ont montré une apoptose significative après implantation (Schechner et al. 2000). Koob S et al. n'ont pas montré *in vivo* d'amélioration de la formation osseuse en co-culture HUVECs/CSMs mais uniquement une néoformation vasculaire (Koob et al. 2011). Ces CEs autologues sont faiblement disponibles ce qui nécessite, pour générer un nombre suffisant de CEs matures, de les multiplier en culture par des passages répétés. Cependant, ces étapes conduisent à la perte progressive du potentiel de régénération des CEs (Maier et al. 1990; Sato et al. 1993; Yang et al. 1999). Leur activité proliférative et leur fonction spécifique sont progressivement perdues, limitant leur utilisation clinique (Prasad et al. 2005). Pour pallier ces problèmes, la voie proposée serait l'utilisation des CPEs. En effet, à l'inverse des CEs matures, les CPEs sont capables de se diviser plus de 1000 fois sans perte de leur phénotype (Lin et al. 2000). Elles pourront être utilisées dans le cadre d'autogreffe. Les CPEs sont capables de former des colonies endothéliales *in vitro* (Asahara et al. 1997) et peuvent contribuer à la revascularisation *in vivo* (Sepúlveda et al. 2007). Elles se différencient *ex-vivo* en cellules ayant des caractéristiques de CEs, incluant la formation de structures comparables aux vaisseaux dans des conditions définies et de forme pavimenteuse quand la population arrive à confluence en culture. Elles peuvent être amplifiées *in vitro* sans perdre leur phénotype endothélial (Kim and von Recum 2008). Des études ont montré que la transplantation de CPEs, au niveau de défauts

osseux, permet d'augmenter la formation osseuse *in vivo* (Rozen et al. 2009; Atesok et al. 2010). C'est une source utilisable en clinique et facilement accessible par prélèvement sanguin. Cependant, la stabilisation de leur phénotype en culture étant plus difficile à obtenir, le milieu utilisé pour la coculture est un milieu riche en facteurs de croissance (VEGF, *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin growth -1* (IGF-1)). Elles sont principalement décrites par leurs antigènes de surface. Les CPEs sont positives pour CD133, CD34 et VEGFR-2. (Shantsila et al. 2008; Costa-Almeida et al. 2014). Il existe différents sous-groupes de CPEs mais il n'y a pas actuellement de définition consensuelle ou de technique permettant de les différencier (Shantsila et al. 2008; Costa-Almeida et al. 2014). Les CPEs dites « précoces » sont décrites comme étant des cellules dérivées de la moelle osseuse et exprimant des marqueurs de surface tels que CD14, CD45 et CD133, ce qu'elles partagent avec les cellules souches hématopoïétiques. Ces CPEs dites « précoces » semblent agir de façon paracrine, en fournissant des facteurs angiogéniques (Shantsila et al. 2008). A l'opposé, les CPEs dites « tardives » apparaissent beaucoup plus tard en culture et présentent des caractéristiques typiquement endothéliales, telles que l'expression de vWF, PECAM-1 et VE-cadhérine. Elles présentent un potentiel de prolifération important (Shantsila et al. 2008; Costa-Almeida et al. 2014).

Du côté du lignage ostéoblastique, les cellules utilisées sont soit des ostéoblastes différenciés : lignées ostéoblastiques (Ciardelli et al. 2010; Zhang et al. 2010) ou des ostéoblastes primaires humains (Deb et al. 2010; Dohle et al. 2010; Fuchs et al. 2010; Unger et al. 2010), soit des CSMs indifférenciées (Aguirre et al. 2010; Wang et al. 2011). La matrice extracellulaire produite par ces cellules ostéogéniques ou mésenchymateuses sert de support aux cellules de la lignée endothéliale, permettant leur adhérence et leur fonction cellulaire. Les CSMs favorisent la formation de structures comparables aux vaisseaux dans une matrice 3D (Verseijden et al. 2012; Rao et al. 2012; Duttenhoefer et al. 2013).

Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse. Ils représentent donc le candidat idéal dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse. L'association CPEs/ostéoblastes (OBs) stimule à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse (Buschmann et al. 2011). Cette combinaison stimule même l'angiogenèse du tissu hôte (Unger et al. 2010; Ghanaati et al. 2011). Cependant, en raison de leur isolement difficile et de leur faible capacité de prolifération, l'utilisation de ces cellules est très limitée.

Les CSMs constituent une source cellulaire attractive en médecine régénérative, notamment en ingénierie du tissu osseux, du fait de leurs capacités d'autorenouvellement, leurs propriétés immunomodulatrices, et leur potentiel de différenciation ostéogénique *in vitro* et *in vivo* (Bruder et al. 1997; Jaiswal et al. 1997; Pittenger et al. 1999; Titorencu et al. 2007; El Omar et al. 2016). L'autorenouvellement est une propriété essentielle des cellules souches qui désigne leur capacité à se multiplier à l'identique quasi indéfiniment. Elles peuvent être isolées et amplifiées *in vitro* sans perte du potentiel de différenciation. Ce sont des cellules indifférenciées capables de se différencier en différents types cellulaires spécialisés et qui évitent les considérations éthiques soulevées par les cellules souches embryonnaires (Körbling et al. 2003). Leurs propriétés immunomodulatrices font de ces cellules une source utilisable dans un contexte allogénique. Actuellement, il existe différentes approches pour caractériser les CSMs. Le comité « *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* » propose des critères minimaux pour définir que les CSMs présentes sont bien des CSMs : 1) adhérence aux surfaces plastiques quand les CSMs sont maintenues dans des conditions standards de culture, 2) expression des molécules de surface CD73, CD90, CD105 et absence d'expression de CD11, CD14, CD34, CD45 et HLA-DR, 3) potentiel de différenciation *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes (Dominici et al. 2006; Krampera et al. 2013). Les CSMs expriment également des facteurs angiogéniques tels que VEGF, FGF, angiopoïétine-1 (Ang1) et *epidermal growth factor* (EGF). Les CSMs sont

présentent dans de nombreux tissus adultes : moelle osseuse, tissu adipeux, pulpe dentaire et liquide synovial principalement et des tissus fœtaux notamment sang placentaire et placenta.

La différenciation des CSMs en cellules ostéoprogénitrices est obtenue par stimulation : adjonction de BMP2 ou dexaméthasone (Puleo 1997; Mendes et al. 1998), ou en présence de poudre de nacre (Flausse et al. 2013). La capacité des CSMs à former de l'os a été confirmée dans différents modèles *in vivo* (Bruder et al. 1998; Mendes et al. 2002; Birmingham et al. 2012; Gong et al. 2016). Cependant, l'association CPEs/CSMs augmente l'ostéogenèse mais pas l'angiogenèse par rapport aux monocultures respectives (Sun et al. 2016a). Sept jours après implantation de matrices à base de Matrigel et d'une coculture CPEs/CSMs, la formation de structures vasculaires a pu être observée (Allen et al. 2011). Des structures prévasculaires formées *in vitro* dans des sphéroïdes contenant une co-culture HUVECs/CSMs sont capables de s'anastomoser avec le système vasculaire de l'hôte chez des souris nude athymiques. (Verseijden et al. 2012).

De nombreux systèmes de co-cultures ont donc été développés associant HUVECs/CSMs, HUVECs/OBs, CPEs/CSMs, CPEs/OBs (Unger et al. 2010; Buschmann et al. 2011; Ghanaati et al. 2011).

Ces systèmes de co-culture seront associés à une matrice tridimensionnelle afin de recréer de la façon la plus proche possible, l'environnement *in vivo*.

Selon les études, il y aura des variations principalement sur les deux types cellulaires utilisés, sur le ratio entre ces deux types cellulaires (Grellier et al. 2009), sur l'environnement cellulaire (milieu de culture utilisé, teneur en oxygène, culture statique ou dynamique) (Rouwkema et al. 2006; Bidarra et al. 2010) et sur la matrice utilisée. Ces paramètres peuvent influencer

fortement le dialogue intercellulaire et la réponse des cellules en coculture, et devront être optimisés afin de développer des substituts osseux prévascularisés contenant un réseau vasculaire tridimensionnel dont l'anastomose pourra se faire avec le tissu hôte.

II. 2. Matrice tridimensionnelle

La matrice idéale doit être biocompatible, biodégradable et bioactive notamment à l'interface avec le tissu hôte permettant la mise en place d'interactions entre la matrice et le tissu environnant favorisant la colonisation cellulaire et l'ostéointégration. Cette bioactivité implique trois notions : ostéoconduction, ostéoinduction, ostéogénèse (Figure 2) (Polo-Corrales et al. 2014).

Ostéoconducteur : le substitut sert de support aux cellules (ostéoblastes, cellules souches), de trame pour la formation osseuse. Permet également l'invasion par les vaisseaux sanguins.

Ostéoinducteur : le substitut est capable de recruter localement des cellules indifférenciées (cellules souches) et de stimuler leur différenciation en ostéoblastes pour la synthèse d'une matrice osseuse.

Ostéogénique : le substitut contient tous les éléments y compris les cellules (ostéoblastes) nécessaires à la formation de l'os.

Figure 2 : Notion de bioactivité (d'après (Canceill et al. 2018)) : la bioactivité correspond à l'interaction des substituts osseux avec le milieu environnant. Elle implique ostéoconduction, ostéoinduction et ostéogénèse.

La biodégradation doit être progressive, plus exactement la vitesse de biodégradation doit être adaptée au remplacement progressif par les cellules de l'hôte et à la formation d'un nouveau tissu osseux fonctionnel.

La matrice doit être constituée de pores ouverts et interconnectés afin d'optimiser la circulation des cellules, des fluides et des molécules dans le matériau (Dadsetan et al. 2008; Huri et al. 2014; Wang et al. 2015).

Cette matrice peut être composée de constituants d'origine naturelle ou d'origine synthétique (Szpalski et al. 2012; Lee et al. 2014). Les principaux polymères utilisés sont à base de collagène, d'acide polyglycolique, de polycaprolactone ou d'acide polylactique, car approuvés par la FDA. Des polymères d'origine naturelle ont été également employés comme la chitine, le chitosan, l'alginate et le pullulan (Venkatesan et al. 2014, 2015; Maisani et al. 2017).

D'autres études se sont intéressées à la création de matériaux composites formés de polymères et de particules hydroxyapatite (HA). L'HA est un composant naturel de l'os et des études ont montré que son incorporation au sein de biomatériaux destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse améliorerait l'ostéointégration de l'implant (Deplaine et al. 2013). Ainsi Fricain et al. ont augmenté le potentiel de minéralisation de biomatériaux formé de pullulan et de dextran grâce à l'ajout d'HA (Fricain et al. 2013).

Ces différentes matrices vont servir de support aux cellules pour permettre une fois implantées la formation du nouveau tissu osseux, on parle de matrices cellularisées.

II. 3. Milieu conditionné et vésicules extracellulaires : évolution vers matrice « *cell-free* »

Depuis quelques années, la recherche tend à se concentrer non plus sur le développement de matrices cellularisées, mais sur la création de matrices « *cell-free* ».

En effet, les CSMs, bien que classiquement utilisées en médecine régénérative, présentent des inconvénients notables : leur administration par voie intraveineuse s'accompagne d'une fixation importante de ces cellules dans les poumons avant d'atteindre leur cible (Barbash et al. 2003), leur potentiel tumorigénique et donc le potentiel de transformation pathologique à long

terme, et la complexité du stockage, le coût et le temps importants associés aux phases d'expansion cellulaire et une diminution des capacités des cellules avec l'augmentation de l'âge du donneur (Lai et al. 2011; Nakamura et al. 2015). De plus, les cellules implantées ont une durée de vie courte : 90% des cellules greffées meurent dans les deux semaines suivant l'implantation (Giannoni et al. 2010; Agrawal et al. 2014).

Pour pallier ces différents inconvénients, la thérapie dite « *cell-free* », visant à utiliser les produits de sécrétion des cellules et à s'affranchir totalement de la composante cellulaire, a donc été développée (Phinney and Pittenger 2017). Cette thérapie utilise soit le milieu conditionné (milieu de culture contenant les produits de sécrétion des cellules (facteurs solubles et VECs)) soit uniquement les VECs (Timmers et al. 2007; Nakamura et al. 2015; Park et al. 2017; Xia et al. 2018).

La présence de facteurs de croissance importants dans le phénomène de réparation osseuse tels que BMP-2 et VEGF a été identifiée au sein de milieux conditionnés issus de CSMs (Li et al. 2012). Ce milieu conditionné permet également de diminuer les effets néfastes du phénomène d'ischémie/reperfusion *in vitro* et *ex vivo* (Angoulvant et al. 2011). Les effets paracrines des cellules souches semblent être d'ailleurs les principaux responsables du potentiel de régénération des CSMs (Ratajczak et al. 2012; Vizoso et al. 2017). De plus, ces approches présentent des avantages par rapport aux facteurs de risques associés aux cellules : facilité de stockage, préservation de l'activité biochimique lors du stockage, et réduction du coût et temps associés à l'expansion cellulaire (Wang et al. 2015; Konala et al. 2016; Sun et al. 2016b; Vizoso et al. 2017).

Les CSMs transfèrent ces VECs contenant des signaux de régénération (protéines, microARN notamment) aux cellules et organes endommagés stimulant ainsi la régénération tissulaire (Biancone et al. 2012; Khan et al. 2015; Shabbir et al. 2015; Zhang et al. 2016a; Collino et al.

2017; Cruz and Rocco 2017). Elles sont présentes dans tous les fluides biologiques (sang, urine, salive, sperme, lymphe...). Ces VECs peuvent être comparées à des messagers, jouant un rôle important dans la communication cellulaire et donc dans la réparation, mais également dans la propagation de maladies (Raposo and Stoorvogel 2013; Alenquer and Amorim 2015; Nomura 2017). Elles sont également impliquées dans la prolifération cellulaire, et l'immunomodulation (Dostert et al. 2017a). Différentes études réalisées sur les VECs ont montré une importante hétérogénéité de taille, de contenu et de composition de la membrane en fonction des conditions environnementales et du type cellulaire étudié (Lo Cicero et al. 2015; Marcoux et al. 2016).

L'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) classe ces VECs en 3 catégories principales : les corps apoptotiques, les microparticules (microvésicules ou ectosomes cellulaires) et les nEVs (Figure 3).

Les corps apoptotiques sont libérés par des cellules en voie d'apoptose et sont de taille importante (1 à 5 μm). Ils contiennent majoritairement des fragments nucléaires ou des organites cellulaires. Les corps apoptotiques vont être phagocytés par les macrophages (Akers et al. 2013).

Les microparticules sont formées par le bourgeonnement de la membrane plasmique et présentent une taille comprise entre 0,1 et 1 μm . Elles sont produites par des cellules après activation ou en état de stress. La composition de leur membrane dépendant de l'origine cellulaire, il n'existe pas de marqueurs spécifiques pour reconnaître ces microparticules. Elles peuvent transmettre à d'autres cellules des protéines, des lipides ou des acides nucléiques (Yáñez-Mó et al. 2015).

Enfin, la dernière catégorie de VECs est représentée par les nanovésicules. Elles sont secrétées par toutes les cellules, de manière physiologique. Elles ont une origine endosomale et sont libérées dans le milieu extracellulaire lorsque la membrane du corps multivésiculaire qui les contient fusionne avec la membrane plasmique. Leur taille varie entre 30 et 150 nm. Elles sont

caractérisées par la présence à leur surface de marqueurs appartenant à la famille des tétraspanines (protéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire), CD9, CD63 et CD81 (Ratajczak et al. 2006; Keshtkar et al. 2018). Les nEVs sont beaucoup plus étudiées que les microparticules et les corps apoptotiques ; deux bases de données ont ainsi été créées afin de recenser les différentes biomolécules qu'ils contiennent (ExoCarta (<http://exocarta.org/index.html#>) et EVpedia (http://student4.postech.ac.kr/evpedia2_xe/xe/)). Le caractère ubiquitaire de la sécrétion de ces nEVs peut renseigner sur l'état de santé de la cellule sécrétrice et ces nEVs peuvent dans ce cas devenir des biomarqueurs de pathologie.

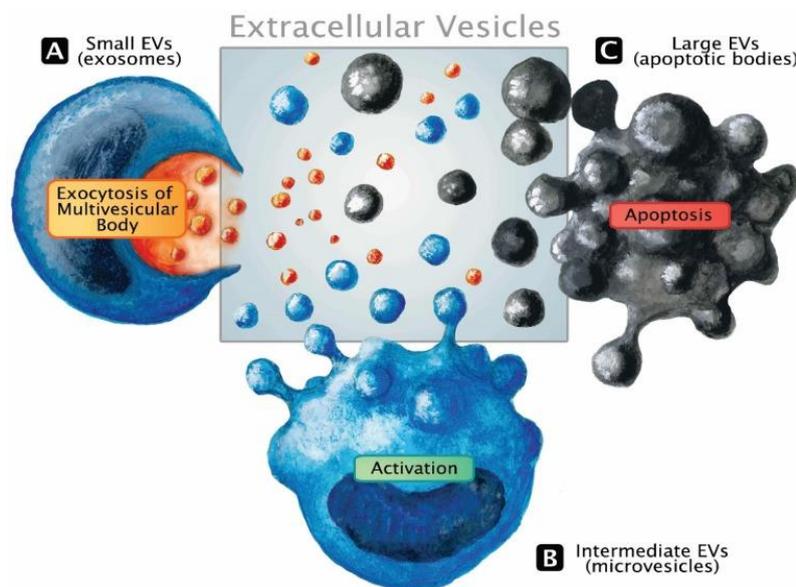


Figure 3 : Trois principaux types de vésicules extracellulaires : A : vésicules extracellulaires de taille nanométrique ; B : microvésicules ; C : corps apoptotiques (d'après (Raeven et al. 2018)).

L'isolement de ces VECs n'est pas encore optimisé. Cet isolement peut se faire par ultracentrifugation, par séparation par gradient de densité et par immunoaffinité. L'ultracentrifugation, qui est la méthode la plus utilisée, consiste à réaliser une série de centrifugations à très grande vitesse afin de concentrer les éléments de faible taille, contenus dans le milieu conditionné. Cependant, les résultats obtenus avec cette méthode sont rarement reproductibles, en raison d'une agrégation importante des constituants de faible taille (débris

cellulaires, organelles libres) présents dans ce milieu conditionné (Livshits et al. 2016; Furi et al. 2017).

Une autre méthode, couramment utilisée dans la littérature, est la séparation par gradient de densité. Cette méthode utilise l'ultracentrifugation combinée à un gradient de sucrose. Les échantillons obtenus grâce à cette méthode ont une pureté plus importante que ceux obtenus avec l'ultracentrifugation. Cette méthode permet une séparation efficace des VECs en fonction de leur densité, les nEVs possédant une densité plus faible que les microparticules et les corps apoptotiques (Whiteside 2017; Furi et al. 2017).

Enfin, l'immunoaffinité repose sur un tri magnétique utilisant le ciblage des marqueurs de surface des VECs (CD9, CD63 et CD81 pour les nEVs par exemple). Malheureusement, cette méthode ne peut être utilisée de manière efficace pour l'isolement des autres types de VECs, en raison de l'absence de marqueurs spécifiques des corps apoptotiques et des microparticules (Taylor and Shah 2015).

Utilisation des VECs en ingénierie osseuse :

Études *in vitro* :

De nombreuses études se sont intéressées à ces VECs et à leur rôle potentiel en ingénierie tissulaire osseuse. Martins et al. ont montré en 2016 que des VECs issues de milieux conditionnés de CSMs de moelle osseuse, prédifférenciées vers la lignée ostéoblastique, étaient capables d'induire l'expression de marqueurs spécifiques de cette lignée (tels que BMP-2, osterix, ostéopontine, ostéocalcine, et la phosphatase alcaline) par d'autres CSMs non prédifférenciées (Martins et al. 2016). Lu et al. ont montré que la présence de nEVs provenant de CSMs de tissu adipeux, dont la taille était comprise entre 100 et 130 nm, stimulaient la prolifération, la migration et la différenciation d'ostéoblastes primaires humains *in vitro* (Lu et al. 2017).

Études *in vivo* :

Des études *in vivo* ont montré le potentiel ostéogénique des nEVs. En effet, Zhang et al. ont utilisé des nanovésicules (taille : 60-140 nm) provenant de cellules souches embryonnaires humaines. Après caractérisation, ces nanovésicules ont été injectées dans des défauts osseux de rats une fois par semaine pendant 6 ou 12 semaines. Les résultats ont mis en évidence une meilleure réparation du défaut chez les animaux traités avec les nanovésicules comparés aux animaux non traités. La réparation était complète après 12 semaines de traitement (Zhang et al. 2016d). Furuta et al. ont comparé l'effet de milieux conditionnés, de milieux conditionnés sans nEVs et de nEVs seules lors de la réparation d'une fracture. Pour cela, ils ont utilisé des souris CD9^{-/-}, qui présentent un retard de réparation osseuse due à l'absence de formation de cal osseux, et chez lesquelles une fracture du fémur a été créée. Grâce à l'injection dans la fracture de milieux selon les différentes conditions étudiées (milieux conditionnés, milieux conditionnés sans nEVs, nEVs), le retard de réparation des souris CD9^{-/-} a été corrigé notamment lors de l'utilisation de nEVs et de milieux conditionnés, mais pas lors de l'injection de milieux conditionnés dépourvus de nEVs. Cette étude montre la contribution majeure des nEVs pour obtenir une réparation osseuse (Furuta et al. 2016).

D'autres études ont couplé l'utilisation des VECs à un biomatériau. Li et coll. ont étudié l'effet de vésicules (taille : 105 nm +/- 72 nm) provenant de CSMs de tissu adipeux, fixées sur des biomatériaux en PLGA. Ces matériaux ont ensuite été implantés dans des crânes de souris dans lesquels un défaut osseux avait été préalablement créé. Cette étude a montré un recrutement de CSMs plus important en présence de nEVs au sein du biomatériau six semaines après implantation (Li et al. 2018). Zhang et al. ont étudié l'effet des nEVs issus de CSMs dérivées d'iPS sur l'ostéogénèse. Pour cela, les nEVs (taille entre 50 et 150 nm et exprimant les marqueurs CD9, CD63 et CD81) ont été déposées sur un matériau composé de phosphate

tricalcique (β -TCP) implanté dans des défauts osseux de crânes de rat. Après huit semaines, une observation par micro-CT a mis en évidence la formation d'un nouvel os chez les rats ayant des implants de β -TCP couplés à des nEVs. Les auteurs ont également mis en évidence une activation plus importante de la voie Pi3K/Akt (impliquée dans la prolifération des ostéoblastes et la formation osseuse) en présence des nEVs (Zhang et al. 2016c). Cette même étude a été réalisée sur des rattes ovariectomisées. Les résultats étaient similaires à l'étude précédente, et il a été mis en évidence la présence d'une néovascularisation au sein de l'os nouvellement formé chez les rattes implantés avec implants de β -TCP couplés à des nEVs (Qi et al. 2016).

Le développement d'une matrice osseuse prévascularisée cellularisée ou « *cell-free* » nécessite l'utilisation de stimulus capables d'agir à la fois sur la différenciation ostéogénique et sur la différenciation angiogénique. Les stimulus les plus souvent utilisés sont les facteurs de croissance mais la tendance actuelle s'oriente vers l'utilisation de stimulus naturels tels que les stimulus d'origine marine.

II. 4. Stimulus environnementaux

Afin de stimuler la différenciation ostéogénique et endothéliale des cellules implantées, nous pouvons avoir recours à différents types de stimulus : stimulus biochimiques ou stimulus mécaniques. Les stimulus biochimiques les plus fréquemment rencontrés sont l'ajout de facteurs de croissance dans le milieu de culture ou la modification de la teneur en oxygène. Les stimulus mécaniques sont principalement l'exposition à des contraintes mécaniques ou la culture en bioréacteur (Pioletti 2013; Rosa et al. 2015).

La nacre :

Les composés issus de la biologie marine sont utilisés depuis de nombreuses années en chirurgie maxillo-faciale et orthopédique. En effet, l'exosquelette de corail est employé depuis les années 1980 comme substitut osseux (Patat and Guillemin 1989). Cependant, ce matériau n'est pas capable d'induire, seul, la formation d'un nouvel os et nécessite l'utilisation de facteurs de croissance tels que des BMP (Arnaud et al. 1999).

Dès 1990, la nacre a également été testée comme substitut osseux. La nacre compose le revêtement intérieur de la coquille de certains mollusques bivalves. Elle rend la coquille de ces mollusques plus résistante et emprisonne également les intrus qui seraient entrés dans la coquille en les enrobant (formant ainsi une perle). C'est un composé acellulaire formé à 97% de cristaux d'aragonite (carbonate de calcium) et à 3% d'une matrice organique (chitine, polysaccharides, protéines, peptides et petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da) (Marin et al. 2012). La nacre présente une organisation sous forme de briques et mortier, les cristaux d'aragonite formant les briques et la matrice organique le mortier (Fu et al. 2013) (Figure 4). Cette organisation rend la nacre très résistante. Camprasse et al. ont démontré en 1990 que ses propriétés mécaniques étaient similaires à celles du titane (Camprasse et al. 1990).

Des tests d'implantation de fragments de nacre de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* ont été réalisés chez l'Homme dans des défauts osseux maxillaires et ont montré la parfaite biocompatibilité du matériau (Camprasse et al. 1988). En 1992, plusieurs études démontrent la capacité de nacre issue de l'huître perlière *P. maxima* à induire la minéralisation d'ostéoblastes *in vitro* (Lopez et al. 1992; Silve et al. 1992).

Depuis, de nombreuses études ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* visant à démontrer encore plus finement les propriétés ostéogéniques de la nacre. Pour cela, des implants de nacre de

géométries différentes ont été implantés dans des défauts osseux de différentes espèces animales.

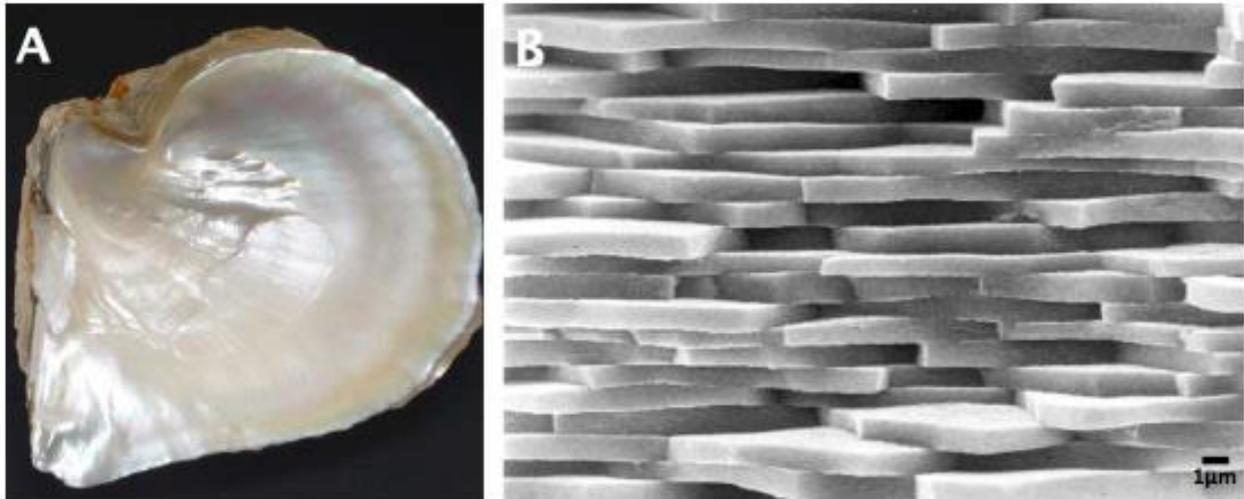


Figure 4 : Structure de la nacre d'une huître de l'espèce *Pinctada* : A : couche de nacre présente à l'intérieur d'une coquille ; B : image obtenue par microscopie électronique à balayage montrant la structure en « briques et mortier » de la nacre (d'après (Zhang et al. 2017))

Études in vivo

Nacre issue de *Pinctada margaritifera* : En 1997, des cylindres de nacre issus de *P. margaritifera* ont été implantés au niveau de défauts osseux créés dans des fémurs de rat. Après 14 jours d'implantation, les résultats ont montré une meilleure ostéogénicité de la nacre comparée à des implants composés de titane et d'hydroxyapatite (Liao et al. 1997). En 2000, Liao et al. démontrent que des granules de nacre de la même espèce sont totalement biocompatibles, biodégradables au cours du temps et ostéoconducteurs (Liao et al. 2000).

Nacre issue de *Pinctada maxima* : D'autres études *in vivo* ont été réalisées en utilisant de la nacre issue de l'huître perlière *P. maxima*. En 1999, des essais d'implantations de cylindres de nacre dans l'épiphyse fémorale de moutons ont été effectués et ont démontré, à 3 mois post-implantation, une parfaite biocompatibilité et la formation d'un nouvel os à la frontière entre

les implants et l'os (Atlan et al. 1999). Asvanund et Chunhabundit ont montré en 2012 que la nacre implantée dans la mandibule de porcs induisait une formation osseuse plus importante que des implants composés de β -TCP (Asvanund and Chunhabundit 2012). D'autres études réalisées sur des moutons ont mis en évidence une dégradation des pièces de nacre au cours du temps et mis en évidence leur potentiel ostéoinducteur (Berland et al. 2005; Rousseau et al. 2012; Pascaretti-Grizon et al. 2014).

D'autres études se sont intéressées à l'utilisation de la nacre broyée sous forme d'une poudre (taille des particules entre 50 et 150 μm). Des essais d'implantation *in vivo* chez le lapin et le mouton ont montré une bonne tolérance de la poudre de nacre par les organismes ainsi qu'une bonne intégration et la formation d'un nouvel os, 11 semaines après implantation (Lamghari et al. 1999, 2001b, a). Des essais d'implantation de poudre de nacre ont également été réalisés sur l'homme. En 1997, Atlan et al. ont implanté un mélange de poudre de nacre et de sang chez des patients présentant une perte importante d'os alvéolaire maxillaire. Six mois post-chirurgie, ils ont observé une parfaite ostéointégration de la nacre, sa dissolution progressive ainsi que la formation d'un nouvel os (Atlan et al. 1997).

La dégradation de la nacre *in vivo* varie en fonction de la forme et de la taille de l'implant utilisé. En effet, les pièces de nacre sont peu dégradées au cours du remodelage osseux, contrairement à la poudre de nacre qui se résorbe rapidement.

Études *in vitro*

Des études *in vitro* réalisées au laboratoire ont montré la capacité de la poudre de nacre issue de *P. margaritifera*, à induire l'expression de marqueurs ostéoblastiques et la formation d'une

matrice extracellulaire contenant de l'hydroxyapatite par des CSMs issues de moelle osseuse (Flausse et al. 2013).

Les études précédentes ont démontré la capacité de la nacre à induire la formation d'un nouvel os. Ce phénomène suggère donc la présence au sein de la nacre de molécules « signal » capables d'engendrer la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en cellules ostéoblastiques et d'augmenter l'activité des ostéoblastes.

Afin d'identifier ces molécules responsables des propriétés ostogéniques de la nacre, des extraits de nacre ont été étudiés.

Les extraits de nacre

Les principes actifs de la nacre solubles dans l'eau

Les principes actifs issus de la nacre solubles dans l'eau ont été les plus étudiés. Ils ont été isolés à partir de poudre de nacre puis mélangés avec de l'eau ultra-pure pendant 20h à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et constitue alors les principes actifs de la nacre solubles dans l'eau (*Water Soluble Matrix*, WSM) (Rousseau et al. 2003a). Ce processus est un processus doux qui n'entraîne pas de décalcification de la nacre. Cet extrait a montré sa capacité à stimuler l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur de la différenciation ostéoblastique, et ce pour plusieurs types cellulaires (CSMs issues de moelle osseuse de rat, CSMs de moelle osseuse humaine...) (Lamghari et al. 1999; Green et al. 2015). La WSM a également montré sa capacité à augmenter l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique (gènes Collagène I, Ostéocalcine, RunX2 et Ostéopontine) dans une culture de précurseurs ostéoblastiques d'origine murine (MC3T3) (Rousseau et al. 2008). Cet extrait a également montré sa capacité à accélérer le dépôt d'hydroxyapatite au sein de la matrice extracellulaire de cellules MC3T3 (Rousseau et al. 2003a).

Les principes actifs de la nacre solubles dans l'éthanol

D'autres solvants ont été utilisés afin d'extraire les composés actifs de la nacre solubles dans l'éthanol. Ces principes actifs, appelés *Ethanol Soluble Matrix* (ESM), ont démontré leur capacité à induire et à restaurer la minéralisation de la matrice extracellulaire des cellules osseuses *in vitro* (Brion et al. 2015). Cet extrait est obtenu après agitation de poudre de nacre et d'éthanol pendant 24h, le mélange est ensuite centrifugé. Le surnageant est récupéré puis l'éthanol est évaporé. La poudre obtenue est alors récupérée dans de l'eau, puis lyophilisée. La poudre ainsi obtenue constitue l'ESM qui est alors soluble dans le milieu de culture et ne contient plus aucune trace d'éthanol.

Résumé en français

Nacre, a natural, multi-use and timely biomaterial for bone graft substitution

La nacre, un biomatériau naturel, multi-usage et opportun comme substitution à la greffe osseuse

Ganggang Zhang, Alice Brion, Anne-Sophie Willemin, Marie-Hélène Piet, Vanessa Moby, Arnaud Bianchi, Didier Mainard, Laurent Galois, Pierre Gillet, Marthe Rousseau

La réparation des pertes de substances osseuses représente un enjeu majeur tant sur le plan thérapeutique qu'économique. La recherche du substitut idéal biocompatible et capable d'induire la formation d'un nouvel os concentre aujourd'hui de nombreux espoirs.

La nacre est utilisée comme traitement médical depuis des siècles. Son utilisation pour traiter des maladies hépatiques est évoquée dans des ouvrages de médecines traditionnelles chinoises datant de 1061. De plus, il a été retrouvé au début du 20^{ème} siècle, un crâne maya présentant un implant dentaire en nacre.

La nacre est composée d'une matrice organique et d'une matrice inorganique formée majoritairement de carbonates de calcium (aragonite). Elle tapisse l'intérieur de la coquille de certains mollusques bivalves lui conférant ainsi une résistance plus importante. La structure de la nacre sous forme de briques et mortier la rend très résistante aux contraintes mécaniques, et ce de manière similaire à l'os lui-même.

Depuis une trentaine d'années, des recherches approfondies étudient le potentiel de la nacre à engendrer une néoformation osseuse pour pallier les manques en chirurgie orthopédique. Dès 1988, des tests de biocompatibilité de pièces de nacre ont été réalisés chez l'homme et ont démontré la parfaite innocuité de ce matériau (Camprasse et al. 1988). En 1992, la capacité d'induction de minéralisation de la nacre est démontrée *in vitro* dans plusieurs études (Lopez et al. 1992; Silve et al. 1992). Puis, de nombreux travaux se sont intéressés à la nacre provenant de différentes espèces d'huîtres perlières (*Pinctada maxima*, *P. fucata*, *P. radiata*, *P. margaritifera*). Différentes formes de nacre ont également été étudiées : blocs bruts, granules, poudres. Toutes ces études ont confirmé les potentiels ostéogénique, ostéoinducteur et ostéoconducteur de la nacre.

Enfin, plus récemment, les études se concentrent sur l'identification précise des molécules responsables des capacités ostéoinductives de la nacre. Pour cela, plusieurs techniques d'extraction des principes actifs de la nacre ont été testées. Toutes ces techniques sont des techniques douces qui n'endommagent pas la fraction minérale de la nacre. C'est donc les molécules présentes dans la fraction organique qui sont alors extraites. Plusieurs solvants ont été testés pour réaliser cette extraction. Tout d'abord, l'extraction de ces principes actifs a été réalisée en utilisant de l'eau. Cet extrait, appelé *Water Soluble Matrix* (WSM), a montré sa capacité à induire une augmentation de l'expression de certains marqueurs ostéoblastiques (Rousseau et al. 2003b, 2008). Un autre extrait a démontré des capacités ostéogéniques plus importantes que la WSM. Cet extrait, appelé *Ethanol Soluble Matrix* (ESM), est obtenu en utilisant l'éthanol comme solvant. Les études réalisées avec cet ESM démontrent la capacité de cet extrait à induire et restaurer la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse (Brion et al. 2015).

Cette revue présente différentes études qui démontrent la potentielle utilisation de la nacre et de ses composés en tant que substitut osseux.

III. RESULTATS

Chapitre 1. Étude des effets des principes actifs issus de la nacre (ESM) sur le potentiel angiogénique des cellules de la lignée endothéliale *in vitro*

1.1 Cellules endothéliales matures (HUVECs)

Les principes actifs issus de la nacre solubles dans l'éthanol (ESM) ont montré précédemment leur capacité à restaurer la minéralisation de la matrice extracellulaire d'ostéoblastes humains issus de patients arthrosiques (Brion et al. 2015). Cependant, leur effet sur les cellules de la lignée endothéliale et sur leur capacité angiogénique n'a, à ce jour, jamais été étudié.

Dans le cadre de cette étude, nous avons voulu étudier l'effet de ces principes actifs sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs).

Après isolement, les HUVECs sont cultivées dans un milieu spécifique des cellules endothéliales (*Endothelial Cell Growth Medium-2* (EGM-2) (milieu basal (*Endothelial Growth Basal Medium-2* (EBM-2)) supplémenté par différents adjuvants, notamment des facteurs de croissance, Lonza) pour amplification. Au premier passage, les cellules sont séparées et cultivées dans quatre conditions différentes pendant 14 jours : EGM-2 (témoin positif), EBM-2 (milieu basal sans facteurs de croissance, témoin négatif), EBM-2 supplémenté avec 100µg/mL d'ESM et EBM-2 supplémenté avec 200µg/mL d'ESM (appelées ensuite respectivement EGM, EBM, EBM100 et EBM200). Les répercussions du traitement par ESM sur l'expression génique et protéique des HUVECs ont été estimées respectivement par qRT-PCR et western blot. La fonctionnalité des cellules a été évaluée *via* la réalisation d'un test d'angiogenèse *in vitro*. Nous avons également étudié les capacités de migration et de recrutement des cellules en s'intéressant à leur capacité à sécréter dans le milieu extracellulaire

des protéines permettant la migration (MMP-9 et MMP-2) et le recrutement de péricytes (PDGF-BB), ainsi que la sécrétion par les cellules de monoxyde d'azote (NO) responsable de la vasodilatation vasculaire. Au travers de cette étude, nous avons comparé si l'ajout des principes actifs issus de la nacre dans un milieu basal de culture des cellules endothéliales (EBM) permettait d'obtenir des effets comparables à ceux obtenus avec le milieu de référence (milieu basal enrichi en facteurs de croissance). Ce qui permettrait de s'affranchir de l'utilisation de ces derniers.

L'étude de l'influence de l'ESM sur l'expression génique des HUVECs est représentée dans la figure 5. Il n'a pas été montré de différences significatives d'expression pour les marqueurs endothéliaux PECAM-1, Tie2 et VE-cadhérine. Une diminution significative de l'expression de vWF a été mise en évidence pour les cellules cultivées en présence d'EBM-2 (milieu dépourvu de facteurs de croissance) par rapport aux cellules cultivées en présence d'EGM-2. Cette diminution n'est pas retrouvée lorsque les principes actifs issus de la nacre ont été ajoutés au milieu EBM-2. En revanche, nous avons observé une chute importante de l'expression du marqueur endothélial KDR lorsque les cellules ne sont plus cultivées avec du milieu EGM-2.

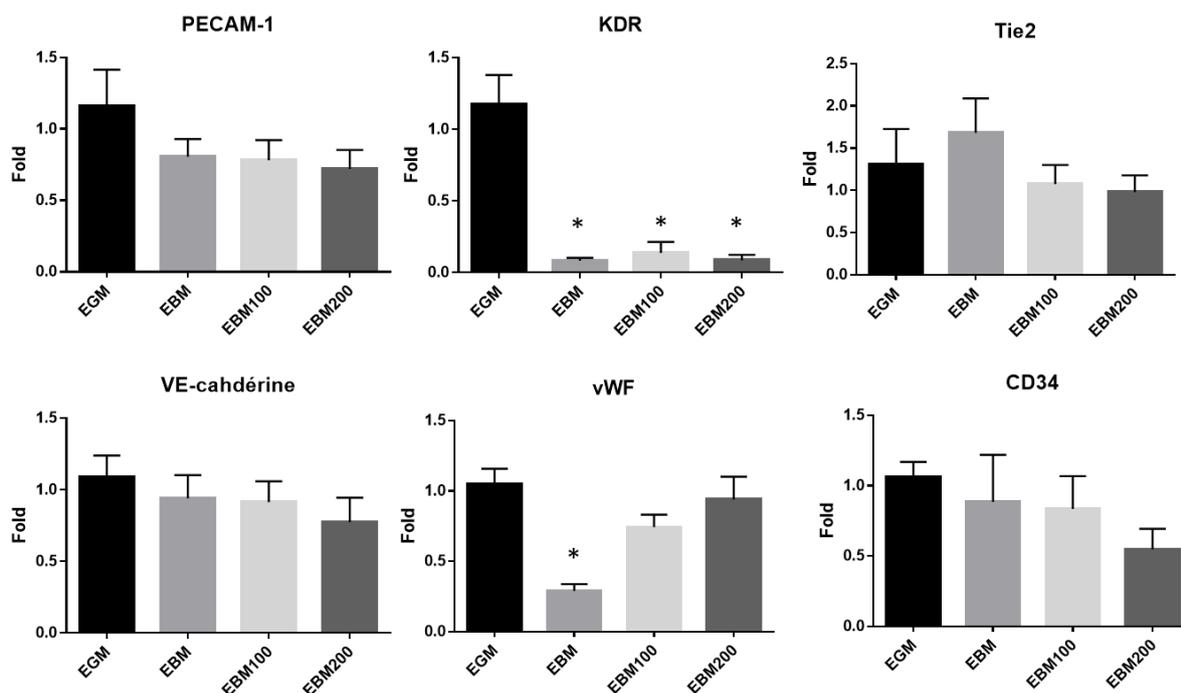


Figure 5 : Mesure de l'expression des différents transcrits codant pour PECAM-1, KDR, Tie2, CD144, vWF et CD34 par qPCR.

Les cellules sont cultivées pendant 14 jours dans 4 conditions différentes : EGM : HUVECs cultivées dans du milieu EGM-2 ; EBM : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 ; EBM100 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 100 μ g/mL d'ESM ; EBM200 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 200 μ g/mL d'ESM

L'axe des ordonnées représente l'expression relative du transcrit par rapport à la quantité présente dans le contrôle (EGM). Les données sont normalisées par rapport au gène de référence RP29 (+/- SEM).

Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants.

* représente une différence statistiquement significative avec $p < 0,05$, versus EGM.

L'expression de protéines spécifiques du phénotype endothélial a été étudiée et les résultats sont présentés figure 6. Les protéines VE-cadhérine, PECAM-1 et VEGFR-2 ont été détectée dans toutes les conditions de culture. L'analyse densitométrique des bandes obtenues a été réalisée et n'a pas montré de différences.

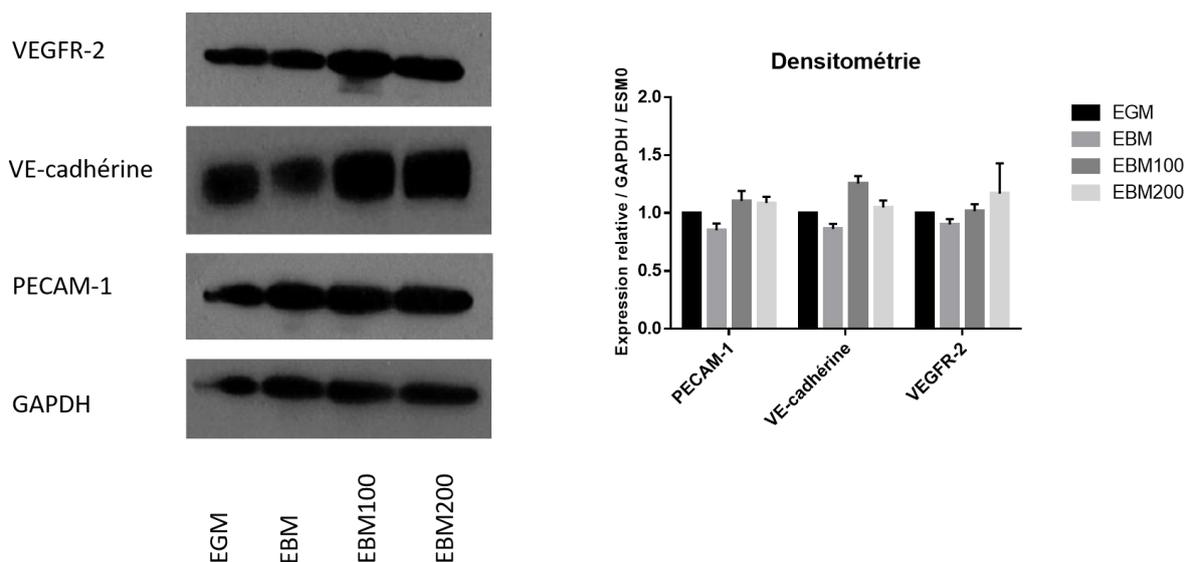


Figure 6 : Etude de l'expression protéique des différentes protéines endothéliales (VEGFR-2, PECAM-1 et VE-cadhérine) par Western blot.

Les cellules sont cultivées pendant 14 jours dans 4 conditions différentes : EGM : HUVECs cultivées dans du milieu EGM-2 ; EBM : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 ; EBM100 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 100µg/mL d'ESM ; EBM200 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 200µg/mL d'ESM

Les données sont normalisées par rapport à la protéine de référence GAPDH (+/- SEM) vs EGM.

Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants.

* représente une différence statistiquement significative avec $p < 0,05$, versus EGM

La capacité des cellules à former des structures pseudo-vasculaires *in vitro* a été étudiée par la réalisation d'un test d'angiogenèse *in vitro*. Dans un puits de culture contenant un gel composé de protéines de la matrice extracellulaire (ECM gel, ScienCell), 10^3 ont été déposées. Ce gel va permettre aux cellules d'adhérer et de former des structures pseudo-vasculaires. Après 4h de culture sur ce gel, une analyse des images obtenues a permis de mettre en évidence un nombre de segments et de jonctions inchangé en présence des principes actifs issus de la nacre par rapport à la condition contrôle, contrairement aux cellules cultivées en présence d'EBM-2 sans ESM, où ces deux paramètres étaient diminués (Figure 7). La longueur des segments semble quant à elle légèrement diminuée en présence de milieu EBM-2 avec ou sans ESM. L'ajout d'ESM a donc permis d'obtenir une formation de structures pseudo-vasculaires quasiment comparable à celle obtenue en présence de facteurs de croissance.

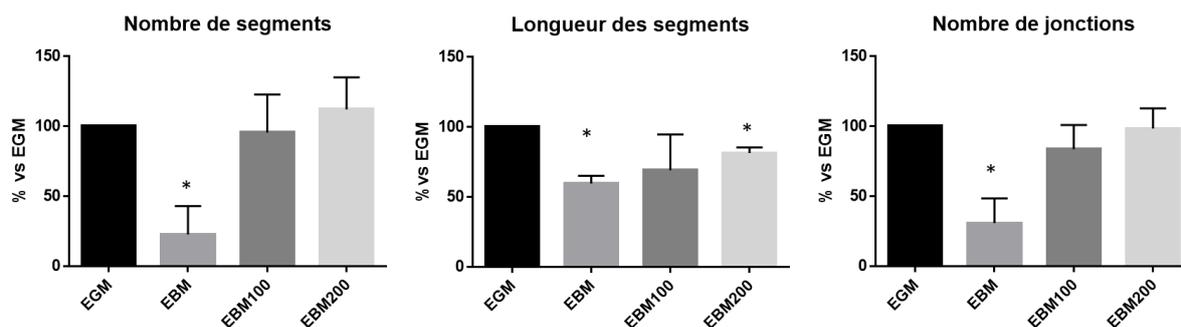


Figure 7 : Comparaison du nombre et de la longueur des segments et du nombre de jonctions après 4h d'incubation

EGM : HUVECs cultivées dans du milieu EGM-2 ; EBM : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 ; EBM100 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 100µg/mL d'ESM ; EBM200 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 200µg/mL d'ESM

Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants. Les résultats sont exprimés en % +/- SEM vs EGM.

* représente une différence statistiquement significative avec $p < 0,05$

Les capacités sécrétrices des HUVECs ont été étudiées par *enzyme linked immusorbent assay* (ELISA). Nous avons quantifié la présence au sein du surnageant de culture des protéines MMP-9 et MMP-2, impliquées dans la migration cellulaire, et PDGF-BB, impliquée dans le recrutement des péricytes qui vont participer à la stabilisation du mur vasculaire. Les résultats présentés figure 8, ne montrent aucune différence entre les différentes conditions étudiées.

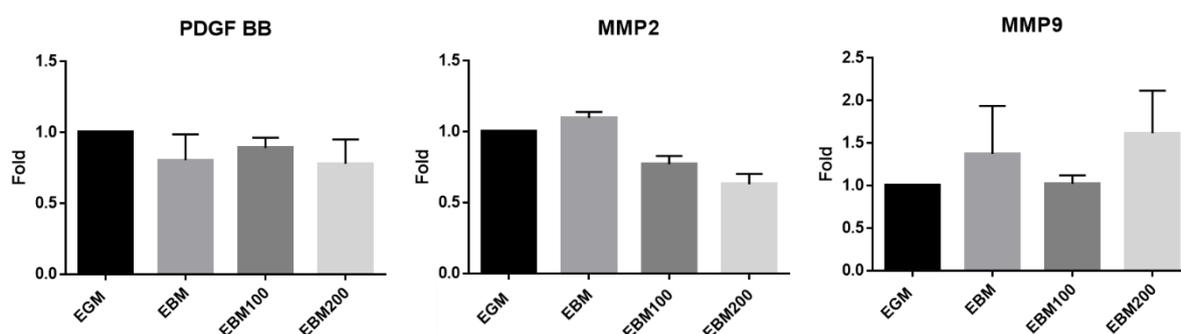


Figure 8 : Comparaison de la quantité de PDGF-BB, MMP-2 et MMP-9 synthétisées mesurée par ELISA

EGM : HUVECs cultivées dans du milieu EGM-2 ; EBM : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 ; EBM100 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 100µg/mL d'ESM ; EBM200 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 200µg/mL d'ESM.

Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants. Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM.

Afin de maintenir le tonus vasculaire, les CE_s secrètent du monoxyde d'azote (NO) qui va engendrer une vasodilatation des vaisseaux *via* un relâchement des cellules musculaires lisses de la média. Nous avons donc étudié la présence de NO au sein du surnageant des cellules. Les résultats obtenus sont présentés figure 9 et ne montrent aucune différence entre les différentes conditions étudiées.

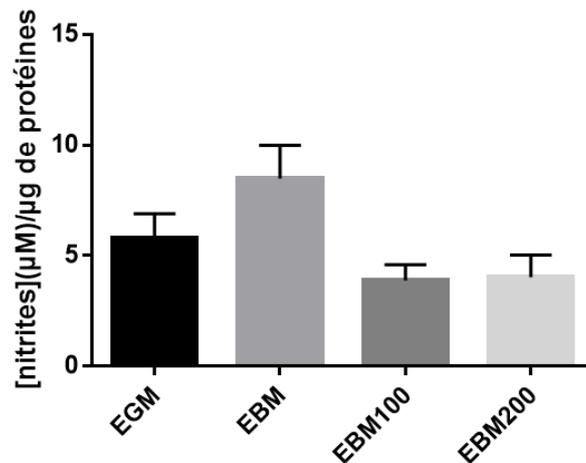


Figure 9 : Dosage des ions nitrites présents dans le surnageant des cellules cultivées en présence ou non d'ESM pendant 14 jours.

Les cellules sont incubées pendant 30min avec le réactif de Griess.

L'axe des ordonnées correspond aux nitrite en µM pour 1µg de protéines.

EGM : HUVECs cultivées dans du milieu EGM-2 ; EBM : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 ;

EBM100 : HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 100µg/mL d'ESM ; EBM200 :

HUVECs cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté avec 200µg/mL d'ESM.

Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants. Les résultats sont exprimés +/- SEM vs EGM.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré un effet des principes actifs issus de la nacre solubles dans l'éthanol (ESM) quasiment similaire à celui obtenu en présence du milieu classique de culture riche en facteurs de croissance.

1. 2 Cellules progénitrices endothéliales (CPEs)

Publication n° 2

ANGIOGENESIS

Résumé en français

The effect of nacre extracts on cord blood-derived endothelial progenitor cells: a natural stimulus to promote angiogenesis?

L'effet des principes actifs issus de la nacre sur les cellules progénitrices endothéliales isolées à partir de sang de cordon : un stimulus naturel pour « booster » l'angiogenèse ?

Anne-Sophie Willemin, Ganggang Zhang, Emilie Velot, Arnaud Bianchi, Véronique Decot, Marthe Rousseau, Pierre Gillet, Vanessa Moby

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de ces principes actifs issus de la nacre solubles dans l'éthanol (ESM) sur des cellules progénitrices endothéliales (CPEs), cellules capables de recréer un réseau vasculaire à partir d'un réseau pré-existant.

Pour cela, après avoir été extraites du sang de cordon ombilical, les CPEs ont été cultivées en présence du milieu traditionnel de culture de cellules endothéliales (EGM-2, Lonza) auquel ont été ajouté des principes actifs issus de la nacre à différentes concentrations (100 ou 200µg/ml). Nous avons étudié l'effet de cet ESM sur l'expression génique et protéique, sur la fonctionnalité et sur les capacités sécrétrices des cellules.

Les résultats obtenus ont montré que l'expression des transcrits codant pour les marqueurs endothéliaux PECAM-1, VE-cadhérine et vWF était augmentée en présence des principes actifs issus de la nacre à la concentration de 200µg/mL. L'expression des transcrits codant pour Tie2 et KDR était quant à elle inchangée. L'étude de l'expression protéique des cellules n'a

pas montré de variation en absence et en présence de l'ESM. Les capacités sécrétrices des CPEs ne semblent pas être modifiées par la présence des principes actifs issus de la nacre. En revanche, les principes actifs issus de la nacre à la concentration de 200 μ g/mL semblent augmenter la fonctionnalité des cellules.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'effet pro-angiogénique des principes actifs issus de la nacre soluble dans l'éthanol notamment à la concentration de 200 μ g/mL et donc rend envisageable leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse comme stimulus de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse.

Chapitre 2. Étude des effets des principes actifs issus de la nacre (ESM) sur la différenciation ostéogénique des CSMs

2.1 Études *in vitro*

Après extraction à partir de moelle osseuse de patients arthrosiques, les CSMs sont cultivées dans un milieu de base pour amplification durant 2 passages (DMEM, Gibco). Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu de différenciation (DMEM avec 40 μ g/mL de proline, 50 μ g/mL d'acide ascorbique et 100nM de dexaméthasone) supplémenté en principes actifs issus de la nacre à différentes concentrations, 0, 100 et 200 μ g/mL de milieu (appelées respectivement ESM0, ESM100 et ESM200). Enfin, les cellules sont trypsinées puis cultivées sous forme tridimensionnelle (culture sphéroïde) dans les mêmes conditions que précédemment (figure 10).

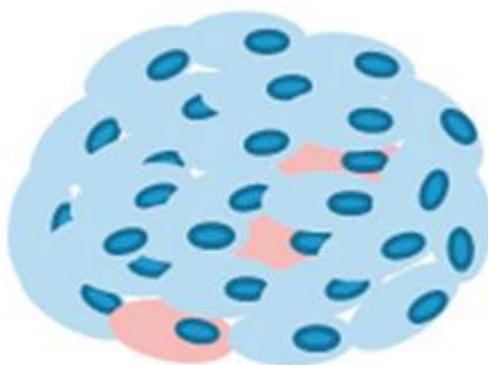


Figure 10 : Culture sphéroïde de cellules souches mésenchymateuses (d'après Fennema et al., 2013)

Les cellules sont cultivées pendant 21 jours puis des échantillons d'ARN sont récupérés à J1, J7, J14 et J21 (jour 1, 7, 14 et 21) afin d'étudier l'expression génique.

L'étude de l'expression génique a montré une absence des marqueurs spécifiques du phénotype osseux (ostéopontine et ostéocalcine) (résultats non présentés). Nous avons mis en évidence la stimulation de l'expression de RunX2 et de Collagène X à J21 en présence d'ESM100. D'autre part, nous avons également montré une stimulation de l'expression de Sox9 et Aggrecan à J21 en présence d'ESM100 (Figure 11).

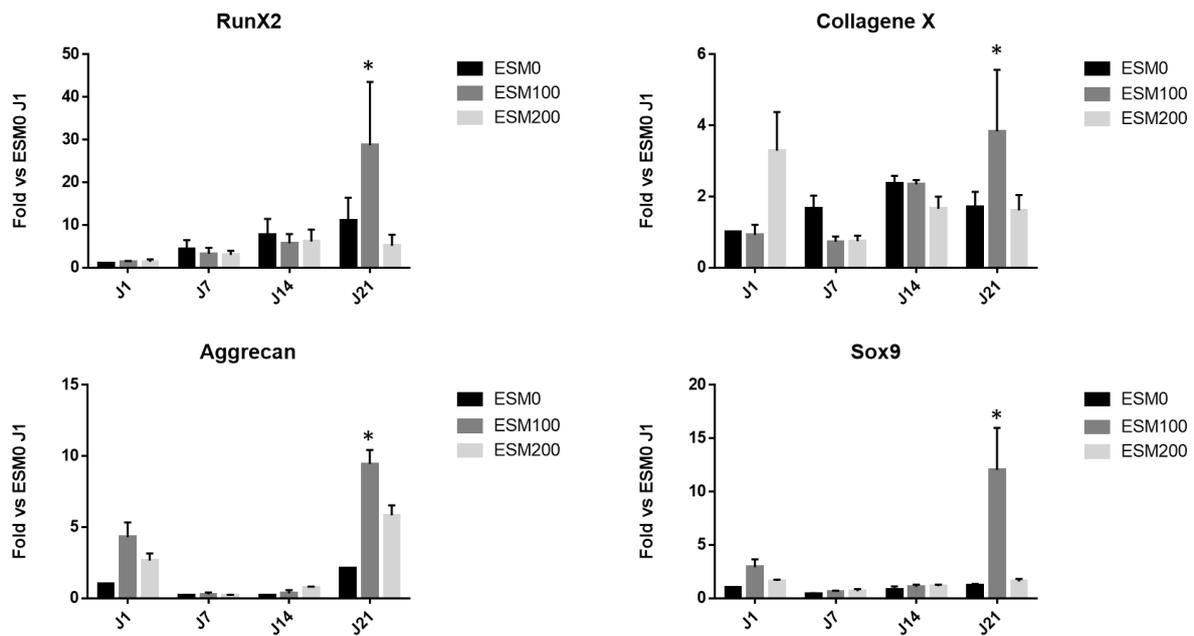


Figure 11 : Mesure de l'expression des différents transcrits codant pour RunX2, Collagène X, Aggrecan et Sox9 par qPCR

ESM0 : condition de culture témoin ; ESM100 : CSM cultivées dans du milieu supplémenté avec 100µg/mL d'ESM ; ESM200 : CSM cultivées dans du milieu supplémenté avec 200µg/mL d'ESM

L'axe des ordonnées représente l'expression relative du transcrit par rapport à la quantité présente dans le contrôle (ESM0). Les données sont normalisées par rapport au gène de référence RP29 (+/- SEM). Les manipulations ont été réalisées sur trois échantillons de cellules indépendants.

* représente une différence statistiquement significative avec $p < 0,05$, versus ESM0.

Les résultats suggèrent la présence au sein des sphéroïdes de deux populations cellulaires : des cellules exprimant des marqueurs de chondrocytes hypertrophiques (Collagène X et RunX2) et des cellules exprimant des marqueurs chondrocytaires (Sox9 et Aggrecan). Notre hypothèse repose sur différents niveaux de différenciation des cellules au sein des sphéroïdes : le centre du sphéroïde, en condition plus hypoxique, présenterait une différenciation chondrocytaire, et la périphérie, en présence d'oxygène, se dirigerait vers un phénotype de chondrocyte

hypertrophique, étape précédant la différenciation ostéoblastique dans l'ossification endochondrale (Aghaloo and Hadaya 2017; Wong et al. 2018).

Ces résultats sont en corrélation avec les résultats précédemment obtenus au sein de notre équipe (Flausse et al. 2013) . En effet, le transcrit ostéopontine était absent et il a été mis en évidence un pic de Collagène X à J21 en présence de poudre de nacre à 1%.

2. 2 Développement d'une nouvelle méthode d'identification des composés ostéogéniques présents dans l'ESM

Publication n° 3

Journal of structural biology

Résumé en français

A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre Ethanol Soluble Matrix

Une nouvelle méthode de séparation et de purification des composés ostéogéniques présents dans les principes actifs de la nacre solubles dans l'éthanol

Ganggang Zhang, Anne-Sophie Willemin, Alice Brion, Marie-Hélène Piet, Vanessa Moby, Aranud Bianchi, Didier Mainard, Laurent Galois, Pierre Gillet, Marthe Rousseau

Dans cette étude, nous avons développé une méthode de purification de l'ESM afin d'en isoler les composés ostéoinducteurs.

Pour cela, nous avons tout d'abord extrait l'ESM comme développé précédemment (chapitre 1) à partir de poudre de nacre de l'huître perlière *P. margaritifera*. Nous avons ensuite séparé, grâce à des résines échangeuses de cations ou d'anions, les fractions anioniques et cationiques (afin d'obtenir respectivement ESMA et ESMc) ainsi qu'une fraction, appelée ESME, contenant les cations fixés sur la résine échangeuse de cation après avoir obtenu ESMA. Ces fractions ont

ensuite été mises en contact avec des ostéoblastes issus de patients arthrosiques et des pré-ostéoblastes d'origine murine (MC3T3) pour une durée de 21 jours. La minéralisation a été estimée grâce à une coloration au rouge alizarin. Les résultats de la coloration ont montré que, parmi les fractions extraites à partir de l'ESM, la fraction ESMc, dépourvue d'anion, stimulait le plus la minéralisation des deux types cellulaires étudiés. Cette stimulation de la minéralisation était cependant inférieure à l'ESM. Nous avons également testé l'effet sur la minéralisation de l'association des fractions ESMA et ESMc afin de mettre en évidence si l'action de l'ESM était due uniquement aux ions qu'il contient. La coloration au rouge alizarin a montré une minéralisation inférieure en présence d'ESMA et d'ESMc qu'en présence d'ESMc seul.

Comme indiqué précédemment, l'extraction de la WSM est un procédé doux qui n'entraîne pas de décalcification de la nacre. Cependant, l'effet de l'extraction de l'ESM sur la nacre n'a jamais été étudié. Pour cela, nous avons effectué des observations en microscopie électronique à balayage de la poudre de nacre avant et après le processus d'extraction. Les images obtenues ont mis en évidence une conservation de la structure « briques et mortier ». La surface des briques ainsi que la matrice organique semblent quant à elles être légèrement modifiées, suggérant que l'action de l'éthanol s'effectue uniquement sur les parties exposées de la poudre de nacre. Ces résultats montrent alors que l'extraction utilisant l'éthanol comme solvant est un procédé modéré n'entraînant pas de modification du cristal et donc sans décalcification.

Grâce à ces travaux, nous avons pu mettre au point une technique de séparation et de purification de l'ESM permettant d'obtenir une fraction cationique possédant des propriétés ostéogéniques.

Chapitre 3. Étude des effets stimulateurs des vésicules extracellulaires nanométriques sécrétées par les cellules souches mésenchymateuses *in vitro* sur les cellules de la lignée endothéliale

3. 1 Cellules endothéliales matures (HUVECs)

Publication n° 4

Bio-Medical Materials and Engineering

Résumé en français

Evaluation of the pro-angiogenic effect of nanoscale extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells

Evaluation de l'effet pro-angiogénique des vésicules extracellulaires de taille nanométrique issues de cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical humain

Gabriel Dostert*, Anne-Sophie Willemin*, Valérie Jouan-Hureaux, Huguette Louis, Sébastien Hupont, Pierre Gillet, Patrick Menu, Véronique Decot, Vanessa Moby, Emilie Velot

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet des vésicules extracellulaires de taille nanométrique (nEVs) sur la fonction de cellules endothéliales matures.

Pour cela, nous avons cultivé des CSMs issues de gelée de Wharton dans un milieu dépourvu de nEVs pendant 48h afin de ne récupérer dans ce milieu que les nEVs sécrétées par les CSMs. Nous avons ensuite isolé de ce milieu conditionné les nEVs en réalisant une série d'ultracentrifugations. Les nEVs ainsi obtenues ont ensuite été caractérisées afin de s'assurer

de la conformité de notre échantillon. D'autre part, nous avons extrait à partir de cordons ombilicaux humains des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs). Les HUVECs ont ensuite été mises en contact avec les nEVs à différentes concentrations (10^9 et 10^{10} nEV/mL). Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux interactions HUVECs-nEVs puis nous avons étudié l'effet des nEVs sur la fonctionnalité des HUVECs.

Pour commencer, nous avons validé la composition en nEVs de l'échantillon obtenu, par Nanosight® pour la taille (115 +/- 14 nm), et par cytométrie en flux pour la présence des marqueurs membranaires spécifiques. Ensuite, afin de mettre en évidence les interactions HUVECs-nEVs, nous avons utilisé des marqueurs fluorescents (PKH67 pour les nEVs et To-Pro-3® pour les noyaux des HUVECs). Après observation en microscopie confocale, nous avons pu montrer l'internalisation des nEVs dans le cytoplasme des cellules après 24h de mise en contact. Enfin, nous avons étudié l'effet des nEVs sur la fonctionnalité des cellules. Pour cela, un test d'angiogenèse *in vitro* a été réalisé. Après 4h, une augmentation de la fonctionnalité des HUVECs en présence de 10^9 nEV/mL a été observée. En effet, après analyse des images obtenues, il a été mis en évidence un nombre de nœuds plus important en présence des nEVs à la concentration la plus faible par rapport aux cellules cultivées sans nEVs. Les nœuds correspondent à la jonction de plus de trois structures pseudo-vasculaires.

Cette étude a donc montré que les vésicules extracellulaires de taille nanométrique étaient capables de produire un effet bénéfique sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.

3. 2 Cellules progénitrices endothéliales

Afin d'étudier l'effet paracrine potentiel des CSMs sur les CPEs, nous avons cultivé des CPEs issues de sang de cordon en présence de différentes fractions de sécrétions issues de la culture des CSMs.

Tout d'abord, nous avons caractérisé les échantillons supposés contenir les nEVs afin de s'assurer de leur réelle composition en nEVs. La caractérisation des échantillons est effectuée par une analyse de la taille et de la morphologie (par Nanosight®) dans un premier temps, puis par un contrôle de la présence des marqueurs spécifiques des nEVs dans un second temps (par cytométrie en flux et western blot).

Le milieu conditionné est obtenu après culture pendant 48h de CSMs de gelée de Wharton dans du milieu dépourvu de nEVs. Après une série d'ultracentrifugations du milieu conditionné de CSMs, les nEVs sont isolées puis caractérisées par la taille et la présence à leur surface de marqueurs spécifiques.

Caractérisation des nEVs

L'analyse de la taille et de la morphologie des particules présentes dans notre échantillon par Nanosight® montrent la présence d'une population de nanoparticules hétérogènes (figure 12). La population majoritaire de l'échantillon présente une taille comprise entre 30 et 150 nm qui correspond à la taille des nEVs.

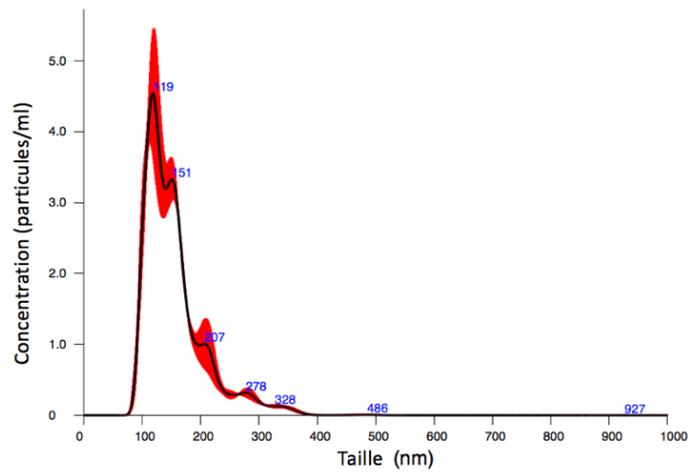


Figure 12 : Représentation graphique de la mesure des particules par Nanosight®

L'expression des marqueurs membranaires spécifiques des nEVs, CD9, CD63, CD81 et CD82, a été recherchée par cytométrie en flux. La figure 13 représente les résultats obtenus. Ces résultats révèlent la présence d'une population exprimant les marqueurs CD9 (86%), CD63 (88%), CD81 (85%) et CD82 (86%). La recherche de la présence des marqueurs protéiques présents à l'intérieur des nEVs a été réalisée par western blot (figure 14). Les protéines ALIX et TSG101 ont été détectées au sein de notre échantillon.

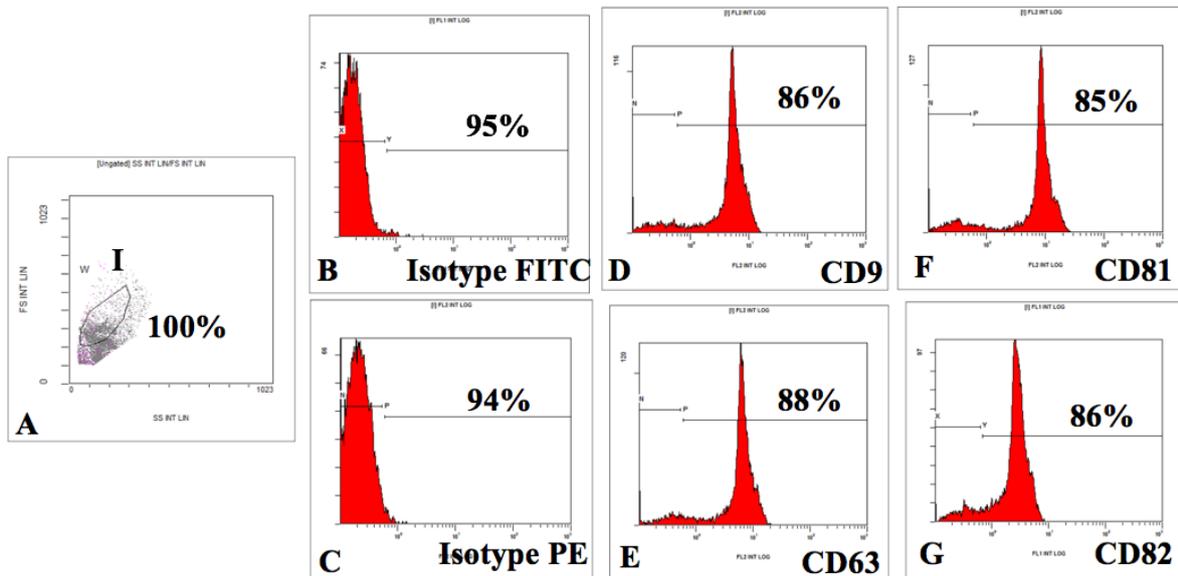


Figure 13 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaires des nEVs. (A) représente la répartition de la population totale contenue dans l'échantillon. La zone I représente la zone d'intérêt composée de nanoparticules fixées sur des billes en latex. (B) représente le contrôle isotypique FITC. (C) représente le contrôle isotypique PE. (D) représente l'expression du marqueur CD9. (E) représente l'expression du marqueur CD63. (F) représente l'expression du marqueur CD81. (G) représente l'expression du marqueur CD82.

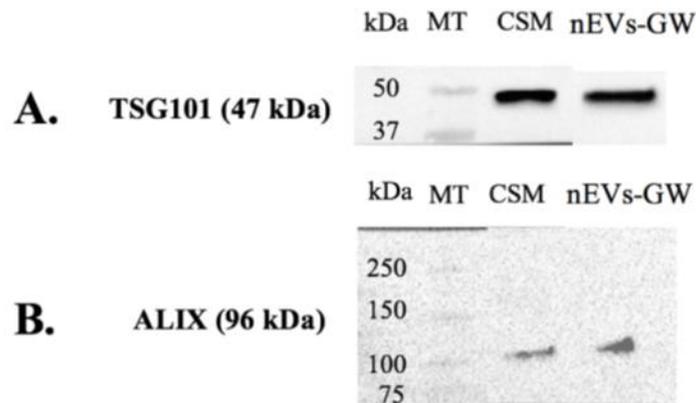


Figure 14 : Western Blot représentant la présence de TSG101 (47 kDa) en A et d'ALIX (96 kDa) en B. La première bande représente le contrôle par des protéines provenant de CSM-GW. La deuxième bande représente l'expression des protéines provenant des nanovésicules extracellulaires. MT : marqueur de taille ; CSM : cellule souche mésenchymateuse ; nEVs-GW : nanovésicules extracellulaires de gelée de Wharton.

Tous ces résultats combinés nous permettent de nous assurer de la réelle composition en nEV de notre échantillon. Après caractérisation, ces vésicules extracellulaires de taille nanométrique ont ensuite été mises en contact avec des CPEs cultivées dans six conditions différentes : en présence d'EGM-2 supplémené avec 2% de SVF (milieu traditionnel de culture des CPEs), en présence de milieu EGM-2 supplémené avec 2% de SVF dépourvu de nEVs (noté EGM EF), en présence d'un milieu composé à 50% d'EGM EF et à 50% de milieu conditionné issu de CSMs de gelée de Wharton et en présence de milieu EGM EF supplémené avec 10^8 , 10^9 ou 10^{10} nEVs/mL.

Evaluation de la cytotoxicité cellulaire

Tout d'abord, nous avons étudié la toxicité engendrée par les différentes conditions de culture sur les CPEs. Pour cela, nous avons réalisé un dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture. Dans des conditions physiologiques, cette enzyme se trouve dans le cytoplasme des cellules. En cas de mort cellulaire, cette LDH va s'échapper par les pores qui vont se former dans la membrane plasmique et se retrouver alors dans le milieu extracellulaire.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15 et ne montre pas de toxicité hormis pour les CPEs cultivées en présence de milieu composé d'EGM EF et de milieu conditionné.

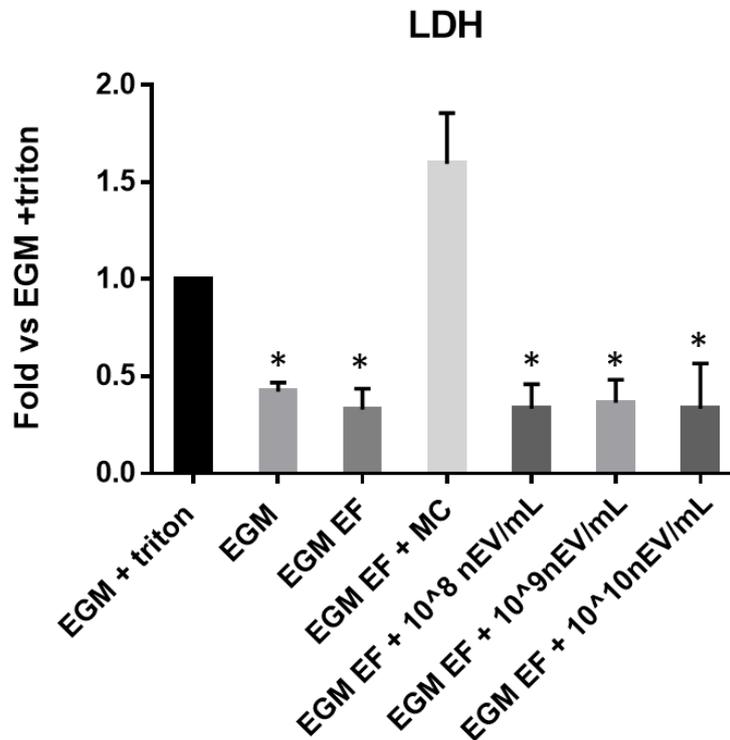


Figure 15 : Dosage de lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire des CPEs cultivées dans six conditions différentes en présence d'EGM-2 + 2%SVF, d'EGM-2 + 2%SVF sans nEVs (EGM EF), de 50% EGM EF/50% milieu conditionné de CSM-GW (noté EGM EF + MC), d'EGM EF additionné de 10⁸/ 10⁹/ 10¹⁰ nEV/mL.

* : p < 0,05 sont significatifs par rapport à EGM+triton (contrôle positif) (ANOVA suivi d'Holm Sidak)
 Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM+triton
 Les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons de cellules indépendants.

Evaluation de l'activité métabolique

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité métabolique des cellules au cours du temps.

Nous avons effectué un test de MTT. Ce test met en évidence l'activité des mitochondries présentes dans la cellule. Les résultats ne montrent pas de différence entre les différentes conditions étudiées (figure 16).

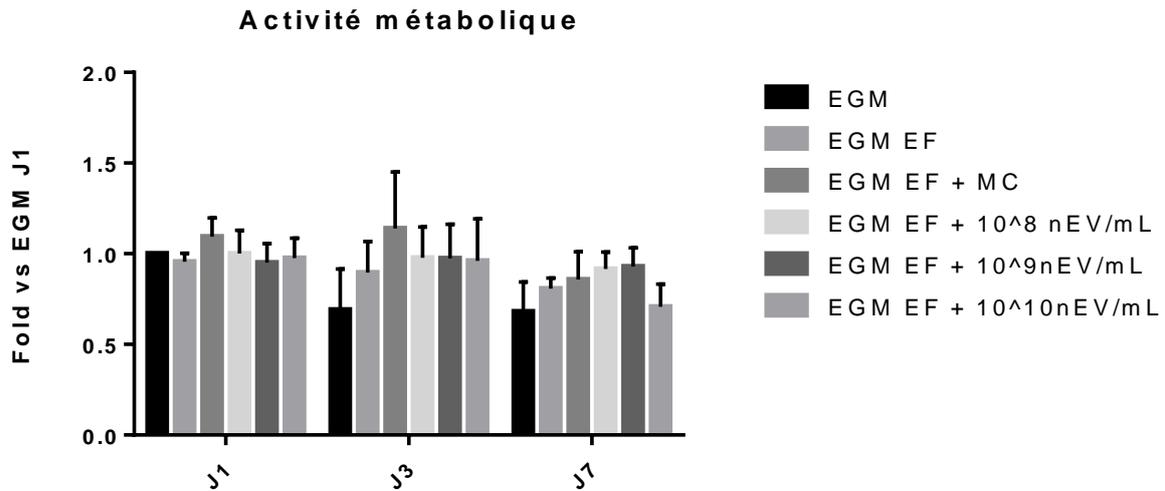


Figure 16 : Evaluation de l'activité métabolique des CPEs à J1, J3, J7, cultivées dans six conditions différentes en présence d'EGM-2 + 2%SVF, d'EGM-2 + 2%SVF sans nEVs (EGM EF), de 50% EGM EF/50% milieu conditionné de CSM-GW (noté EGM EF + MC), d'EGM EF additionné de 10⁸/ 10⁹/ 10¹⁰ nEV/mL.

* : $p < 0,05$ sont significatifs par rapport à EGM (contrôle) (ANOVA suivi d'Holm Sidak)

Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM.

Les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons de cellules indépendants.

Nous avons également étudié l'expression de marqueurs spécifiques du phénotype endothélial.

Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux

PECAM-1, VE-cadhérine, Tie2, vWF, et KDR pour les CPEs cultivées en présence d'un milieu

composé à 50% d'EGM-2 EF et à 50% de milieu conditionné de CSMs. Une augmentation de

l'expression de ces mêmes marqueurs a été observée en présence des vésicules extracellulaires

de taille nanométrique notamment à la concentration de 10⁹ et 10¹⁰ nEV/mL (figure 17).

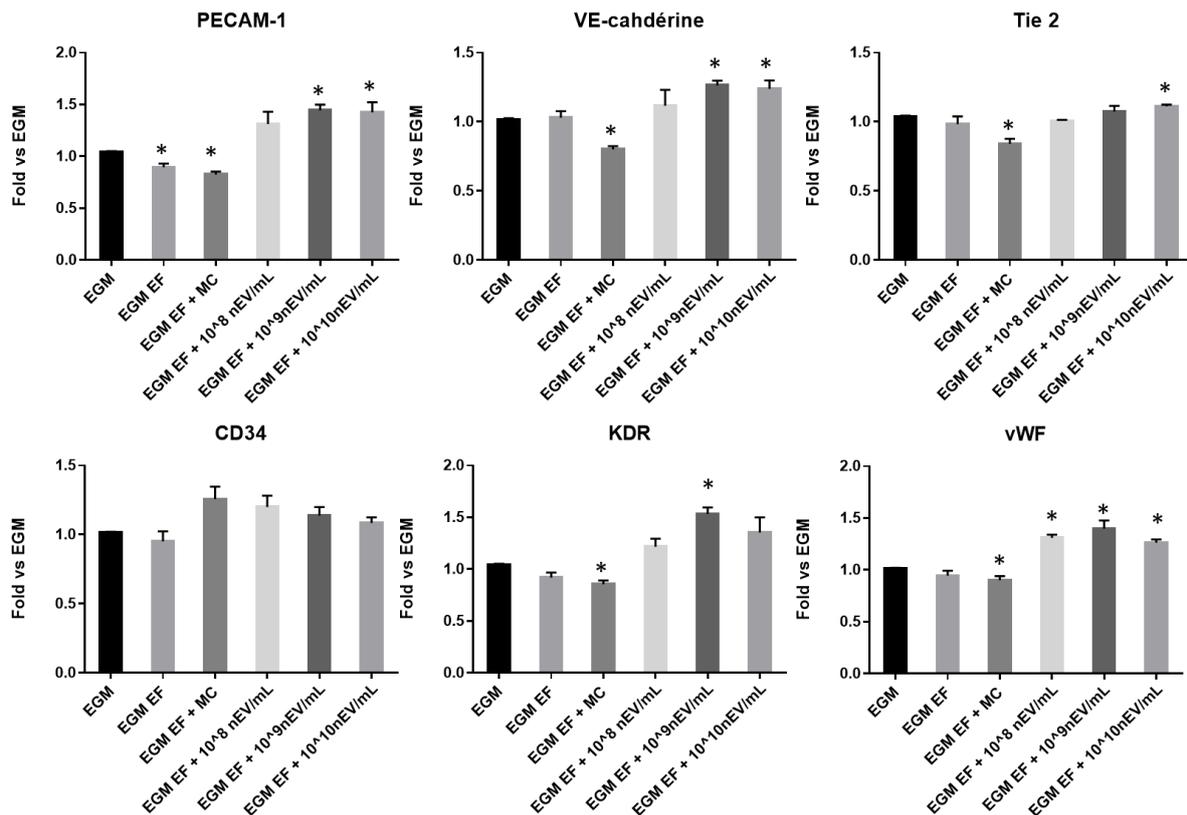


Figure 17 : Etude de l'expression des transcrits codant pour PECAM-1, VE-cadhérine, Tie2, CD34, KDR et vWF. Contrôle : EGM-2 supplémenté avec 2% de SVF.

L'axe des ordonnées représente l'expression relative du transcrit par rapport à la quantité présente dans le contrôle. Les données sont normalisées grâce au gène de référence RP29 après stimulation avec les différents milieux de culture : EGM-2 supplémenté avec 2% de SVF dépourvu de nanovésicules extracellulaires (nEVs) (noté EGM EF), milieu composé à 50% d'EGM EF et à 50% de milieu conditionné issu de CSMs de gelée de Wharton (noté EGM EF + MC), EGM EF additionné de 10⁸/ 10⁹/ 10¹⁰ nEV/mL.

* : $p < 0,05$ sont significatifs par rapport à EGM (contrôle) (ANOVA suivi d'Holm Sidak)

Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM.

Les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons de cellules indépendants.

La présence au sein des cellules des protéines spécifiques du phénotype endothélial a été étudiée. Les protéines PECAM-1, VE-cadhérine et VEGFR-2 ont toutes les trois été retrouvées au sein des cellules et ce de manière équivalentes quelles que soit la condition (figure 18).

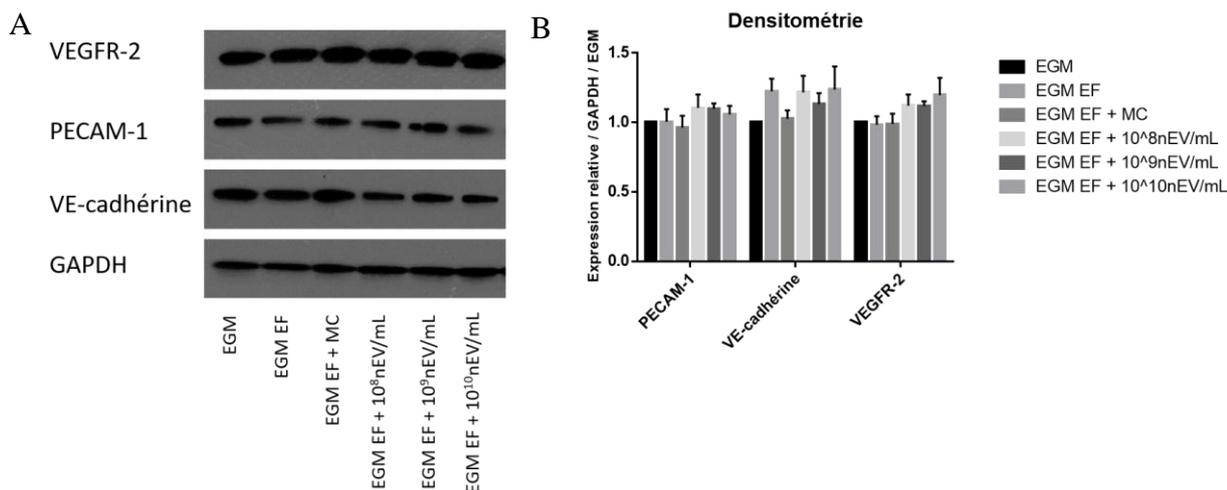


Figure 18 : Etude de l'expression protéique : analyse des western-blots réalisés sur des protéines de CPEs après stimulation avec les différents milieux de culture. EGM-2 supplémenté avec 2% de SVF, EGM-2 supplémenté avec 2% de SVF dépourvu de nanovésicules extracellulaires (nEVs) (noté EGM EF), milieu composé à 50% d'EGM EF et à 50% de milieu conditionné issu de CSMs de gelée de Wharton (noté EGM EF + MC), EGM EF additionné de 10^8 / 10^9 / 10^{10} nEV/mL. A. Image représentative des films de western pour VEGFR-2, PECAM-1, VE-cadhérine, GAPDH, B : Analyse densitométrique de l'expression des protéines rapportées à la protéine de référence GAPDH. L'axe des ordonnées représente l'expression relative de la protéine par rapport à la quantité présente dans la condition EGM. Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM.

* : $p < 0,05$ sont significatifs par rapport à EGM (contrôle) (ANOVA suivi d'Holm Sidak)
 Les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons de cellules indépendants.

Nous avons étudié l'effet des différentes conditions de culture sur la fonctionnalité des CPEs (figure 19). Pour cela, nous avons réalisé un test d'angiogenèse *in vitro* qui permet de mettre en évidence la capacité des cellules à former des structures pseudo-vasculaires lorsqu'elles sontensemencées sur une matrice extracellulaire. 8h après ensemencement sur la matrice, nous avons pu mettre en évidence la présence de structure pseudo-vasculaires quelques soit la condition de culture. Une analyse plus poussée des images obtenues à l'aide du logiciel ImageJ a mis en évidence une augmentation du nombre de jonctions et de segments ainsi que de la longueur de ces segments en présence de milieu dépourvu de nEVs (EGM EF). Une augmentation significative du nombre de jonctions et de la longueur des segments est également retrouvée en présence de nEVs et ce quelle que soit leur concentration.

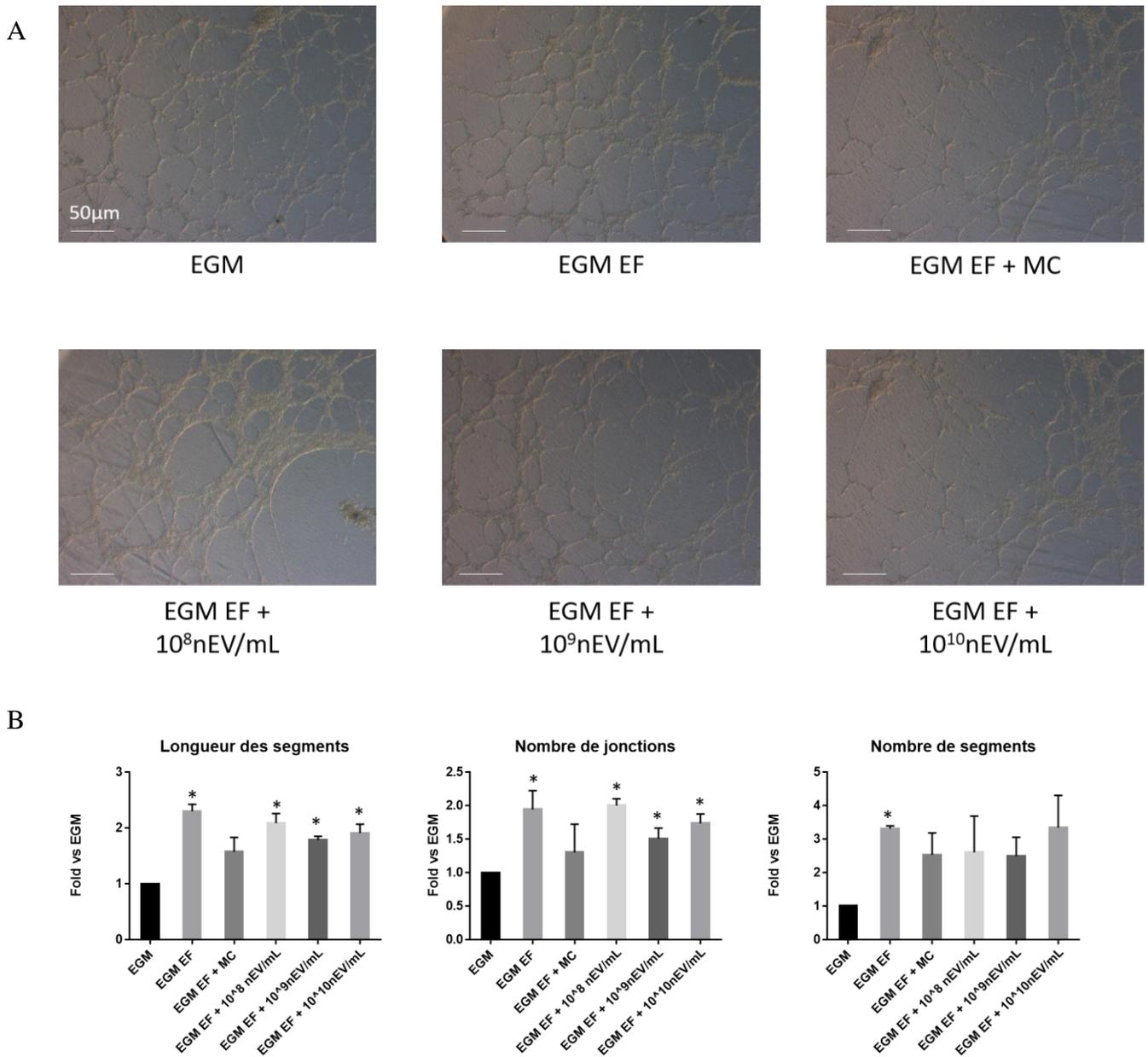


Figure 19 : Test d'angiogenèse *in vitro*. A. photographies en contraste de phase des puits lors d'un test d'angiogenèse sur des cellules progénitrices endothéliales issues de sang de cordon cultivées pendant 8 heures dans 6 conditions différentes : EGM-2 +2%SVF (condition contrôle), EGM-2 supplémenté avec 2% de SVF dépourvu de nanovésicules extracellulaires (nEVs) (noté EGM EF), milieu composé à 50% d'EGM EF et à 50% de milieu conditionné issu de CSMs de gelée de Wharton (noté EGM EF + MC), EGM EF additionné de 10⁸/ 10⁹/ 10¹⁰ nEV/mL.

B. analyse du nombre de jonctions et segments ainsi que la longueur des segments (Image J, Spiller et al, Biomaterials, 2014).

Les résultats sont exprimés en fold +/- SEM vs EGM.

* : p < 0,05 sont significatifs par rapport à EGM (contrôle) (ANOVA suivi d'Holm Sidak)

Les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons de cellules indépendants.

Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence un effet bénéfique des nEVs sur le phénotype et sur la fonctionnalité des CPEs. Ces résultats sont en corrélation avec les résultats précédemment obtenus sur les HUVECs (Dostert et al. 2017b).

Chapitre 4. Étude des effets *in vitro* de vésicules de taille nanométrique issues d'agroressources sur les cellules progénitrices endothéliales et les cellules souches mésenchymateuses.

Afin de diminuer la quantité de principes actifs utilisés, une approche envisagée est le recours à l'encapsulation de ces principes actifs au sein de vésicules capables de les protéger. Un type de vésicules de taille nanométrique est largement étudié, ce sont les nanoliposomes. Ces nanoliposomes sont constitués de composants issus principalement d'agroressources. Ils sont actuellement considérés comme des vecteurs sûrs et efficaces pour le transport de molécules actives dans des systèmes biologiques (Arab Tehrany et al. 2012).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de nanoliposomes composés de lécithines de colza vides sur les CPEs issues de sang de cordon et sur les CSMs issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical.

Les nanoliposomes de lécithines de colza ont été réalisés en collaboration avec le Professeur Elmina Arab-Tehrany et le Docteur Cyril Kahn (LIBio, Université de Lorraine).

Les CPEs ont été cultivées dans du milieu EGM-2 à 2% de SVF supplémenté avec différentes concentrations de nanoliposomes (0, 5, 10, 20, 50, 100, 500 et 1000 μ g/mL). Les CSMs ont quant à elles été cultivées dans du milieu α -MEM supplémenté avec des nanoliposomes aux mêmes concentrations. Nous avons tout d'abord évalué leur toxicité sur ces CPEs et sur les CSMs en mettant en évidence la présence de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire, nous avons ensuite évalué l'activité métabolique au cours du temps (J1, J3, J5 et J7). Ensuite nous avons étudié l'effet de ces nanoliposomes sur la fonctionnalité et le phénotype des CPEs en mettant en évidence la capacité des cellules à former des structures

pseudovasculaires (test d'angiogenèse *in vitro*) et à exprimer des marqueurs spécifiques du phénotype endothélial (PCR et western blot).

La détection de la LDH extracellulaire a été réalisée après 24h de culture cellulaire. Concernant les CPEs, aucune toxicité n'a été détectée pour les nanoliposomes quelle que soit la concentration (Figure 20). Pour les CSMs, nous avons pu mettre en évidence une baisse significative de la toxicité en présence de nanoliposomes à la concentration de 500µg/mL.

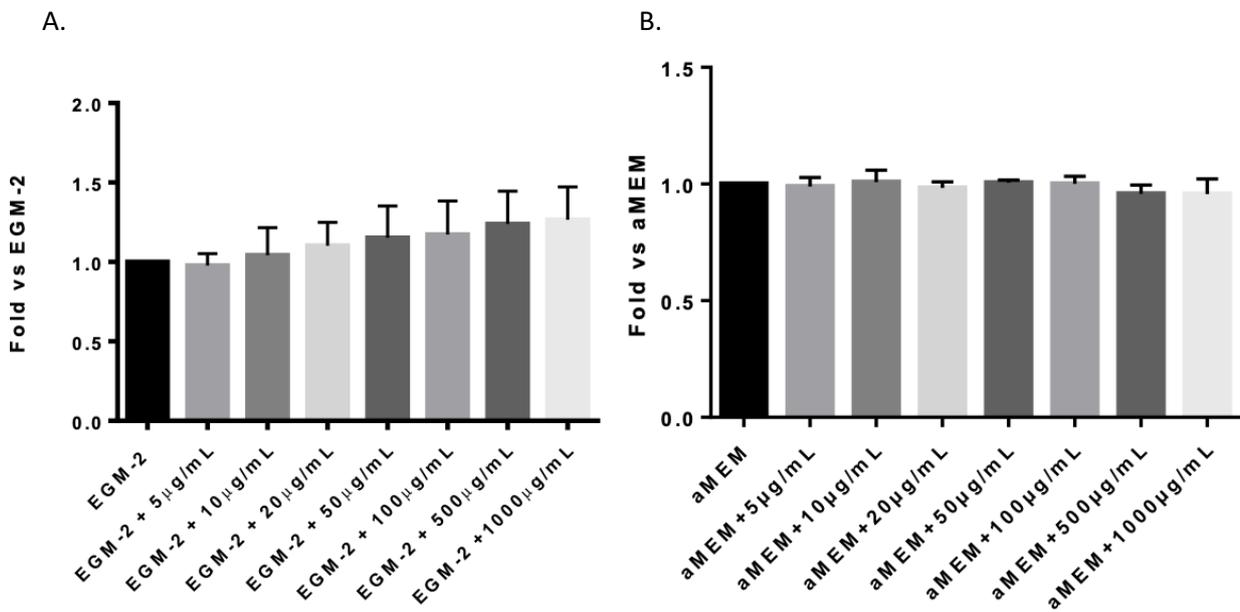


Figure 20 : Evaluation de la cytotoxicité induite par les nanoliposomes après 24h de culture des CPEs (A) et des CSMs (B) en présence des nanoliposomes à une concentration allant de 5 à 1000µg/mL.

Contrôle positif : concentration maximale en LDH

CPEs : les expérimentations ont été réalisées sur 2 échantillons différents

CSMs : les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons différents.

* représente une différence statistiquement significative avec $p < 0,05$ (ANOVA suivi d'Holm Sidak)

Après un jour de culture, l'activité métabolique des cellules traitées en présence de nanoliposomes est comparable à celle des cellules non traitées. Après trois jours de culture, l'activité métabolique des cellules semble être stable en présence de nanoliposomes utilisés à des doses allant de 5 à 500 µg/mL, mais décroît à la dose de 1000µg/mL. A partir de J5, les cellules semblent présenter une baisse de leur activité métabolique quelle que soit la

concentration de nanoliposomes utilisée et cette baisse se poursuit jusqu'à J7. Cette cinétique est également retrouvée pour le témoin. Néanmoins, à J7, les cellules cultivées en présence de nanoliposomes à la dose de 5 à 100 µg/mL paraissent avoir une activité métabolique supérieure à celle du témoin. L'activité métabolique des CSMs augmente au cours du temps quelle que soit la condition de culture hormis pour les concentrations en nanoliposomes les plus élevées (100 ; 500 et 1000 µg/mL) où une baisse significative est remarquée (Figure 21).

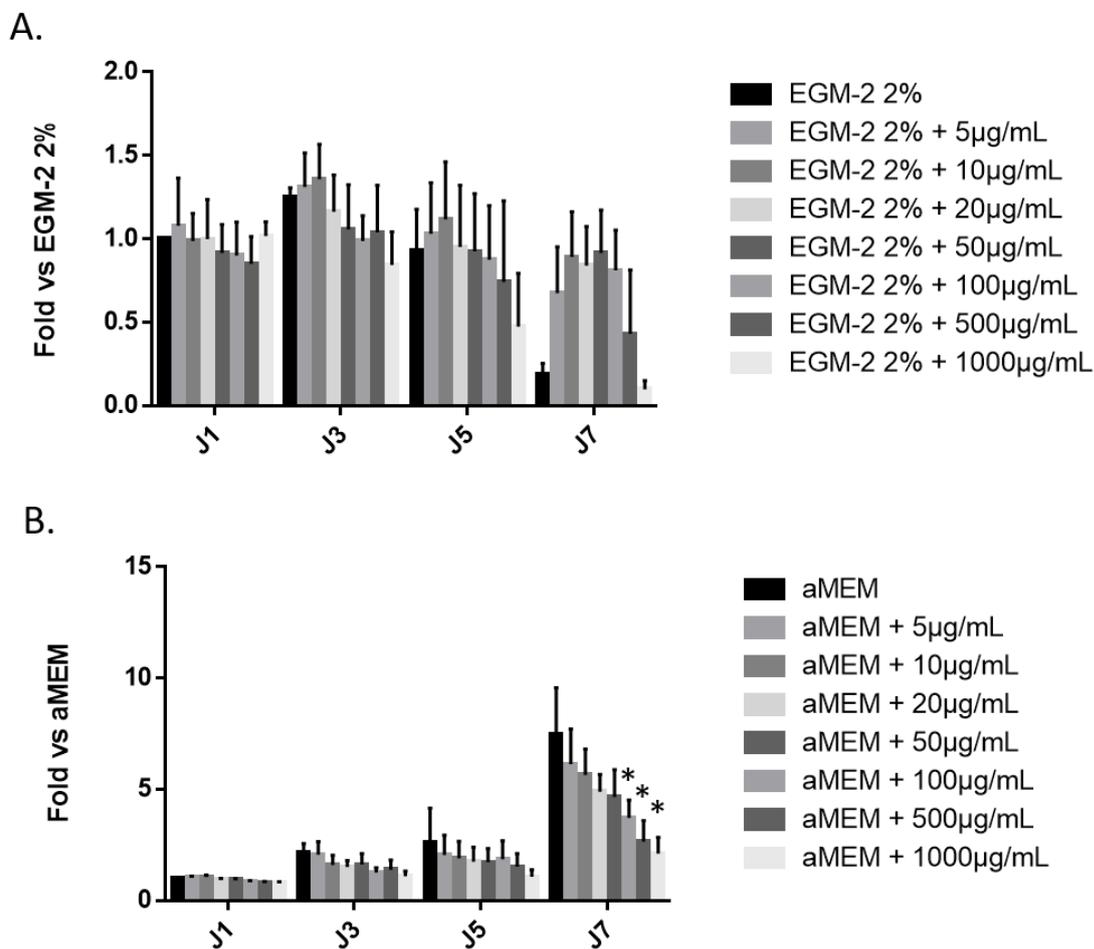


Figure 21 : Activité métabolique des cellules progénitrices endothéliales (A) et cellules souches mésenchymateuses (B) après 7 jours de culture en présence de nanoliposomes à différentes concentrations

CPEs : les expérimentations ont été réalisées sur 2 échantillons différents.

CSMs : les expérimentations ont été réalisées sur 3 échantillons différents.

Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'ADN (évalué par la méthode de Hoeschst) et exprimés en fonction du contrôle J1 (EGM-2 2% pour les CPEs ; aMEM pour les CSMs)

* représente un différence statistiquement significative avec $p < 0,05$ (two way ANOVA vs aMEM).

L'étude de la capacité des cellules à former des structures pseudo-vasculaires *in vitro* a permis de mettre en évidence la présence de ces structures quelque soit la concentration en nanoliposomes. Les différents paramètres étudiés (nombre de segments, nombre de jonctions et longueur des segments) semblent être similaires quelque soit la condition de culture (figure 22).

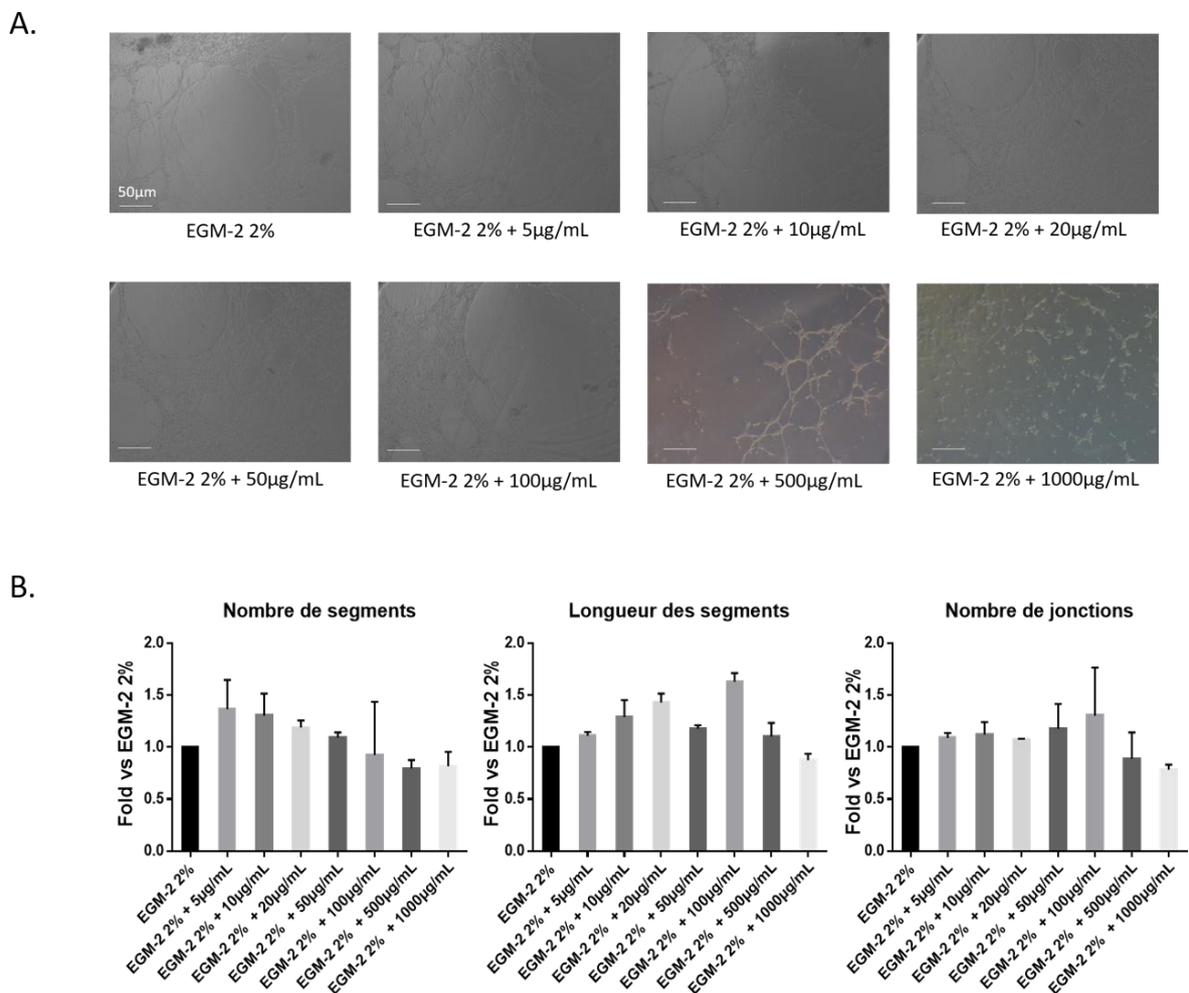
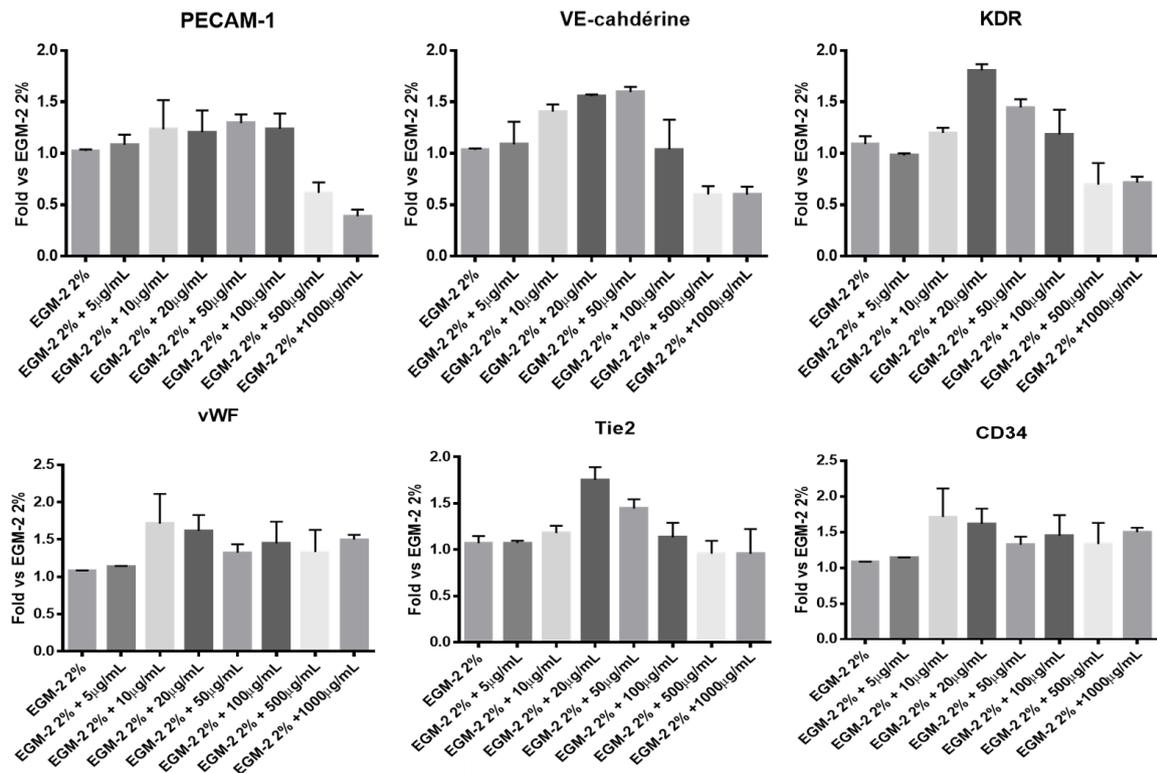


Figure 22 : Test d'angiogenèse *in vitro*. A. Photographies en contraste de phase des puits lors d'un test d'angiogenèse sur des cellules progénitrices endothéliales issues de sang de cordon cultivées pendant 8 heures dans 8 conditions différentes : EGM-2 2% (condition contrôle), EGM-2 2% additionné de 5/10/50/100/500/1000 µg/mL de nanoliposomes de lécithines de colza.

B. Comparaison du nombre et de la longueur des segments et du nombre de jonctions. Les résultats sont exprimés en fonction de la condition contrôle (EGM-2 2%) +/- SEM. Les manipulations ont été réalisées sur deux échantillons de cellules indépendants.

Enfin, l'étude de l'expression génique et protéique a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression des marqueurs PECAM-1, VE-cadhérine et KDR en présence des nanoliposomes aux concentrations les plus élevées (500 et 1000 μ g/mL). L'expression des transcrits codant pour vWF, Tie2 et CD34 ne semble pas modifiée en présence des nanoliposomes (figure 23).

A.



B.

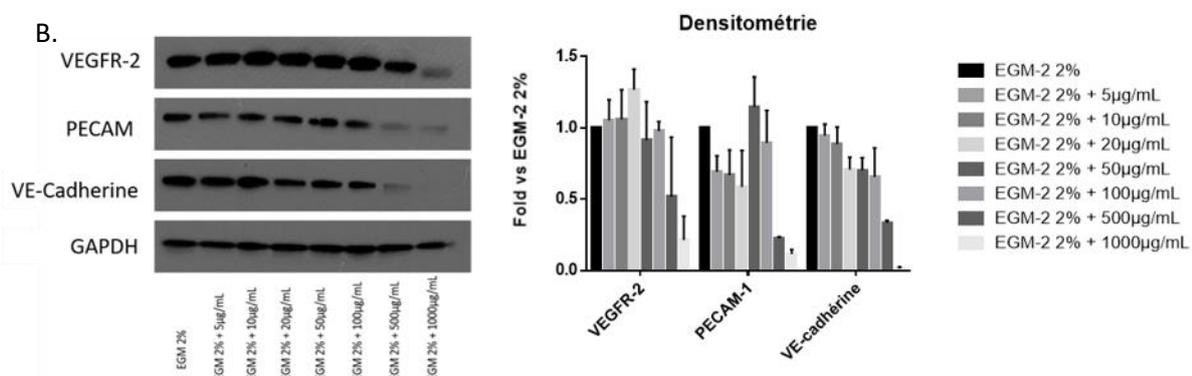


Figure 23 : Etude de l'expression génique (A) et protéique (B) des cellules progénitrices endothéliales cultivées en présence de nanoliposomes à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en fonction de la condition contrôle (EGM-2 2%) +/- SEM.

Les manipulations ont été réalisées sur deux échantillons de cellules indépendants.

Les résultats obtenus semblent montrer un impact néfaste des nanoliposomes utilisés aux plus hautes concentrations (500 et 1000 μ g/mL), et une innocuité de ces nanoliposomes aux concentrations plus faibles.

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les pertes osseuses de grandes étendues représentent des enjeux thérapeutiques (traumatologie, accidentologie, médecine de guerre) et économiques majeurs. Elles sont responsables de plus de cent millions de procédures chirurgicales chaque année à travers le monde (Maisani et al. 2017). Actuellement, le traitement idéal n'existe pas en raison de la difficulté à recréer un réseau vasculaire fonctionnel au sein du nouvel os. Afin de pallier ce problème, de nombreuses stratégies, issues de l'ingénierie tissulaire, portent sur l'élaboration *in vitro* de substituts osseux prévascularisés qui seront connectés au système vasculaire de l'hôte après implantation (Unger et al. 2010; Buschmann et al. 2011; Ghanaati et al. 2011; Yousefi et al. 2016).

Les points cruciaux sont le choix du type cellulaire, de la matrice et des stimulus environnementaux (biochimiques et/ou mécaniques) adéquats. Afin d'obtenir un substitut osseux vascularisé, une coculture de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) (ayant la capacité de se différencier en OBs) et de cellules progénitrices endothéliales (CPEs) (ayant des capacités angiogéniques) pourrait être réalisée au sein d'une matrice tridimensionnelle, exposée à des stimulus environnementaux. Ces systèmes de co-culture permettent de recréer un environnement le plus proche possible de celui rencontré *in vivo*, en mimant les processus physiologiques de la régénération osseuse et de l'angiogenèse (Dohle et al. 2010; Laranjeira et al. 2012), répondant ainsi au besoin de vascularisation immédiate. Cependant, l'association CPEs/CSMs augmente l'ostéogenèse mais pas l'angiogenèse par rapport aux monocultures respectives (Sun et al. 2016a). Il pourrait donc être intéressant d'identifier un stimulus capable d'agir à la fois sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'identification de l'association cellules-stimulus idéale permettant de combler ces défauts osseux.

Nous avons tout d'abord évalué l'impact d'un stimulus naturel dont les effets sur l'ostéogenèse ont déjà été démontrés : la nacre, et plus particulièrement, un extrait de nacre : les principes actifs solubles dans l'éthanol (appelés *Ethanol soluble matrix*, ESM). L'ESM a démontré dans des travaux précédents sa capacité à restaurer la minéralisation de la matrice extracellulaire d'ostéoblastes matures humains issus de patients arthrosiques (Brion et al. 2015). Cependant, leur action sur la différenciation de cellules immatures (CSMs) vers un phénotype osseux ainsi que leur effet sur l'angiogenèse n'ont, à ce jour, jamais été étudiés.

Nous avons suivi la différenciation angiogénique des CPEs provenant du sang de cordon, et la différenciation ostéogénique des CSMs provenant de la moelle osseuse et cultivées sous forme de sphère tridimensionnelle, en présence d'ESM.

Nous avons voulu évaluer *in vitro* le rôle stimulateur de l'ESM sur l'angiogenèse en utilisant deux types de cellules de la lignée endothéliale (cellules endothéliales matures de la veine ombilicale humaine, HUVECs *human umbilical vein endothelial cells*, et CPEs, issues de sang de cordon). Concernant les cellules matures, nous avons obtenu des résultats en présence d'ESM quasiment comparables à ceux obtenus avec utilisation d'un cocktail de facteurs de croissance. Puis, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'ESM sur les CPEs, cellules capables de recréer un réseau vasculaire à partir d'un réseau pré-existant. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'effet pro-angiogénique de l'ESM notamment à la concentration de 200µg/mL au travers d'une augmentation de l'expression de gènes spécifiques des cellules endothéliales (CEs) et de la fonctionnalité de ces cellules (capacité à former des structures pseudo-vasculaires). Cet effet de l'ESM sur les capacités angiogéniques des CPEs pourrait résulter d'une action additive ou synergique avec les facteurs de croissance présents dans le milieu de référence (EGM-2). Nous avons ainsi pu démontrer un effet positif

de cet extrait sur la fonctionnalité et l'expression génique des deux types cellulaires notamment à la concentration de 200µg/mL d'ESM. Cette efficacité de la concentration 200µg/mL d'ESM avait précédemment été mise en évidence dans la stimulation de la capacité ostéogénique d'ostéoblastes arthrosiques (Brion et al. 2015).

Nos résultats sont encourageants et démontrent l'effet bénéfique de l'ESM sur l'angiogenèse. Un autre extrait de nacre (WSM) avait précédemment montré *in vivo* dans un modèle porcin de brûlure au second degré sa capacité à augmenter l'expression du facteur VIII (facteur exprimé par les CEs) (Lee et al. 2012).

Nous avons ensuite observé l'effet de l'ESM sur la différenciation ostéogénique des CSMs. Les CSMs, cultivées sous forme de sphère tridimensionnelle et en présence d'ESM à 100µg/mL, ont montré une expression combinée de marqueurs spécifiques de chondrocytes et de chondrocytes hypertrophiques, étape précédant la différenciation ostéoblastique dans l'ossification endochondrale. Ces données suggèrent une différenciation des CSMs *via* le phénomène d'ossification endochondrale. Cependant ces résultats restent à confirmer par l'étude de la matrice extracellulaire sécrétée par les CSMs. L'ESM utilisée à la concentration de 200µg/mL ne semble pas stimuler l'expression des gènes de chondrocytes ou de chondrocytes hypertrophiques, cela pourrait être dû à une compétition entre l'ESM utilisée à cette concentration et la dexaméthasone.

L'ESM peut ainsi intervenir à la fois sur l'angiogenèse et sur l'ostéogenèse et constitue un stimulus potentiel pour le développement d'un substitut osseux prévascularisé. Il aurait été intéressant de tester les bénéfices engendrés par l'utilisation de l'ESM dans un système de co-culture CPEs/CSMs. En effet, ces systèmes de co-culture permettent de recréer un environnement le plus proche possible de celui rencontré *in vivo*, en mimant les processus physiologiques de la régénération osseuse et de l'angiogenèse. Cependant, les CSMs bien que

classiquement utilisées en médecine régénérative présentent des inconvénients et de nombreuses études ont montré que leur potentiel de régénération était principalement médié par leurs produits de sécrétion, c'est ce qui a favorisé l'apparition de la thérapie dite « *cell-free* », et permet de s'affranchir totalement de la composante cellulaire (Ratajczak et al. 2012; Vizoso et al. 2017). Cette thérapie utilise soit le milieu conditionné (milieu de culture contenant les produits de sécrétion des cellules (facteurs solubles et vésicules extracellulaires (VECs)) soit uniquement les VECs. Parmi les VECs, une fraction spécifique a été étudiée de manière plus approfondie : les vésicules extracellulaires de taille nanométrique (nEVs). Ces nEVs transportent des protéines, des acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) qui vont interagir avec les cellules environnantes et ainsi engendrer une modification du comportement de la cellule. Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé trois types de cellules : HUVECs, CPEs et CSMs. Les cellules utilisées avaient la même origine tissulaire : le cordon ombilical, veine endothéliale pour les HUVECs, sang de cordon pour les CPEs et gelée de Wharton pour les CSMs.

Nous avons étudié l'effet de nEVs issues de CSMs sur les capacités angiogéniques des cellules de la lignée endothéliale (cellules endothéliales matures et cellules progénitrices endothéliales). Dans le cas des cellules matures, nous avons mis en évidence l'interaction existant entre les nEVs et les HUVECs et une stimulation de la fonctionnalité de ces CEs matures. Cette interaction est représentée par une internalisation des nEVs issues des CSMs et marquées au PKH67 au niveau du cytoplasme des HUVECs. La capacité des HUVECs à former des structures vasculaires, représentative de leur fonctionnalité, a été stimulée à partir d'une concentration de 10^9 nEVs/mL. De la même façon, nous avons pu mettre en évidence une meilleure capacité des CPEs à former des néo-vaisseaux ainsi qu'une expression plus importante des marqueurs endothéliaux en présence de nEVs à partir d'une concentration de 10^9 nEVs/mL.

Ces nEVs issues des CSMs semblent présenter un double rôle en pouvant à la fois maintenir le phénotype fonctionnel de cellules matures (HUVECs) et participer à la différenciation de progéniteurs (CPEs). Leur utilisation pourrait permettre de s'affranchir de l'utilisation de facteurs de croissance onéreux et exogènes lors de la différenciation. Leur association à l'ESM au sein d'un hydrogel pourrait avoir un effet synergique et accélérateur sur l'angiogenèse.

Enfin, en collaboration avec l'équipe E.A. 4367-UL du LIBio (Pr Arab-Tehrany et Dr Kahn) nous avons également exploré l'effet de nanoparticules synthétiques à base de lécithines de colza. L'objectif était de développer des structures capables de véhiculer l'ESM et donc favoriser son utilisation en médecine régénérative. Ces nanoparticules permettent de protéger efficacement les constituants sensibles comme les facteurs de croissance ou les ARNs, augmentant ainsi leur temps de présence au sein d'un système biologique ou de biomatériaux (Arab Tehrany et al. 2012). Cela pourrait également permettre de diminuer la quantité de principes actifs et donc d'ESM utilisée. Une encapsulation efficace pourrait également permettre de mieux cibler l'ESM vers le site d'implantation et donc notamment au niveau du défaut osseux. Les nanoparticules que nous avons utilisées ont été synthétisées à partir de lécithine de colza. Elles sont biocompatibles et déjà utilisées en cosmétique, en gaénique ainsi qu'en agroalimentaire. Leur composition spécifique en acide gras va jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire. D'autres agro-ressources peuvent également être utilisées pour l'obtention de lécithine comme par exemple le saumon ou le soja (Arab Tehrany et al. 2012). La composition en acide eicosapentanoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA) de cette lécithine va jouer un rôle bénéfique en cardiovasculaire (Nelson et al. 2017). La mise en contact de ces nanoliposomes formés de lécithines de colza avec des CPEs et des CSMs a montré leur parfaite innocuité lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations inférieures à

500µg/mL. Ces résultats ouvrent la voie à des essais d'encapsulation d'ESM au sein de ces nanoliposomes de lécithines de colza et ainsi permettre un meilleur ciblage *in vivo*.

Durant nos travaux de thèse, nous avons cherché à optimiser l'association cellules-stimulus qui permettrait la création d'un système vasculaire fonctionnel au sein d'un substitut osseux. Nous avons montré l'effet stimulateur de l'ESM et notamment utilisée à la dose de 200µg/mL sur les capacités angiogéniques des cellules de la lignée endothéliale et notamment les CPEs mais également sur l'induction des CSMs vers une voie d'ossification endochondrale. Nous avons mis en évidence que les nEVs issues de CSM d'origine ombilicale pouvaient également stimuler cette capacité angiogénique. Enfin, nous avons constaté l'inocuité des nanoliposomes issues de la lécithine de colza vis-à-vis des deux types cellulaires étudiés

Ces travaux pourraient être l'étape préliminaire au développement d'une matriceensemencée avec des CPEs issues du sang de cordon, enrichie avec des nEVs issue de CSMs de la gelée de Wharton et vectorisée par des nanoliposomes enrichis en ESM, permettant la création d'un substitut osseux prévascularisé.

BIBLIOGRAPHIE

- Aghaloo TL, Hadaya D (2017) Basic Principles of Bioengineering and Regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 29:1–7. doi: 10.1016/j.coms.2016.08.008
- Agrawal H, Shang H, Sattah AP, et al (2014) Human adipose-derived stromal/stem cells demonstrate short-lived persistence after implantation in both an immunocompetent and an immunocompromised murine model. *Stem Cell Res Ther* 5:142. doi: 10.1186/scrt532
- Aguirre A, Planell JA, Engel E (2010) Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 400:284–291. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.073
- Akers JC, Gonda D, Kim R, et al (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113:1–11. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8
- Alenquer M, Amorim MJ (2015) Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses* 7:5066–5083. doi: 10.3390/v7092862
- Allen P, Melero-Martin J, Bischoff J (2011) Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med* 5:e74-86. doi: 10.1002/term.389
- Angoulvant D, Ivanes F, Ferrera R, et al (2011) Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 30:95–102. doi: 10.1016/j.healun.2010.08.023
- Arab Tehrani E, Kahn CJF, Baravian C, et al (2012) Elaboration and characterization of nanoliposome made of soya; rapeseed and salmon lecithins: application to cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces* 95:75–81. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.024
- Arnaud E, De Pollak C, Meunier A, et al (1999) Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. *Biomaterials* 20:1909–1918
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967
- Asvanund P, Chunhabundit P (2012) Alveolar bone regeneration by implantation of nacre and B-tricalcium phosphate in guinea pig. *Implant Dent* 21:248–253. doi: 10.1097/ID.0b013e3182563ae0
- Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH (2010) Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 28:1007–1014. doi: 10.1002/jor.21083

Atlan G, Balmain N, Berland S, et al (1997) Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C R Acad Sci III, Sci Vie* 320:253–258

Atlan G, Delattre O, Berland S, et al (1999) Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials* 20:1017–1022

Bai Y-Y, Peng X-G, Wang L-S, et al (2015) Bone Marrow Endothelial Progenitor Cell Transplantation After Ischemic Stroke: An Investigation Into Its Possible Mechanism. *CNS Neurosci Ther* 21:877–886. doi: 10.1111/cns.12447

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108:863–868. doi: 10.1161/01.CIR.0000084828.50310.6A

Begam H, Nandi SK, Kundu B, Chanda A (2017) Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 70:856–869. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.074

Ben-David D, Srouji S, Shapira-Schweitzer K, et al (2013) Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix. *Biomaterials* 34:2902–2910. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.035

Berland S, Delattre O, Borzeix S, et al (2005) Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. *Biomaterials* 26:2767–2773. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.019

Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, et al (2012) Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant* 27:3037–3042. doi: 10.1093/ndt/gfs168

Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, et al (2010) Immobilization of human mesenchymal stem cells within RGD-grafted alginate microspheres and assessment of their angiogenic potential. *Biomacromolecules* 11:1956–1964. doi: 10.1021/bm100264a

Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, et al (2012) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 23:13–27

Brion A, Zhang G, Dossot M, et al (2015) Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. *J Struct Biol* 192:500–509. doi: 10.1016/j.jsb.2015.10.012

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278–294

Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al (1998) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16:155–162. doi: 10.1002/jor.1100160202

Buschmann J, Welti M, Hemmi S, et al (2011) Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in DegraPol foam: histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts. *Tissue Eng Part A* 17:291–299. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0278

Camprasse G, Camprasse S, Gill GA (1988) [Substitution of the dental root by aquatic invertebrate skeletons in animals and man]. *C R Acad Sci III, Sci Vie* 307:485–491

Camprasse S, Camprasse G, Pouzol M, Lopez E (1990) Artificial dental root made of natural calcium carbonate (Bioracine). *Clin Mater* 5:235–250

Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V (2018) Les substituts osseux en odontologie. Partie 1 - Structure du tissu osseux, définition des substituts osseux, cahier des charges. *Biomatériaux Dentaire Cliniques* 3

Cenni E, Perut F, Baldini N (2011) In vitro models for the evaluation of angiogenic potential in bone engineering. *Acta Pharmacol Sin* 32:21–30. doi: 10.1038/aps.2010.143

Ciardelli G, Gentile P, Chiono V, et al (2010) Enzymatically crosslinked porous composite matrices for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A* 92:137–151. doi: 10.1002/jbm.a.32344

Collino F, Pomatto M, Bruno S, et al (2017) Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Rev* 13:226–243. doi: 10.1007/s12015-016-9713-1

Costa-Almeida R, Granja PL, Soares R, Guerreiro SG (2014) Cellular strategies to promote vascularisation in tissue engineering applications. *Eur Cell Mater* 28:51–66; discussion 66-67

Cruz FF, Rocco PRM (2017) Stem-cell extracellular vesicles and lung repair. *Stem Cell Investig* 4:78. doi: 10.21037/sci.2017.09.02

Dadsetan M, Hefferan TE, Szatkowski JP, et al (2008) Effect of hydrogel porosity on marrow stromal cell phenotypic expression. *Biomaterials* 29:2193–2202. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.006

Deb S, Mandegar R, Di Silvio L (2010) A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *J Mater Sci Mater Med* 21:893–905. doi: 10.1007/s10856-009-3936-5

Deplaine H, Lebourg M, Ripalda P, et al (2013) Biomimetic hydroxyapatite coating on pore walls improves osteointegration of poly(L-lactic acid) scaffolds. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 101:173–186. doi: 10.1002/jbm.b.32831

Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, et al (2010) Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 16:1235–1237. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0493

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

Dong F, Ha X (2010) Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy. *Chin Med J* 123:2454–2460

Dostert G, Mesure B, Menu P, Velot É (2017a) How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? *Front Cell Dev Biol* 5:6. doi: 10.3389/fcell.2017.00006

Dostert G, Willemin A-S, Jouan-Hureau V, et al (2017b) Evaluation of the pro-angiogenic effect of nanoscale extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 28:S75–S79. doi: 10.3233/BME-171626

Duttenhoefer F, Lara de Freitas R, Meury T, et al (2013) 3D scaffolds co-seeded with human endothelial progenitor and mesenchymal stem cells: evidence of prevascularisation within 7 days. *Eur Cell Mater* 26:49–64; discussion 64-65

El Omar R, Xiong Y, Dostert G, et al (2016) Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells. *Immunol Cell Biol* 94:342–356. doi: 10.1038/icb.2015.94

Flausse A, Henrionnet C, Dossot M, et al (2013) Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in hydrogel containing nacre powder. *J Biomed Mater Res A* 101:3211–3218. doi: 10.1002/jbm.a.34629

Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, et al (2013) A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 34:2947–2959. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.049

Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP (2013) Toward Strong and Tough Glass and Ceramic Scaffolds for Bone Repair. *Adv Funct Mater* 23:5461–5476. doi: 10.1002/adfm.201301121

Fuchs S, Jiang X, Gotman I, et al (2010) Influence of polymer content in Ca-deficient hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposites on the formation of microvessel-like structures. *Acta Biomater* 6:3169–3177. doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.001

Furi I, Momen-Heravi F, Szabo G (2017) Extracellular vesicle isolation: present and future. *Ann Transl Med* 5:. doi: 10.21037/atm.2017.03.95

Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, et al (2016) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* 5:1620–1630. doi: 10.5966/sctm.2015-0285

Geiger F, Bertram H, Berger I, et al (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20:2028–2035. doi: 10.1359/JBMR.050701

Geris L, Gerisch A, Sloten JV, et al (2008) Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol* 251:137–158. doi: 10.1016/j.jtbi.2007.11.008

Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, et al (2011) Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* 32:8150–8160. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.041

Giannoni P, Scaglione S, Daga A, et al (2010) Short-time survival and engraftment of bone marrow stromal cells in an ectopic model of bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 16:489–499. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0041

Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, et al (2015) Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 70:93–101. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.033

Gong L, Zhao Y, Zhang Y, Ruan Z (2016) The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro. *Ann Clin Lab Sci* 46:65–71

Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, et al (2014) Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 28:166–207; discussion 207-208

Green DW, Kwon H-J, Jung H-S (2015) Osteogenic Potency of Nacre on Human Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cells* 38:267–272. doi: 10.14348/molcells.2015.2315

Grellier M, Bordenave L, Amédée J (2009) Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 27:562–571. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.07.001

Guerrero J, Catros S, Derkaoui S-M, et al (2013) Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater* 9:8200–8213. doi: 10.1016/j.actbio.2013.05.025

Guillotin B, Bareille R, Bourget C, et al (2008) Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* 42:1080–1091. doi: 10.1016/j.bone.2008.01.025

Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolghadri M, et al (2004) Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 14:325–332. doi: 10.1159/000080342

Huri PY, Ozilgen BA, Hutton DL, Grayson WL (2014) Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells. *Biomed Mater* 9:045003. doi: 10.1088/1748-6041/9/4/045003

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295–312

James AW, LaChaud G, Shen J, et al (2016) A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 22:284–297. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357

Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, et al (2005) Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* 19:665–667. doi: 10.1096/fj.04-2529fje

Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy* 9:63. doi: 10.1186/s13287-018-0791-7

Khan M, Nickoloff E, Abramova T, et al (2015) Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res* 117:52–64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305990

Khojasteh A, Fahimipour F, Eslaminejad MB, et al (2016) Development of PLGA-coated β -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 69:780–788. doi: 10.1016/j.msec.2016.07.011

Kim S, von Recum H (2008) Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev* 14:133–147. doi: 10.1089/teb.2007.0304

Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, et al (2016) The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy* 18:13–24. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.008

Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, et al (2011) Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 17:311–321. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0338

Körbling M, Estrov Z, Champlin R (2003) Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1:S23-24. doi: 10.1038/sj.bmt.1703939

Krampera M, Galipeau J, Shi Y, et al (2013) Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 15:1054–1061. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.010

Lai RC, Chen TS, Lim SK (2011) Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* 6:481–492. doi: 10.2217/rme.11.35

Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, et al (1999) Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone* 25:91S-94S

Lamghari M, Antonietti P, Berland S, et al (2001a) Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. *J Bone Miner Res* 16:2232–2237. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.12.2232

Lamghari M, Berland S, Laurent A, et al (2001b) Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials* 22:555–562

Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ (2012) Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time-dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif* 45:320–334. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00822.x

Laurencin-Dalieux S (2010) Rôle de l'acide lysophosphatidique et de son récepteur LPA1 dans le développement osseux et dentaire : effet paracrine dans le contrôle de l'ostéogénèse et la cémentogénèse. *Toulouse 3*

Lavergne M, Vanneaux V, Delmau C, et al (2011) Cord blood-circulating endothelial progenitors for treatment of vascular diseases. *Cell Prolif* 44 Suppl 1:44–47. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00722.x

Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG (2014) Biomaterials for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 42:323–337. doi: 10.1007/s10439-013-0859-6

Lee K, Kim H, Kim JM, et al (2012) Nacre-driven water-soluble factors promote wound healing of the deep burn porcine skin by recovering angiogenesis and fibroblast function. *Mol Biol Rep* 39:3211–3218. doi: 10.1007/s11033-011-1088-4

Lenze U, Pohlig F, Seitz S, et al (2014) Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on in vivo bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds. *BMC Musculoskelet Disord* 15:350. doi: 10.1186/1471-2474-15-350

Li F, Whyte N, Niyibizi C (2012) Differentiating multipotent mesenchymal stromal cells generate factors that exert paracrine activities on exogenous MSCs: Implications for paracrine activities in bone regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 426:475–479. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.095

Li W, Liu Y, Zhang P, et al (2018) Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* 10:5240–5254. doi: 10.1021/acsami.7b17620

Liao H, Brandsten C, Lundmark C, et al (1997) Responses of bone to titania–hydroxyapatite composite and nacreous implants: a preliminary comparison by in situ hybridization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8:823–827. doi: 10.1023/A:1018537318147

Liao H, Mutvei H, Sjöström M, et al (2000) Tissue responses to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants in vivo. *Biomaterials* 21:457–468

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71–77. doi: 10.1172/JCI8071

Lip GY, Blann A (1997) von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 34:255–265

Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, et al (2016) Corrigendum: Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 6:. doi: 10.1038/srep21447

Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G (2015) Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 35:69–77. doi: 10.1016/j.ceb.2015.04.013

Lopez E, Vidal B, Berland S, et al (1992) Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. *Tissue Cell* 24:667–679

Lu Z, Chen Y, Dunstan C, et al (2017) Priming Adipose Stem Cells with Tumor Necrosis Factor-Alpha Preconditioning Potentiates Their Exosome Efficacy for Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A* 23:1212–1220. doi: 10.1089/ten.tea.2016.0548

Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T (1990) Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* 249:1570–1574

Maisani M, Ziane S, Ehret C, et al (2017) A new composite hydrogel combining the biological properties of collagen with the mechanical properties of a supramolecular scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.2569

Marcoux G, Duchez A-C, Cloutier N, et al (2016) Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses. *Sci Rep* 6:35928. doi: 10.1038/srep35928

Marin F, Le Roy N, Marie B (2012) The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci (Schol Ed)* 4:1099–1125

Martin FA, Murphy RP, Cummins PM (2013) Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H1585-1597. doi: 10.1152/ajpheart.00096.2013

Martins M, Ribeiro D, Martins A, et al (2016) Extracellular Vesicles Derived from Osteogenically Induced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can Modulate Lineage Commitment. *Stem Cell Reports* 6:284–291. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.001

Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al (2002) Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 8:911–920. doi: 10.1089/107632702320934010

Mendes SC, Van Den Brink I, De Bruijn JD, Van Blitterswijk CA (1998) In vivo bone formation by human bone marrow cells: effect of osteogenic culture supplements and cell densities. *J Mater Sci Mater Med* 9:855–858

Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ (2004) Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83:204–210. doi: 10.1177/154405910408300304

Nakamura R, Nakamura F, Fukunaga S (2015) Perlecan Diversely Regulates the Migration and Proliferation of Distinct Cell Types in vitro. *Cells Tissues Organs (Print)* 200:374–393. doi: 10.1159/000440950

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al (2011) Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 31:2283–2290

Nelson JR, Wani O, May HT, Budoff M (2017) Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques. *Vascul Pharmacol* 91:1–9. doi: 10.1016/j.vph.2017.02.004

Nomura S (2017) Extracellular vesicles and blood diseases. *Int J Hematol* 105:392–405. doi: 10.1007/s12185-017-2180-x

Orciani M, Fini M, Di Primio R, Mattioli-Belmonte M (2017) Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges. *Front Bioeng Biotechnol* 5:17. doi: 10.3389/fbioe.2017.00017

Paprocka M, Krawczenko A, Dus D, et al (2011) CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood. *Cytometry A* 79:594–602. doi: 10.1002/cyto.a.21092

Park H-C, Son Y-B, Lee S-L, et al (2017) Effects of Osteogenic-Conditioned Medium from Human Periosteum-Derived Cells on Osteoclast Differentiation. *Int J Med Sci* 14:1389–1401. doi: 10.7150/ijms.21894

Pascaretti-Grizon F, Libouban H, Camprasse G, et al (2014) The interface between nacre and bone after implantation in the sheep: a nanotomographic and Raman study. *J Raman Spectrosc* 45:558–564. doi: 10.1002/jrs.4506

Patat JL, Guillemin G (1989) [Natural coral used as a replacement biomaterial in bone grafts]. *Ann Chir Plast Esthet* 34:221–225

Phinney DG, Pittenger MF (2017) Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* 35:851–858. doi: 10.1002/stem.2575

Pioletti DP (2013) Integration of mechanotransduction concepts in bone tissue engineering. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 16:1050–1055. doi: 10.1080/10255842.2013.780602

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147

Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE (2014) Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 14:15–56

Prasad CK, Resmi KR, Krishnan LK, Vaishnav R (2005) Survival of endothelial cells in vitro on Paclitaxel-loaded coronary stents. *J Biomater Appl* 19:271–286. doi: 10.1177/0885328205047397

Puleo DA (1997) Dependence of mesenchymal cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro. *J Cell Physiol* 173:93–101. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199710)173:1<93::AID-JCP11>3.0.CO;2-O

Qi X, Zhang J, Yuan H, et al (2016) Exosomes Secreted by Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Critical-Sized Bone Defects through Enhanced Angiogenesis and Osteogenesis in Osteoporotic Rats. *Int J Biol Sci* 12:836–849. doi: 10.7150/ijbs.14809

Raeven P, Zipperle J, Drechsler S (2018) Extracellular Vesicles as Markers and Mediators in Sepsis. *Theranostics* 8:3348–3365. doi: 10.7150/thno.23453

Rao RR, Peterson AW, Ceccarelli J, et al (2012) Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis* 15:253–264. doi: 10.1007/s10456-012-9257-1

Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, et al (2006) Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20:1487–1495. doi: 10.1038/sj.leu.2404296

Ratajczak MZ, Kucia M, Jadczyk T, et al (2012) Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia* 26:1166–1173. doi: 10.1038/leu.2011.389

Rosa N, Simoes R, Magalhães FD, Marques AT (2015) From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Med Eng Phys* 37:719–728. doi: 10.1016/j.medengphy.2015.05.015

Rousseau M, Boulzaguet H, Biagiatti J, et al (2008) Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. *J Biomed Mater Res A* 85:487–497. doi: 10.1002/jbm.a.31553

Rousseau M, Delattre O, Gillet P, Lopez E (2012) Subchondral nacre implant in the articular zone of the sheep's knee: a pilot study. *Biomed Mater Eng* 22:227–234. doi: 10.3233/BME-2012-0712

Rousseau M, Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, et al (2003a) The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 135:1–7

- Rousseau M, Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, et al (2003b) The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 135:1–7
- Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA (2006) Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12:2685–2693. doi: 10.1089/ten.2006.12.2685
- Rozen N, Bick T, Bajayo A, et al (2009) Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone* 45:918–924. doi: 10.1016/j.bone.2009.07.085
- Sakkas A, Ioannis K, Winter K, et al (2016) Clinical results of autologous bone augmentation harvested from the mandibular ramus prior to implant placement. An analysis of 104 cases. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW* 5:Doc21. doi: 10.3205/iprs000100
- Santos MI, Reis RL (2010) Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 10:12–27. doi: 10.1002/mabi.200900107
- Sato I, Morita I, Kaji K, et al (1993) Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 195:1070–1076. doi: 10.1006/bbrc.1993.2153
- Schechner YY, Shamir J, Kiryati N (2000) Polarization and statistical analysis of scenes containing a semireflector. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 17:276–284
- Sepúlveda P, Martínez-León J, García-Verdugo JM (2007) Neoangiogenesis with endothelial precursors for the treatment of ischemia. *Transplant Proc* 39:2089–2094. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.07.009
- Shabbir A, Cox A, Rodríguez-Menocal L, et al (2015) Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev* 24:1635–1647. doi: 10.1089/scd.2014.0316
- Shantsila E, Watson T, Tse H-F, Lip GYH (2008) New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol* 51:669–671. doi: 10.1016/j.jacc.2007.09.057
- Silve C, Lopez E, Vidal B, et al (1992) Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. *Calcif Tissue Int* 51:363–369
- Sun K, Zhou Z, Ju X, et al (2016a) Combined transplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for tissue engineering: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther* 7:151. doi: 10.1186/s13287-016-0390-4

Sun L, Xu R, Sun X, et al (2016b) Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. *Cytotherapy* 18:413–422. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.11.018

Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM (2012) Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev* 18:246–257. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0427

Taylor DD, Shah S (2015) Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 87:3–10. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019

Timmers L, Lim SK, Arslan F, et al (2007) Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 1:129–137. doi: 10.1016/j.scr.2008.02.002

Titorencu I, Jinga VV, Constantinescu E, et al (2007) Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy* 9:682–696. doi: 10.1080/14653240701561329

Unger RE, Ghanaati S, Orth C, et al (2010) The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 31:6959–6967. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.057

Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, et al (2015) Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *Int J Biol Macromol* 72:269–281. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008

Venkatesan J, Vinodhini PA, Sudha PN, Kim S-K (2014) Chitin and chitosan composites for bone tissue regeneration. *Adv Food Nutr Res* 73:59–81. doi: 10.1016/B978-0-12-800268-1.00005-6

Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, van Neck JW, et al (2012) Vascularization of prevascularized and non-prevascularized fibrin-based human adipose tissue constructs after implantation in nude mice. *J Tissue Eng Regen Med* 6:169–178. doi: 10.1002/term.410

Vestweber D (2008) VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:223–232. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158014

Villars F, Guillotin B, Amédée T, et al (2002) Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol, Cell Physiol* 282:C775–785. doi: 10.1152/ajpcell.00310.2001

Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al (2017) Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* 18:. doi: 10.3390/ijms18091852

Wang J, Wu D, Zhang Z, et al (2015) Biomimetically Ornamented Rapid Prototyping Fabrication of an Apatite-Collagen-Polycaprolactone Composite Construct with Nano-Micro-Macro Hierarchical Structure for Large Bone Defect Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:26244–26256. doi: 10.1021/acsami.5b08534

Wang L, Zhao L, Detamore MS (2011) Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 5:712–721. doi: 10.1002/term.370

Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y, et al (2010) VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 19:30–40

Whiteside TL (2017) Extracellular vesicles isolation and their biomarker potential: are we ready for testing? *Ann Transl Med* 5:. doi: 10.21037/atm.2017.01.62

Wong SA, Rivera KO, Miclau T, et al (2018) Microenvironmental Regulation of Chondrocyte Plasticity in Endochondral Repair-A New Frontier for Developmental Engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 6:58. doi: 10.3389/fbioe.2018.00058

Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2514–2523. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151456

Xia X, Chiu PWY, Lam PK, et al (2018) Secretome from hypoxia-conditioned adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the healing of gastric mucosal injury in a rodent model. *Biochim Biophys Acta* 1864:178–188. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.10.009

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242–248. doi: 10.1038/35025215

Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066

Yang B, Zhao M, Liu Z (1999) [Comparative study on early revascularization of membranous and endochondral onlay bone grafts in the rat]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi* 15:196–198

Yin Y, Liu H, Wang F, et al (2015) Transplantation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells induces recovery of carotid artery injury in nude rats. *Stem Cell Res Ther* 6:37. doi: 10.1186/s13287-015-0022-4

Yousefi A-M, James PF, Akbarzadeh R, et al (2016) Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem Cells Int* 2016:. doi: 10.1155/2016/6180487

Zhang B, Yeo RWY, Tan KH, Lim SK (2016a) Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 17:174. doi: 10.3390/ijms17020174

Zhang G, Brion A, Willemin A-S, et al (2017) Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. *J Biomed Mater Res A* 105:662–671. doi: 10.1002/jbm.a.35939

Zhang H-X, Zhang X-P, Xiao G-Y, et al (2016b) In vitro and in vivo evaluation of calcium phosphate composite scaffolds containing BMP-VEGF loaded PLGA microspheres for the treatment of avascular necrosis of the femoral head. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 60:298–307. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.055

Zhang J, Liu X, Li H, et al (2016c) Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy* 7:. doi: 10.1186/s13287-016-0391-3

Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al (2016d) Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthr Cartil* 24:2135–2140. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022

Zhang Y, Reddy VJ, Wong SY, et al (2010) Enhanced biomineralization in osteoblasts on a novel electrospun biocomposite nanofibrous substrate of hydroxyapatite/collagen/chitosan. *Tissue Eng Part A* 16:1949–1960. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0221

Résumé

En cas de pertes de substances osseuses de grande étendue, la capacité naturelle de réparation du tissu osseux n'est pas suffisante et nécessite d'être assistée. La greffe d'os autologue constitue actuellement la référence. Cependant, cette thérapeutique présente tout de même des inconvénients qui ont entraîné le développement de substituts osseux. Mais, aucun matériau à ce jour ne peut remplacer totalement l'os autologue, en raison notamment de la difficulté à recréer un système vasculaire fonctionnel au niveau du site lésé. Depuis quelques années, les espoirs se tournent vers la création d'un substitut osseux prévascularisé afin de pallier la principale limite des alternatives actuelles : l'établissement d'un réseau vasculaire au sein de ce biomatériau.

Notre projet vise à évaluer l'effet stimulateur d'un composé naturel, les principes actifs de la nacre solubles dans l'éthanol (appelé *Ethanol Soluble Matrix*, ESM), à la fois sur les capacités angiogéniques de cellules de la lignée endothéliale et sur la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses (CSM) avec comme objectif le développement d'un substitut osseux prévascularisé.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'ESM stimulait les capacités angiogéniques des cellules de la lignée endothéliale : cellules endothéliales matures (HUVECs, cellules endothéliales issues de la veine ombilicale humaine) et cellules progénitrices endothéliales (CPEs) issues de sang de cordon. L'ESM, utilisé à la concentration de 200µg/mL, a permis de dépasser les résultats obtenus (expression génique et test fonctionnel) avec le milieu de culture de référence des CPEs : l'EGM-2 (Endothelial Growth Medium). Nous avons ensuite mis en évidence que l'ESM exerçait un effet stimulateur également sur les CSMs en augmentant l'expression de marqueurs spécifiques des chondrocytes et des chondrocytes hypertrophiques, suggérant une orientation de ces cellules vers une ossification endochondrale. En parallèle de ces travaux, nous avons étudié l'effet paracrine des CSMs sur les cellules de la lignée endothéliale, HUVECs et CPEs. Les vésicules extracellulaires de taille nanométrique (nEVs) ont montré leur capacité à induire une stimulation *in vitro* de la formation de réseaux vasculaires et de l'expression de gènes endothéliaux.

Ces résultats encourageants soulignent la faisabilité de l'utilisation de l'ESM en tant que stimulus à la fois de l'angiogenèse des CPEs et de l'ostéogenèse des CSMs. Ce stimulus pourrait être associé aux nEVs issues de CSMs et aux CPEs au sein d'une matrice tridimensionnelle pour développer un substitut osseux prévascularisé.

Mots clés : ingénierie tissulaire osseuse, cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, cellules progénitrices endothéliales, cellules souches mésenchymateuses, principes actifs issus de la nacre solubles dans l'éthanol

Abstract:

In case of critical-sized defects, the bone tissue ability of natural healing is not sufficient and needs to be assisted. The autologous bone graft is currently the gold standard. However, this solution has drawbacks that have led to the development of bone substitutes. Nowadays, no substitute is able to supply autogenous bone, due to the difficulties to mimic the vascular system. In recent years, the hopes are focusing on the creation of a prevascularized bone substitute to overcome the main limitation of current alternatives: the creation of a functional vascular network inside the substitute.

Our project aims to evaluate the stimulating effect of a natural compound, the nacre extracts called Ethanol Soluble Matrix (ESM), both on the angiogenic abilities of endothelial cell lineage and on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to develop a pre-vascularized bone substitute.

First, we showed that ESM stimulates the angiogenic potential of two types of endothelial cells: mature endothelial cells (HUVECs, human umbilical vein endothelial cells) and endothelial progenitor cells (EPCs) from cord blood. The ESM, used at the concentration of 200µg/mL, exceeded results obtained with the reference culture medium of EPCs: the EGM-2 (Endothelial Growth Medium). Then, we demonstrated that ESM also exerted a stimulating effect on MSC by increasing the expression of chondrocyte and hypertrophic chondrocyte specific markers, suggesting an orientation of these cells towards endochondral ossification. In line with this work, we studied the paracrine effect of MSCs on endothelial cell lineage, HUVECs and EPCs. Nanoscale extracellular vesicles (nEVs) have been shown to induce an *in vitro* stimulation of the vascular network formation and of the endothelial gene expression.

These encouraging results highlight the feasibility of using ESM as a stimulus for both angiogenesis of EPCs and osteogenesis of MSCs. This stimulus could be associated with MSC-derived nEVs and EPCs within a three-dimensional matrix to develop a pre-vascularized bone substitute.

Key words: bone tissue engineering, human umbilical vein endothelial cells, endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells, nacre active compounds soluble in ethanol