

UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

par

Thibault BOUDERLIQUE

**Etude des propriétés ostéoinductrices et chondroinductrices de
"l'Heparin affiné regulatory peptide" sur les cellules stromales
mésenchymateuses humaines, application en régénération osseuse**

Directeurs de thèse : Dr Patricia ALBANESE-UZAN et Dr Nathalie CHEVALLIER

Soutenue publiquement le 30 novembre 2012 devant le jury composé de :

Pr Xavier CHEVALIER, APHP, Hôpital Henri MONDOR	Président
Pr Marc VIGNY, Université Pierre et Marie CURIE	Rapporteur
Pr Fani ANAGNOSTOU, UFR d'Odontologie Université Denis-Diderot Paris 7	Rapporteur
Pr Jean-Jacques LATAILLADE, Centre de Transfusion Sanguine des Armées	Examineur
Dr Nathalie CHEVALLIER, EFS Ile de France	Co-directeur de thèse
Dr Patricia ALBANESE-UZAN, Université Paris-Est Créteil	Directeur de thèse

SOMMAIRE

INDEX.....	1
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	8
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	11
. CHAPITRE 1 : Heparin Affin Regulatory Peptide : structure, fonctions générales et rôles spécifiques dans la biologie du système ostéoarticulaire et des cellules souches tissulaires adultes.....	12
1 Structure, expression et transduction	12
1.1 Structure du gène et régulation de son expression	12
1.2 Structure protéique de HARP	14
2 Récepteurs de HARP	16
2.1 ALK.....	16
2.2 RPTPζ.....	19
2.3 SDC3	21
2.4 Nucléoline.....	23
3 Fonctions pléiotropes de HARP	24
3.1 HARP et développement vasculaire.....	24
3.2 HARP et cancer.....	25
3.3 HARP et inflammation	25
3.4 HARP et développement cérébral	26
3.5 Autres fonctions de HARP	26
4 HARP et le tissu cartilagineux	27
4.1 Le tissu cartilagineux.....	27
4.2 HARP et physiologie du tissu cartilagineux	28
4.2.1 HARP et cartilage articulaire.....	28
4.2.2 HARP, le cartilage de conjugaison et la croissance endochondrale.....	29
4.3 HARP et pathologies du tissu cartilagineux	31
5 HARP et le tissu osseux	32
5.1 Le tissu osseux	32
5.1.1 Le remodelage osseux	33
5.1.2 La régénération osseuse.....	34
5.2 HARP et la physiologie du tissu osseux	36
5.3 HARP dans les pathologies du tissu osseux.....	37
6 HARP et cellules souches	39

CHAPITRE 2 : Bio ingénierie tissulaire et cellulaire dans l'os : la triade support/cellules/molécules bioactives.....	41
1 La bioingénierie.....	41
2 Les biomatériaux pour le tissu osseux	42
2.1 Les substituts naturels.....	43
2.2 Les céramiques.....	43
2.2.1 Les céramiques bio actives	44
2.2.2 Les céramiques bio inertes.....	44
2.2.3 Les céramiques bio absorbables.....	45
2.3 Les polymères	45
3 La composante cellulaire de la bio ingénierie	46
3.1 Les cellules stromales mésenchymateuses.....	46
3.1.1 Origine et purification	46
3.1.2 Caractéristiques phénotypiques.....	47
3.1.3 Fonctions physiologiques et pathologiques	50
4 Molécules bio actives et bio ingénierie.....	52
4.1 Les facteurs de croissances	52
4.1.1 Facteurs de croissance ostéoinducteur.....	52
4.1.2 Facteurs de croissance angiogéniques	54
4.2 Les glycosaminoglycannes	55
4.2.1 Structure et fonctions	55
4.2.2 Glycosaminoglycannes et HARP.....	57
4.2.3 Les protéoglycannes.....	58
4.2.4 Les mimétiques des GAG.....	61
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	63
CHAPITRE 1 Effets de HARP sur les voies de différenciations chondroblastiques et ostéoblastiques des CSM humaines	65
1 Introduction.....	65
2 Article	67
3 Résultats complémentaires.....	85
3.1 Introduction.....	85
3.2 Résultats.....	86
3.2.1 Effets de HARP sur l'expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 2D non différenciées.	86
3.2.2 Effets de HARP sur l'expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 3D non différenciées.	88
4 Discussion	90

4.1	HARP et la chondrogénèse des CSMh	90
4.2	La réponse à HARP en fonction de l'organisation cellulaire.....	91
4.3	Les récepteurs de HARP et la différenciation.....	91
.	CHAPITRE 2 Potentialisation des propriétés des CSM humaines par HARP associé à un substitut osseux. Application dans un modèle d'ostéoformation ectopique murin et de régénération osseuse chez le rat.....	95
1	Introduction.....	95
2	Résultats.....	97
2.1	Article.....	97
.	CHAPITRE 3 : Modulation de l'expression des protéoglycannes durant les différenciations des CSM humaines	120
1	Introduction.....	120
2	Résultats.....	121
2.1	Protéoglycannes membranaires.....	121
2.1.1	Famille des syndécans	121
2.1.2	Famille des glypicans	122
2.2	Protéoglycannes matriciels	123
2.2.1	La famille des "Small leucin repeats proteoglycan"	123
2.2.2	Agrin, Perlecanne et Versicanne.....	125
3	Discussion.....	126
3.1	Les protéoglycannes et la niche hématopoïétique	126
3.2	Les protéoglycannes et la régénération osseuse.....	127
.	CHAPITRE 4 : Potentialisation des propriétés des CSM de rat par les mimétiques des GAG. Application dans un modèle murin d'ostéoformation ectopique, associant biomatériaux, mimétiques et CSM humaines.....	130
1	Introduction.....	130
2	Article 4	133
3	Article 5	146
4	Discussion.....	182
	Perspectives.....	183
1	HARP, le développement et la réparation osseuse	184
1.1	Développement osseux	184
1.2	Fractures et thérapies ostéoréparatrices	185
2	HARP et l'arthrose	185
	Bibliographie.....	188

INDEX

INDEX DES ABREVIATIONS

2D: 2 dimensions, culture sur plastique
3D: 3 dimensions culture en culot cellulaire
ACAN: Aggrécane
AH: Acide hyaluronique
ALK: Anaplastic lymphoma kinase
ALP: Phosphatase alcaline
Ang1: Angiopoïéine 1
BGC: Biglycan
BMP: Bone morphogenetic protein
CD: Cluster of differentiation
CFU-F: Colony forming unit fibroblast
COMP: Cartilage oligomeric matrix protein
CS: Chondroïtines sulfate
CSH: Cellule souche hématopoïétique
CSM: Cellule stromale mésenchymateuse
DCN: Decorine
DS: Dermatine sulfate
FABP4: Fatty acid binding protein 4
FAK: Focal adhesion kinase
FGF: Fibroblast growth factor
GAG: Glycosaminoglycane
GPC: Glypican
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
HA: Hydroxyapatite
HARP: Heparin affinité régulatoire peptide
HBGF: Heparin binding growth factor
HBNF: Heparin binding neurotrophique facteur
hESC: Human embryonic stem cell
HS: Héparane sulfate
HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell
IBMX: 3-isobutyl-1-méthylxanthine
IL: Interleukine
KDR: kinase insert domain receptor

KO: Knock out
KS: Keratane sulfate
LP: Lysat plaquettaire
LTC-IC: Long-term culture initiating cell
LUM: Lumican
MAGI: Membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ containing domain
MAPK: Microtubule associated protein kinase
M-CSF: Macrophage colony stimulating factor
MEC : Matrice extracellulaire
MEF: fibroblastes embryonnaires murins
MK: Midkine
MMP: Matrix metalloprotease
CSM: Cellule stromale mésenchymateuse
NPM-ALK: protein de fusion nucleophosmine-ALK
OC: Ostéocalcine
ON: Ostéonectine
OP: Ostéopontine
ORF: Open Reading Frame
OSF-1: Osteoblast stimulating factor 1
PDGF: Platelet derived growth factor
PEC: Progéniteur endothelial circulant
PG: Protéoglycane
PGA: Poly-glycolic acid
PI3k: Phosphoinositide 3-kinase
PLA: Poly-lactic acid
PLC γ : Phospholipase C γ
PMMA: Polymethyl metacrylate
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRCAN: Perlecan
PTN: Pleiotrophin
PTEN: phosphatase and tensin homolog
RGTA: Regenerating agent
RPTP ζ : Receptor protein tyrosin phosphatase ζ
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX2: Runt-related transcription factor 2
SDC: Syndécan
SLRP: Small leucin repeat proteoglycan

Sox: SRY-box containing genes
SRE: serum responsive element
SSEA: Stage specific embryonic antigen
SVF: S rum de veau foetal
TCP100: Tricalcium phosphate 100%
TCP35: Tricalcium phosphate 35%, hydroxyapatite 65%
TGF- β : Transforming growth factor β
TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase
TSR: Thrombospondin repeat
VCAN: Versican
VEGF: Vascular endothelial growth factor

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Représentation de la séquence promotrice de HARP (Papadimitriou et al., 2009).....	13
Figure 2 Représentation de la structure secondaire de HARP.....	15
Figure 3 Structure de ALK (Espinosa, 2005).....	17
Figure 4 Voies de signalisation intracellulaires activées par ALK.....	18
Figure 5 Représentation schématique de l'organisation en domaine des quatre isoformes de RPTP ζ (Garwood et al., 2003).	19
Figure 6 Voies de signalisation intracellulaires activées par RPTP ζ	21
Figure 7 Représentation schématique de l'organisation en domaine des syndécans (D'après (Multhaupt et al., 2009)).	22
Figure 8 Voies de signalisation intracellulaires activées par le SDC3.....	23
Figure 9 Voies de signalisation intracellulaires activées par la nucléoline	24
Figure 10 Morphologie du cartilage articulaire (D'après (Ge et al., 2006)).....	28
Figure 11 La croissance endochondrale dans les os longs (D'après (Adams, Cohen, and Lasso, 2007; Ulici et al., 2008))	30
Figure 12 Structure de l'os (coupe de fémur de rat coloré au trichrome de Masson, x4).	33
Figure 13 Le remodelage osseux (D'après (Marie, 2001))	34
Figure 14 Schéma du modèle de la régénération osseuse et ses participants cellulaires (D'après (Schindeler et al., 2008)).....	35
Figure 15 Principe de la bioingénierie, la triade support/cellules/matrice	41
Figure 16 Schéma de la tripotentialité des CSM	49
Figure 17 Modèle de la régulation de la niche des CSH par les CSM (D'après (Wagner, Saffrich, and Ho, 2008))	51
Figure 18 Schéma de la structure de la décorine, du biglycane, de la fibromoduline et du lumican.(D'après (Kalamajski and Oldberg, 2010)).....	59
Figure 19 Schéma de la structure de l'aggrécane (D'après (Esko, 2009)).....	59

Figure 20 Schéma de la structure du perlecan (D'après (Esko, 2009)).....	60
Figure 21 Schéma de la structure des syndécans (D'après (Esko, 2009)).....	61
Figure 22 Schéma de la structure des glypicans (D'après (Esko, 2009)).....	61
Figure 23 Expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 2D non différenciées, en absence ou en présence de HARP.....	86
Figure 24 Expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 3D non différenciées, en absence ou en présence de HARP.....	88
Figure 25 Expression des Syndécans durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh .	121
Figure 26 Expression des glypicans durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh...	122
Figure 27 Expression des SLRP durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh	124
Figure 28 Expression de l'Agrin, du PRCAN et du VCAN durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh.....	125

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 Tissus préférentiellement formés en fonction de la taille des pores du substitut (D'après (Karageorgiou and Kaplan, 2005; Kasten et al., 2008))	44
--	----

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Dr Patricia Albanese-Uzan au laboratoire “CRRET” (Croissance, Réparation et Régénération Tissulaire), unité EAC CNRS 7149 dirigé par le Dr José Courty et du Dr Nathalie Chevallier au laboratoire de Bioingénierie Tissulaire et Cellulaire, unité EA 3952, dirigé par le Dr Hélène Rouard.

Le laboratoire CRRET s’intéresse aux rôles biologiques des différents composants de la matrice extracellulaire dans l’homéostasie tissulaire. Dans ce laboratoire, Patricia Albanese étudie plus particulièrement l’implication des glycosaminoglycannes (GAG) et de l’”heparin affiné regulatory peptide” (HARP), une protéine se liant à l’héparine, sur les propriétés de différents types de cellules souches adultes médullaires ou circulantes, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l’association de produits cellulaires et matriciels, dans le traitement de pathologies osseuses, musculaires et vasculaires.

Nathalie Chevallier étudie le développement d’alternatives thérapeutiques à la greffe osseuse autologue, associant biomatériaux et cellules stromales mésenchymateuses, dans le cadre des pertes osseuses de grande taille résistantes aux thérapies actuelles. Elle travaille également au développement de protocoles clinique à l’échelle européenne (REBORNE, 7^e PCRD).

Ce travail de thèse s’est intégré dans la thématique qu’elles développent en collaboration depuis 5 ans, et qui a pour but d’optimiser la colonisation de biomatériaux par des cellules stromales mésenchymateuses humaines (CSMh), en les fonctionnalisant avec HARP ou des peptides dérivés. L’objectif final de ce projet est le développement de nouveaux produits de thérapie cellulaire, pour des applications cliniques dans le traitement de pathologies osseuses.

Pendant mes trois années de thèse, j’ai développé un nouvel aspect de ce projet qui a eu pour but d’évaluer : (1) les effets de HARP sur différentes propriétés de CSMh in vitro et (2) l’efficacité de l’association de HARP à des biomatériaux et des CSM dans des situations de régénération osseuse in vivo.

HARP est un facteur de croissance ayant de nombreuses fonctions en conditions physiologique comme en conditions pathologiques. La présence de HARP dans les tissus en cours de développement ou en régénération suggère un rôle important de cette protéine dans ces phénomènes. Il semblerait que HARP agisse entre autre par une potentialisation de l’angiogénèse ou de la migration des progéniteurs impliqués dans la réparation (Perez-Pinera, Berenson, and Deuel, 2008; Yang et al., 2003). Il a été montré que HARP pouvait induire la différenciation de progéniteurs neuronaux dans le cerveau ou, plus récemment, moduler les propriétés des cellules souches hématopoïétiques.

Cependant, peu de données existent quant à son effet différenciateur sur les progéniteurs mésenchymateux dans le système ostéoarticulaire.

Dans la première partie de ce projet, je me suis donc intéressé aux effets de HARP durant l'induction des différenciations ostéoblastiques et chondrogéniques des CSMh. Ces travaux font l'objet d'une publication soumise en juillet dans la revue "Biomaterials", qui sera présentée dans la première partie des résultats. Ce travail montre que HARP permet, d'une part de potentialiser la différenciation chondrogénique des CSMh *in vitro* vers un phénotype hypertrophique, mais également que HARP n'a pas d'effet sur leur différenciation ostéoblastique. Ces résultats sont discutés ainsi que des résultats complémentaires concernant les effets différenciateurs de HARP sur des CSMh en fonction de leurs conditions de culture, en monocouche ou en culot.

Dans la deuxième partie de ce projet je me suis attaché à (1) mettre au point la fonctionnalisation des biomatériaux par HARP (2) valider les fonctionnalités de HARP immobilisé sur les CSMh (3) valider l'intérêt de cette association dans un modèle de greffe ectopique chez la souris immunodéficiente et dans un modèle de greffe orthotopique chez le rat. Ces travaux font l'objet d'une publication dont une version préliminaire est présentée et discutée dans la deuxième partie des résultats. Ce travail montre pour la première fois que l'association de HARP à des biomatériaux permet l'induction d'une régénération osseuse de type endochondral en site orthotopique.

Les protéoglycannes (PG) sont des protéines sur lesquelles des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG), polysaccharides sulfatés chargés, sont attachées de façon covalente. Les GAG peuvent moduler les effets de nombreux facteurs de croissance, en facilitant leur dimérisation, en les présentant à leurs récepteurs et enfin en optimisant leurs interactions avec eux. Enfin les GAG peuvent également stocker et compartimenter les facteurs de croissance dans certaines zones (ou niches) de la matrice extracellulaire (MEC), les protégeant ainsi des activités des protéases, permettant ainsi la création de gradient de concentration de ces facteurs de croissance. Ils jouent ainsi des rôles prépondérants dans l'organisation et la bioreactivité de la MEC. L'étude des effets de ces GAG sur les propriétés des cellules souches est la thématique de recherche principale de P. Albanese.

Durant ma thèse je me suis donc intéressé à la modulation de l'expression d'un panel de PG extracellulaire ou membranaires durant la culture et la différenciation des CSMh. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de préparation qui sera présentée et discutée. Ces résultats descriptifs devraient permettre de définir de nouvelles cibles protéiques intéressantes pour l'étude de la niche médullaire et sur les propriétés des CSM au cours des processus de régulation de l'homéostasie mais aussi durant la réparation osseuse.

Dans ce même contexte, j'ai également été impliqué dans le projet de thèse de Guilhem Frescaline, sous la direction de P. Albanese. Guilhem s'est intéressé à la modulation des propriétés des CSM de rat et humaines par des mimétiques chimiques, structuraux et fonctionnels, des GAG

endogènes. Dans un 1^{er} temps il a évalué la capacité de GAG mimétiques de différentes structures à potentialiser les propriétés de CSM médullaires de rat, telles que clonogénicité, prolifération, migration et différenciation ostéoblastique. Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans la revue à comité de lecture international "Stem Cell Research" que je signe en 2nd auteur.

Dans la deuxième partie de son travail, Guilhem a validé l'intérêt thérapeutique de ces GAG mimétiques pour le traitement de fractures osseuses. Dans ce contexte, j'ai participé à la validation de l'effet des biomolécules sur les CSM humaines et aux interventions chirurgicales lors de l'implantation des biomatériaux chez les souris immunodéficientes. Ces travaux font l'objet d'une publication, que je signe en 2nd auteur, actuellement en révision dans la revue "Tissue Engineering".

Ces deux publications sont présentées et discutées dans la quatrième partie des résultats.

Le manuscrit se termine par une section décrivant les perspectives d'applications thérapeutiques potentielles de HARP. Cette partie abordera les potentielles implications de HARP dans la croissance et la réparation osseuse. Nous aborderons également son éventuelle implication dans les pathologies dégénératives du système ostéoarticulaire et proposerons des pistes pour leur traitement. Nous évoquerons également l'association de HARP aux mimétiques de glycosaminoglycannes.

· CHAPITRE 1 : Heparin Affin Regulatory Peptide : structure, fonctions générales et rôles spécifiques dans la biologie du système ostéoarticulaire et des cellules souches tissulaires adultes

L' "Heparin Affin Regulatory Peptide" (HARP) est un facteur de croissance formant avec la Midkine (MK) une sous famille des molécules HBGF (Heparin Binding Growth Factors), caractérisées biochimiquement par leur affinité avec l'héparine. Les HBGF comprennent les "Fibroblasts Growth Factors" (FGF), les "Platelet Derived Growth Factors" (PDGF) et les "Vascular Endothelial Growth Factors" (VEGF). L'HARP a été isolé et cloné par le groupe de José Courty, au laboratoire CRRET, en 1991 (Courty et al., 1991), à partir d'extraits de cerveaux de bœuf adulte. Durant la même période ce facteur de croissance fut isolé par d'autres laboratoires qui le nommèrent selon la source d'extraction et/ou de ses propriétés biologiques. HARP fut isolé pour la première fois d'utérus bovin et fut appelé "Heparin Binding Growth Factor 8" (HBGF8) en raison de son affinité pour l'héparine (Milner et al., 1989). Une année après, l'équipe de Thomas Deuel isola à nouveau cette protéine mais à partir de cerveau rat nouveau né et la renomma Pleiotrophine en raison de ses nombreuses activités biologiques (Li et al., 1990). L'équipe de Rauvala isola en 1989 une protéine du cerveau de rat d'une masse apparente de 18 kDa et l'appela P18, et la renommèrent "Heparin Binding Growth Associated Molecule" (HB-GAM) en raison de ses propriétés mitogéniques sur des fibroblastes murins 3T3 (Merenmies and Rauvala, 1990; Rauvala, 1989). En 1990, l'équipe de Böhlen isola une protéine d'une banque d'ADN de rat et la nomma "Heparin Binding Neurotrophic Factor" (HBNF) en raison de sa capacité à induire la pousse neuritique (Kovesdi et al., 1990). Enfin, des analyses différentielles d'expression entre des fibroblastes et des ostéoblastes murins ont permis l'isolement de l'"Osteoblast Specific Factor" (OSF-1) (Tezuka, 1990). HARP a principalement été étudié pour son implication dans la neurogénèse puis dans l'angiogénèse et la tumorigénèse, processus durant lesquels HARP est surexprimé. La forte expression de HARP dans l'os et les esquisses cartilagineuses des membres durant le développement et les processus de réparation chez l'adulte a également conduit à plusieurs études dans ces tissus. Enfin, ce n'est que récemment que quelques études ont décrit ses capacités à moduler les propriétés de cellules souches et progéniteurs.

1 Structure, expression et transduction

1.1 Structure du gène et régulation de son expression

Chez la souris et le rat, le gène codant pour HARP est localisé respectivement sur le chromosome 6 et le chromosome 4. Chez l'homme, ce gène est localisé sur le chromosome 7 en

position q33. Il est décrit comme comportant au moins 42kb répartis sur 5 exons participant à la formation d'un ARNm de 1650 nucléotides (Kretschmer et al., 1993). Le cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame : ORF) codant pour la protéine mature est localisé dans 4 des exons. Chacun de ces exons code pour un des domaines fonctionnel de la protéine(Lai et al., 1992). Le promoteur de l'HARP humain contient un motif CAAT box mais pas de TATA box (Li et al., 1992). En amont du site d'initiation de la transcription, la séquence régulatrice inductible par le facteur HIF-1 α a été retrouvée (Li et al., 1992), suggérant que l'expression de HARP est régulée par l'hypoxie. Des sites putatifs de fixation pour les facteurs de transcription CBP, NF κ B, CArGbox, pour l'acide rétinoïque (RARE) et pour l'acétate de tetradecanoylphorbol (TRE) ont été identifiés (Li et al., 1992; Liedert et al., 2006; Papadimitriou et al., 2009). Des motifs consensus pour la fixation des facteurs de transcription AP1, AP2, MyoD, le SRE (serum responsive element) et HOXA5 ont été identifiés comme étant des sites fonctionnels pour la régulation de l'expression de HARP (Chen et al., 2005; Kretschmer et al., 1993; Liedert et al., 2009; Poimenidi, Hatziapostolou, and Papadimitriou, 2009) (Figure 1).

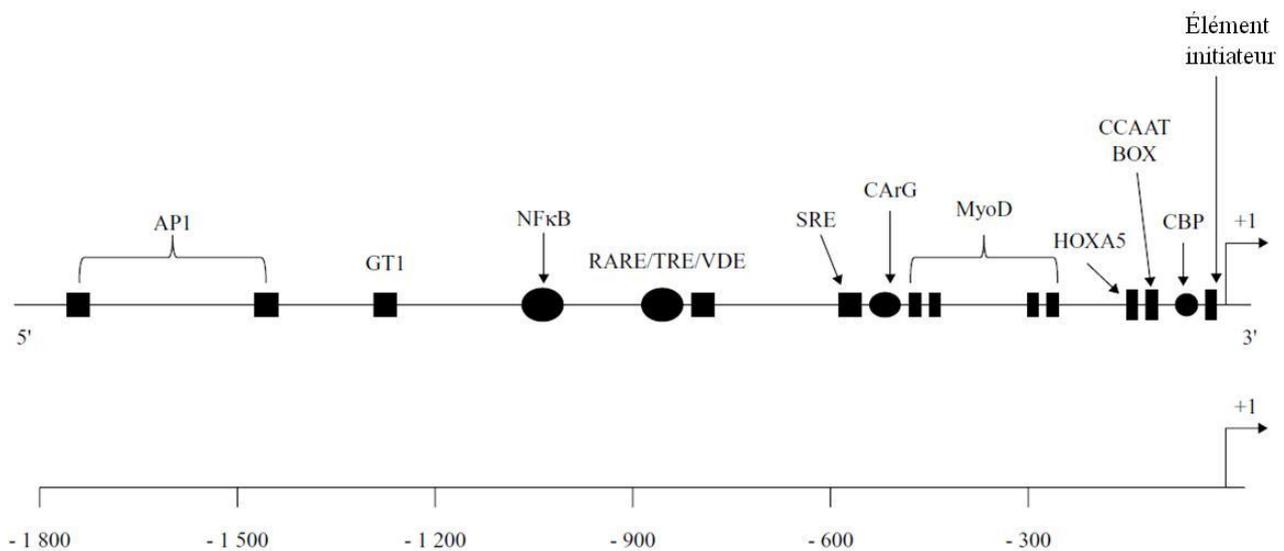


Figure 1 Représentation de la séquence promotrice de HARP (Papadimitriou et al., 2009)

Le promoteur de HARP contient une CAAT box, 4 sites de fixation pour MyoD, 1 pour des facteurs nucléaires appelé GT (GT1), 2 pour l' "Activator Protein1" (AP1), un pour le "forhomebox A5" (HOXA5) et un élément de réponse au sérum (SRE), tous représentés par des rectangles pleins. Les sites de fixation putatifs pour le "nuclear factor kappa B" (NF κ B), la protéine de réponse au cAMP (CBP), (CArG box), l'acide rétinoïque (RARE) et l'acétate de tetradecanoylphorbol (TRE) sont eux représentés par des cercles pleins

Le gène de l'HARP est donc potentiellement inductible par différents stimuli pouvant être inflammatoires, hypoxiques, hormonaux ou mécaniques. Cependant, bien que HARP possède de nombreuses activités biologiques liées à la croissance tumorale, l'angiogénèse, la différenciation et la migration de nombreux types cellulaires, peu de données existent sur la régulation précise de l'induction et de la spécificité de son expression.

L'expression de HARP serait régulée hormonalement. En effet, le traitement de cellules épithéliales de l'oviducte de poulet par un mimétique des œstrogènes (le diethylstilbesterol) induit la synthèse de HARP. Sa surexpression dans les ovaires est cependant associée aux adénocarcinomes (Lee et al., 2012). Cette activation hormono-dépendante a également été rapportée chez le mâle, en effet, le traitement de cellules épithéliales humaines dérivées d'un cancer prostatique par un métabolite de la testostérone (la dihydrotestostérone) augmente l'expression de HARP (Vacherot et al., 1995).

Le traitement de cellules cancéreuses prostatiques par le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote induit leur prolifération et leur migration associées à l'induction de la production de HARP (Polytarchou, Hatziapostolou, and Papadimitriou, 2005; Polytarchou et al., 2009). La transcription de HARP dans les adénocarcinomes est inhibée par la menin via une action sur les enzymes de la méthylation de l'ADN (Gao et al., 2009). Le sérum, en activant le facteur de transcription AP-1, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé, permet la production de HARP dans les cellules de glioblastomes et les HUVEC (Poimenidi, Hatziapostolou, and Papadimitriou, 2009). Le gène suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog) semble être un régulateur de l'expression de HARP. Une étude réalisée en 2005 a montré que les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) déficients en PTEN montraient une production de HARP accrue par rapport aux MEF sauvages (Li et al., 2006). Cet effet est médié par une activation de la voie Pi3k/Akt. L'hypoxie induit l'expression de HARP dans les cellules étoilées du foie de rat (Antoine et al., 2005).

En 2004, des travaux réalisés par Liedert et coll. ont montré que l'expression de HARP était régulée négativement dans des cellules ostéoblastiques cultivées sur plastique et soumises à un étirement (Liedert et al., 2004). En 2006, la même équipe a impliqué les voies MAPK, c-Jun, PKA et PKC dans cette inhibition de l'expression de HARP (Liedert et al., 2006). Enfin, des travaux utilisant une lignée de cellules stromales mésenchymateuses murine transfectées avec des plasmides contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de HARP, déplété des sites consensus pour le facteur de transcription AP1, ont montré une absence de modulation du gène rapporteur lors de l'étirement du tapis cellulaire. Ces travaux suggèrent que la régulation par stress mécanique de l'expression de HARP passe en partie par le facteur de transcription AP1 (Liedert et al., 2009).

De façon plus anecdotique, une injection intra-péritonéale de l'élément psycho actif principal du cannabis, le Δ -9-tetrahydrocannabinol, induit l'expression de HARP dans le cortex et le putamen chez le rat par un mécanisme encore non décrit (Mailleux et al., 1994).

1.2 Structure protéique de HARP

HARP est une protéine associée à la matrice extracellulaire, synthétisée sous forme d'un précurseur de 168 acides aminés et possédant un peptide signal hydrophobe de 32 acides aminés (Kretschmer et al., 1993). Ce dernier est clivé à deux endroits par la signal-peptidase, conduisant à la

2 Récepteurs de HARP

HARP interagit avec 4 récepteurs qui régulent ses nombreuses activités biologiques. HARP présente un récepteur de haute affinité : l'Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (Stoica et al., 2001), 2 protéoglycannes définis comme étant des récepteurs de basse affinité : le Syndécan 3 (SDC3) (Raulo et al., 1994) et le Receptor Protein Tyrosin Phosphatase type z (RPTPβ/ζ) (Krueger and Saito, 1992) et enfin la nucléoline de surface dont l'affinité pour HARP n'est pas encore décrite (Take et al., 1994).

2.1 ALK

ALK est une protéine monomérique de 1620 acides aminés, sa structure se décompose en trois domaines : un domaine extracellulaire de 1030 acides aminés contenant le site de fixation du ligand, un segment transmembranaire de 27 acides aminés et une région cytoplasmique de 563 acides aminés portant le domaine catalytique (Espinosa, 2005). Deux formes de ALK ont été identifiées la première d'une masse de 220 kDa et la seconde de 140 kDa correspondant au clivage de la forme entière et au relargage d'un fragment soluble de 80 kDa (Moog-Lutz et al., 2005) (Figure 3). ALK est un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'insuline (Espinosa, 2005), il est défini comme étant un récepteur de haute affinité pour HARP ($K_d=32$ pM) (Stoica et al., 2001). Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que HARP déplété de sa partie C-terminale (HARP Δ 111-136) inhibait l'activation de ALK (Bernard-Pierrot et al., 2001), suggérant que HARP se fixait à ALK par sa partie C-terminale. Cette hypothèse a été confirmée un an plus tard par des expériences montrant qu'un peptide de HARP correspondant à la partie C-terminale (P111-136), entrainait en compétition avec la protéine entière pour la fixation à ALK et inhibait ainsi son activation (Bernard-Pierrot et al., 2002)

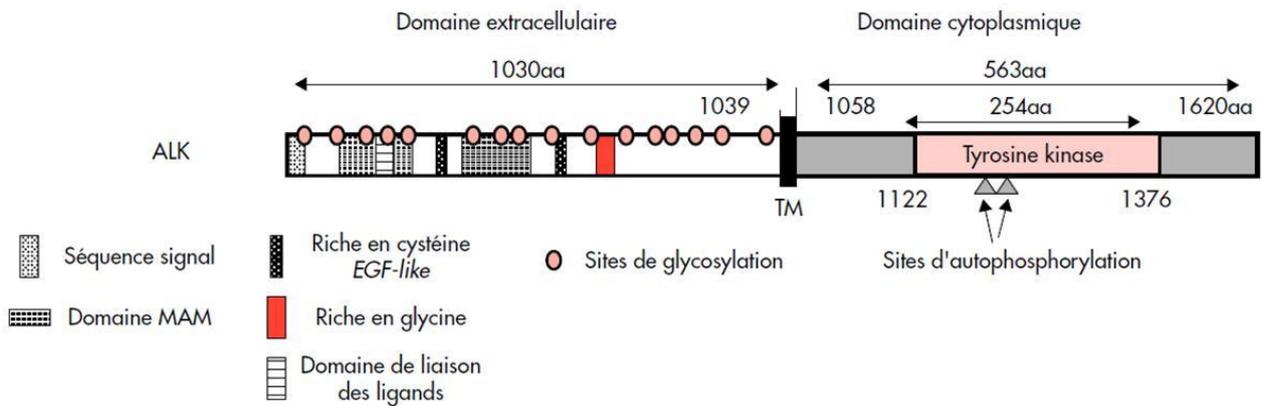


Figure 3 Structure de ALK (Espinos, 2005)

Les 26 premiers acides aminés de la protéine sont hydrophobes et forment une séquence potentielle de peptide signal : la chaîne mature s'étend donc de l'acide aminé 25 à l'acide aminé 1620. Le domaine extracellulaire comporte : 16 sites de glycosylation, 2 domaines MAM (meprin/A5-protein/PTPmu) (MAM1 : aa264-467 et MAM2 : aa478-636), domaines retrouvés dans de nombreux récepteurs et qui pourraient avoir un rôle dans les interactions cellules/cellules, un domaine LDLa (*Low density lipoprotein receptor class A*) constitué d'une répétition de résidus cystéine (aa425-aa487 et aa987-aa1021) qui pourrait potentiellement augmenter la spécificité des ligands (PTN et MK) dont le site de fixation se situe au niveau des aa391-401. Le domaine transmembranaire (TM) de ALK (aa1039-1059), riche en acides aminés hydrophobes, est suivi d'un domaine juxtamembranaire. Le domaine cytoplasmique renferme de nombreux résidus tyrosine phosphorylables, dont une paire située au niveau du domaine tyrosine kinase (aa1122-1376) qui correspond aux sites d'autophosphorylation communs à tous les récepteurs de cette famille.

Des constructions comprenant la partie intracellulaire de ALK et dont la partie extracellulaire avait été remplacée par des fragments cristallisables d'IgG2b ont été transfectées dans des cellules neuronales PC12. Cette construction mime une activation constante de ALK dans ces cellules. L'activation en continu du domaine intracellulaire de ALK conduit à une activation de la voie des MAPK et ainsi à la différenciation neuronale des PC12 (Souttou et al., 2001). Des travaux réalisés par Moog-Lutz et coll. ont confirmés ces résultats. En effet, l'activation de ALK par des anticorps dans des cellules PC12, transfectées transitoirement avec ALK, active la voie des MAP kinases et induit la différenciation de ces cellules en neurones (Moog-Lutz et al., 2005). L'activation de la voie Rap1 par ALK permet également une différenciation neuronale des PC12 visualisable par une pousse neuritique. Ce phénotype est également retrouvé dans d'autres lignées neuronales telles que les SH-SY5Y ou SK-N-SH (Schonherr et al., 2010).

Lors des lymphomes anaplasiques, on observe une translocation du gène de ALK sur le gène de la nucléophosmine conduisant à la synthèse d'une protéine de fusion (NPM-ALK) qui active de façon constitutionnelle les voies de signalisation de ALK (Bai et al., 1998). Cette modification a permis de définir différentes voies impliquées dans les propriétés de ALK. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que NPM-ALK était lié à la phospholipase C γ (PLC γ). Le remplacement d'une tyrosine par une phénylalanine sur le site de fixation a résulté en une baisse de la

prolifération des cellules lymphoïdes étudiées (Bai et al., 1998). L'expression de NPM-ALK est associée avec une activation des voies STAT3 et Pi3k/Akt (Bai et al., 2000; Zamo et al., 2002). Il semblerait que les propriétés mitotiques de NPM-ALK dans ces cellules passent aussi par la voie STAT3 (Anastasov et al., 2010). Enfin, les cellules des lymphomes anaplasiques exprimant NPM-ALK montrent une activation continue de la voie NFkB (Dejean et al., 2012).

L'activation de ALK par HARP induit la dimérisation du récepteur et l'activation de la voie des MAPK, de la Pi3k et de PLC γ . Cette activation potentialise la prolifération des cellules SW13 (Stoica et al., 2001). L'action anti apoptotique de ALK médiée par HARP passe par la voie des MAP kinase dans la lignée cellulaire épithéliale SW13 (Bowden, Stoica, and Wellstein, 2002). Le blocage de ALK par des anticorps bloquant inhibe la pousse neuritique induite par HARP. Cette inhibition est associée à une baisse de la phosphorylation de la "glycogen synthase kinase" 3 β (GSK3 β) et à une baisse de l'activation de la voie GSK3 β / β -catenin (Yanagisawa et al., 2010).

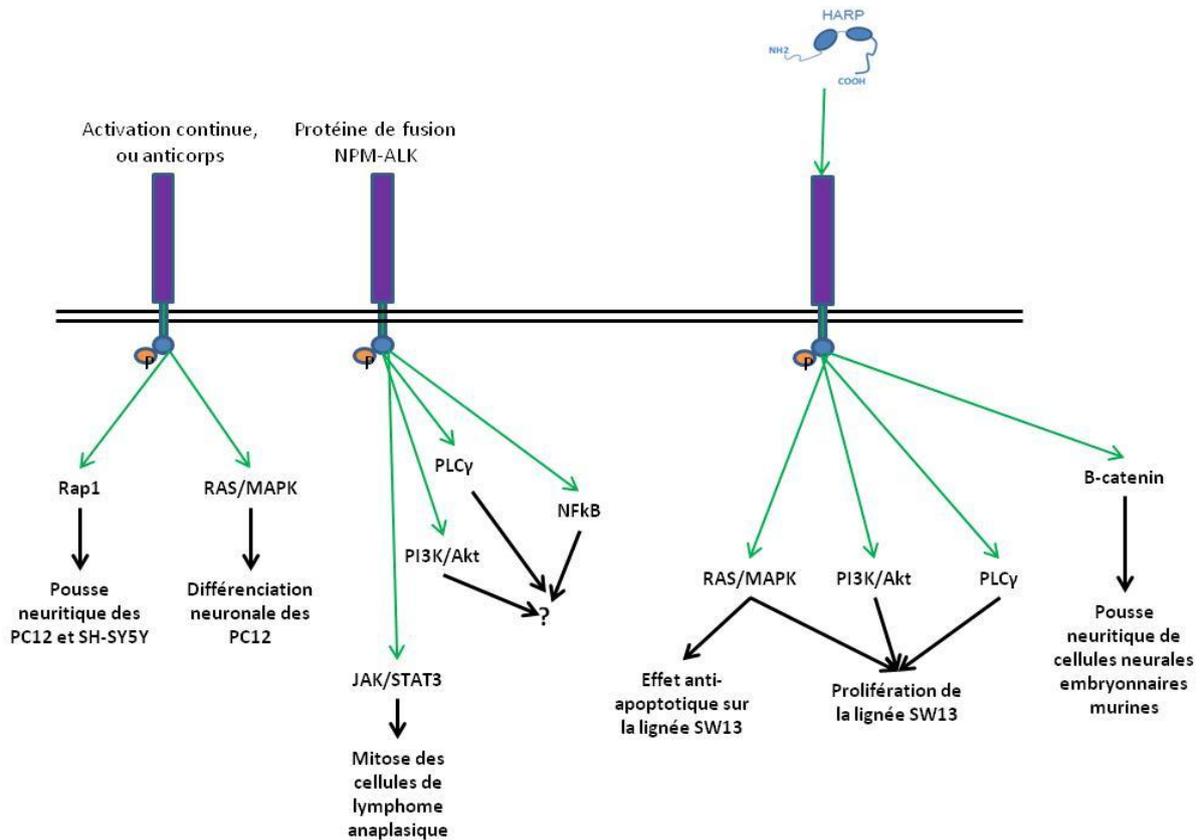


Figure 4 Voies de signalisation intracellulaires activées par ALK

ALK peut activer de nombreuses voies intracellulaires. Cependant, seules certaines ont été montrées comme pouvant être activées par HARP. Chaque type d'activation de ALK impliqué est indiqué au dessus du récepteur. Les flèches vertes représentent les voies activées par le récepteur. Les flèches noires représentent les activités cellulaires qui ont été associées aux voies de signalisation activées.

2.2 RPTP ζ

RPTP ζ appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine phosphatase. Le domaine extracellulaire de ce récepteur est composé de trois parties : un domaine N-terminal “carbonic anhydrase like”, un domaine “fibronectine III like” et un domaine riche en sérine-glycine qui est le site d’ancrage des chondroïtines sulfates (Krueger and Saito, 1992). Quatre isoformes de RPTP ζ ont été décrites, 2 formes, longue et courte, rattachées à la membrane et 2 formes solubles longue et courte appelées phosphacan. Les 2 formes courtes ne présentent pas de séquence de fixation des chondroïtines sulfates (Garwood et al., 2003) (Figure 5). RPTP ζ présente deux sites de fixation à HARP ($K_d=3nM$ et $K_d=25nM$) (Maeda et al., 1996). L’affinité de RPTP ζ pour HARP est modulée par les chaînes de chondroïtines sulfate portées par le récepteur, en effet, une digestion enzymatique par la chondroïtinase ABC induit une baisse de l’affinité pour les deux sites de fixation de HARP (Maeda et al., 2003).

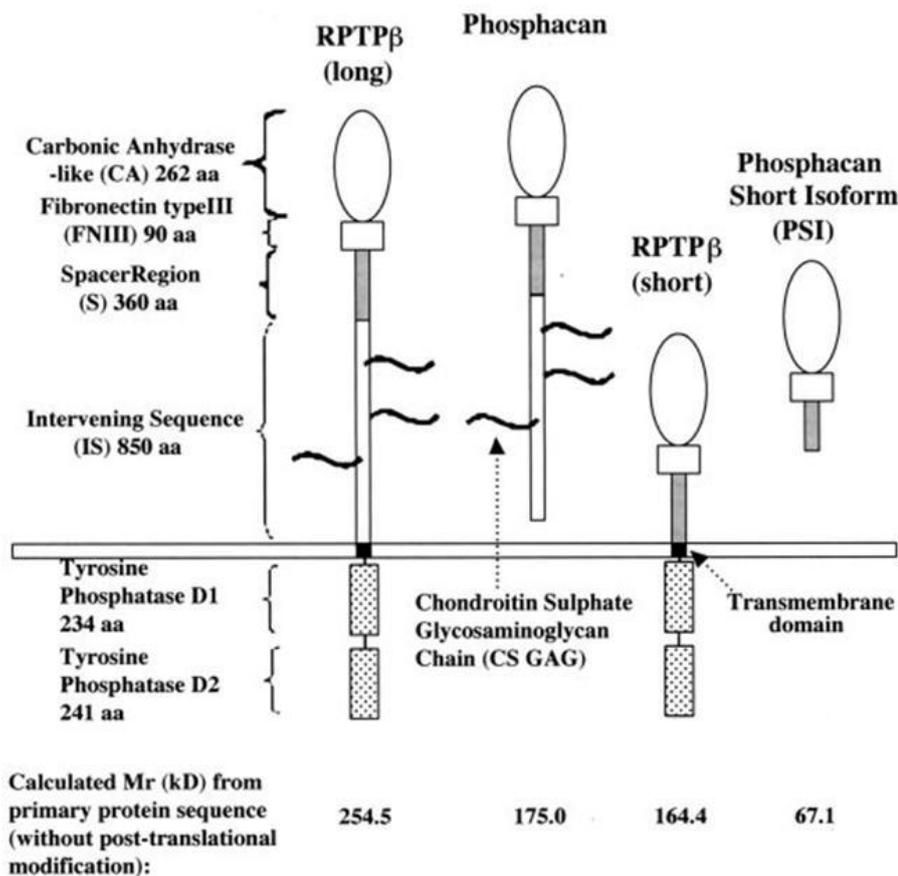


Figure 5 Représentation schématique de l’organisation en domaine des quatre isoformes de RPTP ζ (Garwood et al., 2003).

Les domaines “carbonic anhydrase” et “fibronectine III” sont en commun pour les 4 isoformes. Les isoformes tronquées ne présentent pas la séquence riche en sérine-glycine nécessaires à la fixation des chaînes de chondroïtines sulfate

L'action de HARP sur ce récepteur passe par une voie originale : la fixation de HARP induit la dimérisation de RPTP ζ et un changement conformationnel bloquant l'accès des substrats aux sous-unités catalytiques, inhibant ainsi son activité phosphatase. Cette modification permet l'accroissement de la phosphorylation de ses cibles intracellulaires (Perez-Pinera, Berenson, and Deuel, 2008). Polykratis et al. ont montré que la liaison de HARP à RPTP ζ dans des cellules HUVEC conduisait à une hausse du taux de phosphorylation de la Src kinase, la Focal Adhesion Kinase (FAK), la Pi3k, les ERK1/2. La répression de l'expression de RPTP ζ par des ARN interférents dans les HUVEC conduit à l'arrêt des signaux intracellulaires médiés par HARP. Ces modifications sont associées à une inhibition de la migration, et de la formation de tube en matrigel par des cellules endothéliales HUVEC (Polykratis et al., 2005). La fixation de HARP à RPTP ζ dans la lignée de neuroblastome B103 induit une augmentation de la phosphorylation de p190RhoGAP. Cette interaction a été associée à une baisse de la mémorisation spatiale. Des souris sauvages ou KO pour RPTPz ont été placées dans une cage différente de leurs cages de stabulation et soumises à des chocs sonores et électriques pour associer cet environnement à la peur. Trois jours après le conditionnement, les souris sauvages montraient toujours des signes de peur (immobilisation de l'animal) alors que les animaux KO avaient un comportement normal dans ces conditions normalement associées à la peur. Aucun effet de l'inactivation de RPTPz n'a été rapporté sur la peur innée à la lumière, indiquant ainsi un effet sur la mémorisation contextuelle (Tamura et al., 2006).

Des modèles de double hybride de levure ont identifié que le domaine intracellulaire de RPTP ζ se liait à la β -adducine, la β -caténine et Fyn. Il a ensuite été validé que la liaison de HARP à RPTP ζ activait ces voies dans la lignée Hela (Pariser et al., 2005a; Pariser et al., 2005b). Des expériences sur la lignée de glioblastome U373-MG ont confirmé que la β -caténine était une cible intracellulaire de RPTP ζ (Meng et al., 2000). Enfin des études sur une lignée de cellule rénale de lapin ont montré une activation de la membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ containing domain (MAGI) par l'intermédiaire de RPTP ζ (Fukada et al., 2006).

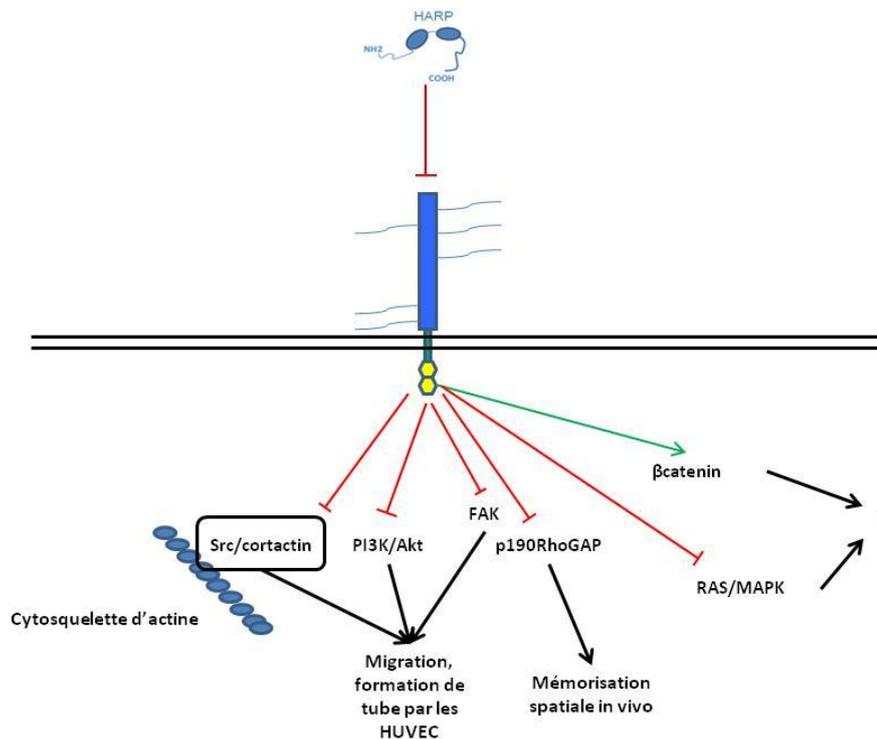


Figure 6 Voies de signalisation intracellulaires activées par RPTPζ

RPTPζ peut agir sur de nombreuses voies intracellulaires. Les flèches rouges représentent les inhibitions, les flèches vertes représentent les activations et les flèches noires représentent les activités cellulaires qui ont été associées aux voies de signalisation activées.

2.3 SDC3

Le SDC3 a été le premier récepteur décrit de HARP (Raulo et al., 1994). Il fait partie de la famille des Syndécan, une famille de protéoglycannes à chaîne d'héparane sulfate (Carey et al., 1997; Couchman, 2010). Le SDC3 peut cependant porter 3 à 4 chaînes de chondroïtines sulfate (Raulo et al., 1994). Les syndécans partagent deux séquences intracytoplasmiques médiant les interactions avec le système Src/cortactin, et l'eZRin (organisation du cytosquelette et des jonctions intercellulaires) pour le domaine 1 et avec les molécules de type "PDZ" (régulation de l'emplacement intracellulaire de ses protéines cibles) pour le domaine 2. Entre ces deux domaines, une séquence variable, spécifique pour chaque type de syndécan, permet l'interaction spécifique avec d'autres protéines de différentes voies de signalisation. Les interactions de la séquence variable du SDC3 avec les protéines intracellulaires ne sont pas connues (pour revue (Couchman, 2010)).

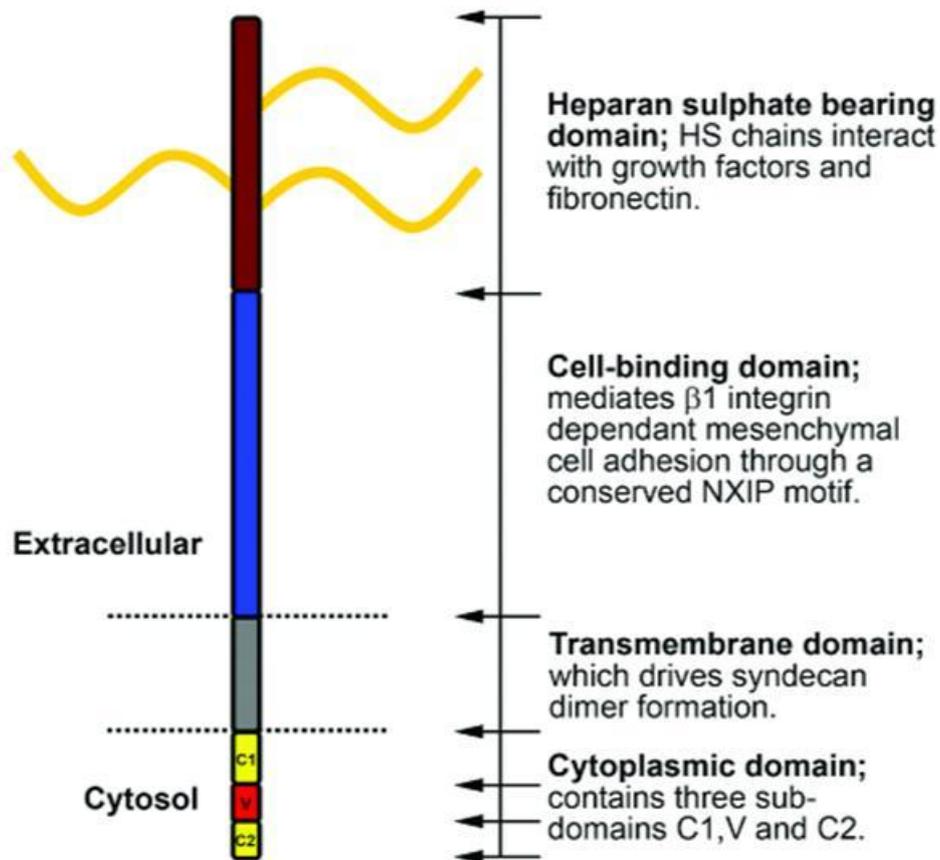


Figure 7 Représentation schématique de l'organisation en domaine des syndécans (D'après (Multhaupt et al., 2009)).

Le core protéique des SDC est organisé en 4 domaines. Le domaine apical comprend les sites de fixation des chaînes de HS. Un domaine de fixation des intégrines se situe entre le domaine glycosylé et le domaine membranaire. Le domaine membranaire contient des séquences qui lui permettent de former des homodimères de SDC. Enfin, le domaine intracellulaire comprend 2 domaines C1 et C2, conservés entre les différents SDC. Ces deux domaines sont séparés par une zone variable spécifique à chaque SDC.

Le SDC3 serait impliqué dans le contrôle de la potentialisation à long terme des neurones de l'hippocampe, ce phénomène est associé à la mémorisation. En effet, les souris inactivées pour le gène du SDC3 montrent une augmentation de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe et cette suractivation neuronale est associée à une baisse de la capacité d'apprentissage chez ces animaux (Kaksonen et al., 2002). Le SDC3 a également été associé au développement ostéoarticulaire. En effet, la surexpression du SDC3 dans le radius et l'ulna d'embryon de poulet conduit à une baisse de la formation osseuse visible par une absence de calcification et d'invasion ostéoblastique dans les ébauches cartilagineuses des membres (Pacifici et al., 2005). Aucune étude ne s'est pour l'instant intéressée au phénotype osseux des souris inactivées pour le SDC3.

Le SDC3 fixe HARP avec une constante de faible affinité ($K_d = 0.6nM$), la fixation a lieu par l'intermédiaire des domaines TSR1 de HARP (Raulo et al., 2006). Nolo et coll. ont montré que HARP et le SDC3 sont co-exprimés durant le développement cérébral du rat (Nolo et al., 1995). Leur action

commune passerait par une activation des voies Src et Fyn qui induiraient l'interaction de la cortactine et des microtubules, permettant ainsi un réarrangement du cytosquelette à l'origine de la migration des neurones et de la pousse neuritique (Hienola et al., 2006; Kinnunen et al., 1998).

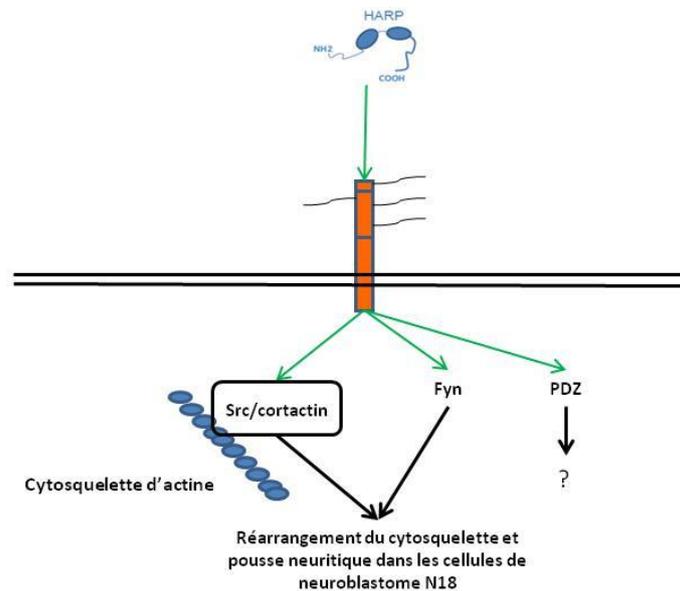


Figure 8 Voies de signalisation intracellulaires activées par le SDC3

SDC3 peut agir sur de nombreuses voies intracellulaires. Les flèches vertes représentent les activations et les flèches noires représentent les activités cellulaires qui ont été associées aux voies de signalisation activées.

2.4 Nucléoline

La nucléoline a tout d'abord été décrite comme une protéine nucléaire (Prestayko, Lewis, and Busch, 1973) où elle joue un rôle dans la transcription par l'ARN polymérase II, dans la réparation, la recombinaison et la réplication de l'ADN, la réponse au stress cellulaire, l'activité chaperonne d'histone et le transport de molécules entre le noyau et la surface cellulaire. Toutes ces fonctions sont liées à la régulation du cycle cellulaire (Srivastava and Pollard, 1999). Enfin, elle a été impliquée dans le transport de molécules entre le noyau et la surface cellulaire. En plus de son rôle de navette, il a été montré que la nucléoline était capable d'activer la voie des MAP kinase par la kinase K-Ras (Inder et al., 2009), mais aussi la voie Pi3k (Barel, Le Romancer, and Frade, 2001) (Figure 9).

Take et al. ont démontré que HARP était un des ligands de la nucléoline de surface (Take et al., 1994). Il a été montré au laboratoire que cette interaction empêche l'internalisation du virus du sida dans les cellules CD4+ (Said et al., 2002). L'interaction de la nucléoline avec HARP implique les domaines TSR, principalement le domaine C-TSR (Said et al., 2005).

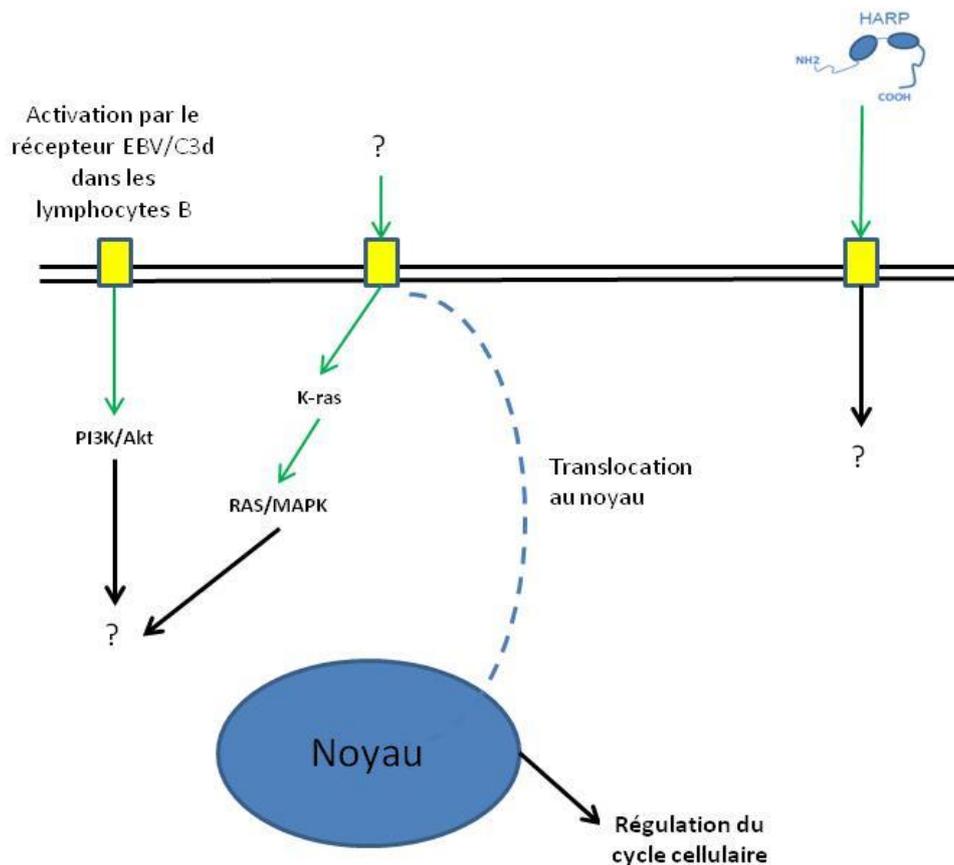


Figure 9 Voies de signalisation intracellulaires activées par la nucléoline

La nucléoline peut agir sur de nombreuses voies intracellulaires. Les flèches vertes représentent les activations et les flèches noires représentent les activités cellulaires qui ont été associées aux voies de signalisation activées.

3 Fonctions pléiotrophes de HARP

HARP est exprimé dans de nombreux tissus au cours du développement, son expression décroît chez l'adulte. HARP est cependant de nouveau exprimé durant la régénération tissulaire ou en situation pathologique.

3.1 HARP et développement vasculaire

Lors de son isolement au laboratoire CRRET, HARP a tout d'abord été décrit comme un agent mitotique sur les cellules endothéliales bovine (Courty et al., 1991). Une étude a confirmé cet effet mitotique sur des cellules endothéliales humaines de capillaire, mais a également montré que HARP induisait la formation de tube en matrigel par ces cellules (Laaroubi et al., 1994). In vivo, des expériences d'injection de plasmides codant pour HARP dans des myocards ischémiés a induit la formation de nouveaux vaisseaux possédant une apparence et des fonctions normales et se connectant

aux vaisseaux pré existant (Christman et al., 2005). Il a également été montré que HARP induisait la transdifférenciation des monocytes en cellules endothéliales fonctionnelles (Sharifi et al., 2006). Ce phénomène peut être impliqué dans la vascularisation des tumeurs surexprimant HARP. En effet, des expériences de tumorigénèse in vivo ont montré que l'implantation de cellules NIH-3T3 surexprimant constitutivement HARP dans le flanc de souris immunodéprimée conduisait à la formation de tumeurs plus vascularisées qu'avec l'implantation de cellule non transfectées (Chauhan, Li, and Deuel, 1993). Il existe cependant des données montrant un effet inhibiteur de HARP sur l'angiogénèse. En effet, une étude a montré que HARP pouvait se lier au VEGF et inhiber ainsi la formation de tube par les HUVECs in vitro (Heroult et al., 2004). Il a également été montré que HARP pouvait inhiber l'expression du "kinase insert domain receptor" (KDR), récepteur du VEGF, dans les cellules endothéliales (Kokolakis et al., 2006). Ces données montrent l'implication de HARP dans l'angiogénèse, cependant ses propriétés angiogéniques semblent varier en fonction de l'organe ou du type cellulaire étudié. Il serait intéressant d'évaluer son rôle durant les phénomènes de régénération qui nécessitent une vascularisation efficace.

3.2 HARP et cancer

HARP a été largement décrit comme étant impliqué dans la progression du cancer, en effet, il est surexprimé dans plusieurs lignées tumorales ainsi que dans des échantillons tumoraux prélevés chez le patient (pour revue (Papadimitriou et al., 2009)). L'inactivation de HARP par des shARN ou des anticorps conduit à la réduction de la taille des tumeurs implantées chez la souris immunodéprimée, probablement par un effet sur la prolifération des cellules mais aussi par un effet bloquant de l'angiogénèse induite par HARP. Récemment, la surexpression de HARP dans les lignées de cellules cancéreuses d'ostéosarcome a été associée, par des expériences de puces à ADN, à la résistance aux chimiothérapies (Walters et al., 2008).

3.3 HARP et inflammation

HARP est également impliqué dans les processus inflammatoires (Muramatsu, 2002). En effet, il a été montré que le traitement in vitro de cellules mononuclées du sang périphérique par HARP induisait la production de cytokine pro-inflammatoire telle que le TNF- α , l'IL1 β et l'IL6 (Achour et al., 2008). De plus, dans les modèles de fibroses péritonéales murines, impliquant une forte inflammation, HARP est surexprimé par les cellules bordant le péritoine (Yokoi et al., 2012).

3.4 HARP et développement cérébral

HARP est fortement exprimé durant le développement du système nerveux. Des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons de souris ont montré son expression au niveau de la moelle épinière, dans les vésicules otiques, dans le diencephale et dans le mésencéphale (Yanagisawa et al., 2010). La déficience en HARP chez la souris résulte en une augmentation de 50% de la densité neuronale dans le cerveau (Hienola et al., 2004). Une étude utilisant l'électrophysiologie sur coupe d'hippocampe murin a montré que HARP inhibait la potentialisation à long terme des neurones. Ce phénomène a été associé à une potentialisation de l'apprentissage chez les souris KO pour PTN. Des souris ont été placées dans un labyrinthe à trois branches, après avoir été confinées dans deux des branches, on leur a donné accès à la troisième branche. La mémorisation a été mesurée par le temps passé à explorer un lieu inconnu (la troisième branche). Après un temps défini, les animaux subissent le même test et les temps d'exploration entre le conditionnement et le deuxième test sont comparés. Alors que les souris sauvages ont montré le même temps d'exploration de la troisième branche après 30 min de repos entre les deux tests, les souris KO n'ont pas passé de temps à explorer la troisième branche, qu'elles connaissaient déjà, jusqu'à 60 min après le premier test. Ces expériences montrent l'importance de HARP dans les phénomènes d'apprentissage (del Olmo et al., 2009). Des expériences ont montré que HARP améliorait la survie des neurones dopaminergiques. Lors de blessure induite du striatum ciblant spécifiquement les neurones dopaminergiques, on observe une augmentation de l'expression de HARP. L'hypothèse sous-jacente à cette expression est que HARP permettrait la survie des neurones dopaminergiques toujours présents et serviraient à entamer un processus de réparation de la lésion (Hida et al., 2003).

3.5 Autres fonctions de HARP

HARP a été montré comme inhibant la différenciation adipocytaire de la lignée murine pré adipocytaire 3T3-L1 en passant par les voies PI3K/Akt GSK3 β / β -caténine (Gu et al., 2007). Ces deux voies sont également impliquées dans la différenciation chondrocytaire hypertrophique (Chen et al., 2008; Ulici et al., 2008). HARP pourrait donc permettre d'inhiber la formation de tissu adipeux sur les sites de régénération osseux.

Deux articles récents ont montré que HARP inhibe la pénétration du virus de l'immunodéficiência humaine dans les cellules (Said et al., 2005) mais, associé aux cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β et IL-6, HARP induit la réplication du virus par les cellules infectées (M'Bika et al., 2010).

Il semblerait que l'hélice aléatoire C-terminale et le domaine N-TSR de HARP possède des propriétés antibactériennes en détruisant la membrane plasmique de bactéries Gram+ comme Gram-

(Svensson et al., 2010). L'association de HARP dans des protocoles de régénération tissulaire pourrait diminuer les risques d'infections.

4 HARP et le tissu cartilagineux

HARP a également été impliqué dans le système ostéoarticulaire qui est décrit dans les 2 paragraphes suivants.

4.1 Le tissu cartilagineux

Le cartilage est un tissu fortement hydraté (près de 70% de sa masse). Sa forte concentration en eau lui confère une résistance aux forces de compression. Le cartilage est avasculaire, les chondrocytes vivent donc en hypoxie. La vascularisation du cartilage est observée uniquement lors de l'ossification de la matrice dans la croissance osseuse endochondrale et dans l'arthrose. Il existe 3 types différents de tissus cartilagineux tous issus du feuillet mésodermique.

-Le cartilage hyalin est principalement constitué d'eau, de collagène de type 2 et de protéoglycannes dont le principal est l'aggrécane. On y retrouve aussi des réseaux isolés de fibres élastiques. Le cartilage hyalin est situé dans le cartilage articulaire, les cartilages costaux, le tractus respiratoire et les cartilages de conjugaison (plaque de croissance).

-Le cartilage élastique est riche en fibres élastiques et en collagène 2. Il est retrouvé au niveau de l'oreille externe, des trompes d'Eustache et de l'épiglotte.

-Le fibrocartilage est constitué de fibre de collagène 1, on le retrouve principalement dans les disques intervertébraux au niveau de l'*annulus fibrosus* et au niveau de la symphyse pubienne. Il serait aussi retrouvé comme tissu cicatriciel lors des blessures du cartilage hyalin.

Nous nous intéresserons dans ce manuscrit au cartilage de type hyalin retrouvé dans les articulations chez l'adulte et dans les ébauches des membres chez l'embryon.

Le cartilage hyalin est présent chez l'adulte au niveau des articulations. Il forme aussi les ébauches des membres chez l'embryon. Au niveau articulaire, les chondrocytes sont des cellules au cycle cellulaire long, enchâssées dans une matrice extracellulaire constituée principalement de glycosaminoglycannes et de collagène 2. Le cartilage articulaire est avasculaire et non innervé, les nutriments et l'oxygène se diffusent au travers de la matrice à partir des vaisseaux de l'os sous chondral. Le cartilage articulaire est organisé en 6 couches. Les chondrocytes de la zone superficielle sont plutôt nombreux, ont une morphologie aplatie et une faible activité métabolique. Lorsque l'on

pénètre dans les couches, les chondrocytes sont de moins en moins nombreux, et plus actifs métaboliquement (Ge et al., 2006) (Figure 10).

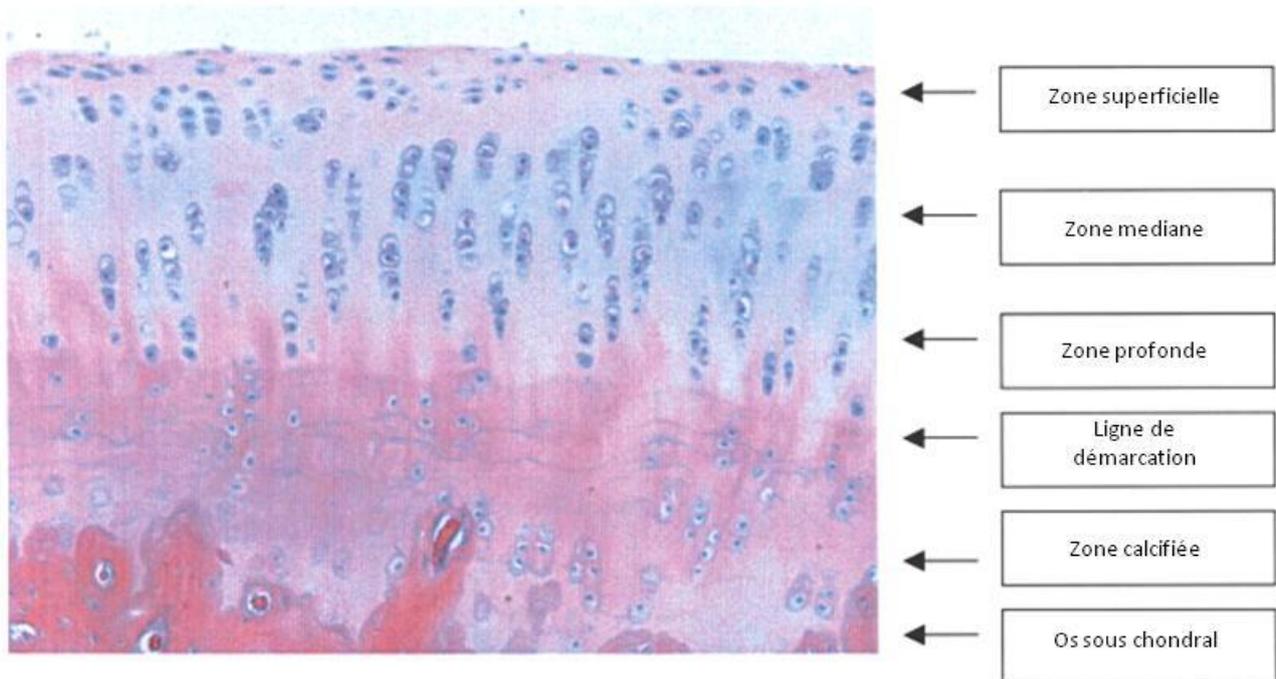


Figure 10 Morphologie du cartilage articulaire (D'après (Ge et al., 2006))

Le cartilage articulaire est organisé en 6 couches. Les chondrocytes de la zone superficielle sont plutôt nombreux, ont une morphologie aplatie et une faible activité métabolique. Lorsque l'on pénètre dans les couches, les chondrocytes sont de moins en moins nombreux, et plus actifs métaboliquement

4.2 HARP et physiologie du tissu cartilagineux

4.2.1 HARP et cartilage articulaire

HARP fut associé pour la première fois au développement du cartilage grâce aux travaux de Neame et al. (Neame et al., 1993). En effet, des extraits de protéines totales de cartilage épiphysal et nasal de veaux fœtaux contenait 15 μ g de HARP/g de poids sec de cartilage alors que HARP était présent seulement à l'état de trace voir indétectable dans le cartilage articulaire mature de bœuf. Ces résultats furent confirmés par Azizan et al. et Tapp et al. qui montrèrent une absence de HARP chez l'adulte, au niveau protéique comme au niveau de l'expression génique, dans le cartilage articulaire chez les bovins (Azizan et al., 2000; Tapp et al., 1999). Cette expression de HARP durant le développement cartilagineux fœtal a été retrouvée chez le rat (Imai et al., 1998; Vanderwinden et al., 1992), la souris (Imai et al., 1998) et le poulet (Dreyfus et al., 1998b).

Durant la même période, il a été montré que l'ajout de HARP à des cultures en culot de précurseurs chondrogéniques de bourgeons de pattes de poulet permettait de potentialiser la différenciation chondrogénique de ces cellules (Dreyfus et al., 1998a). Cette potentialisation a été

observée par une coloration des glycosaminoglycannes sulfatés au bleu alcian de la boulette complète. Des études réalisées sur des chondrocytes articulaires matures de bœuf, n'exprimant pas HARP, ont montré que l'ajout de HARP exogène avait un effet inhibiteur dose dépendant sur leur prolifération. Cet effet antiprolifératif est associé à une augmentation de la synthèse des cores protéiques de l'aggrécane, du biglycane et de la decorine et à une augmentation de l'incorporation de glucosamine et de sulfate, suggérant un effet potentialisateur de la synthèse de protéoglycannes et de glycosaminoglycannes, marqueurs de la différenciation chondrocytaire (Tapp et al., 1999). Parallèlement, l'ajout de HARP exogène sur des chondrocytes fœtaux, exprimant fortement HARP, n'a aucun effet sur leur prolifération et leur différenciation

4.2.2 HARP, le cartilage de conjugaison et la croissance endochondrale

Le développement du tissu osseux passe par l'ossification d'une esquisse cartilagineuse au niveau du cartilage de conjugaison. Le cartilage de conjugaison présente 4 zones principales, dans lesquelles les chondrocytes sont à différentes étapes de différenciations (Figure 11). Les chondrocytes de la zone de quiescence présentent une prolifération faible et ressemblent morphologiquement à ceux du cartilage hyalin. Les chondrocytes de la zone de prolifération s'organisent en chapelet cellulaire jusqu'à la zone dite préhypertrophique où les cellules grossissent et changent leur production protéique matricielle. La zone hypertrophique contient des chondrocytes dont le corps cellulaire est beaucoup plus gros que les chondrocytes articulaires, leur production de collagène 2 diminue fortement et ils commencent à synthétiser du collagène de type 10. La matrice de la zone hypertrophique est minéralisée et subie une invasion vasculaire. Cette angiogénèse permet l'arrivée de monocytes/macrophages qui se différencient en chondroclastes, cellules participant au remodelage de l'ébauche cartilagineuse. Concomitamment, des progéniteurs ostéoblastiques sont recrutés sur le site, permettant ainsi une synthèse de matrice ostéoïde composée principalement de collagène de type 1 qui sera enfin minéralisée pour donner naissance à la matrice osseuse proprement dite (pour revue (Olsen, Reginato, and Wang, 2000)).

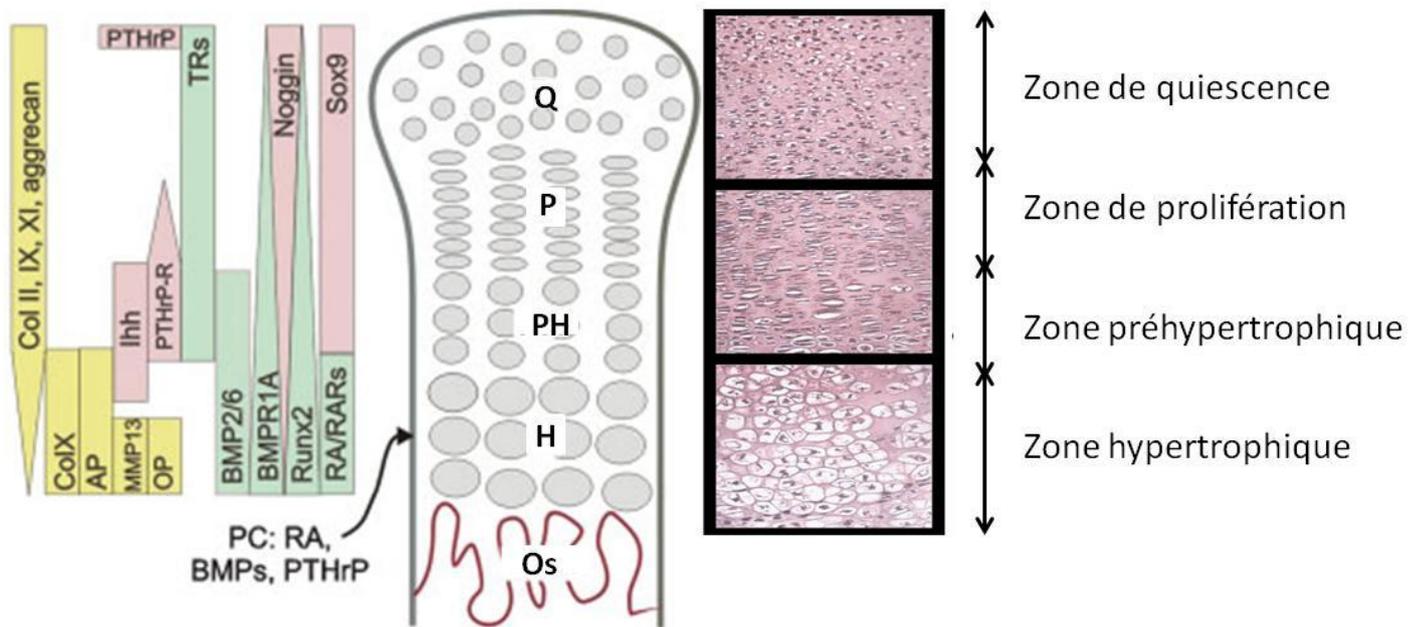


Figure 11 La croissance endochondrale dans les os longs (D'après (Adams, Cohen, and Lasso, 2007; Ulici et al., 2008))

La croissance endochondrale implique l'activation des chondrocytes de la zone de quiescence vers un phénotype prolifératif permettant la pousse de l'os en longueur et en épaisseur. Les chondrocytes s'hypertrophient ensuite et entrent en apoptose permettant une invasion vasculaire et ostéoblastiques. Durant ces phénomènes divers facteurs de croissance et de différenciation ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire sont exprimés par les chondrocytes.

HARP a été immunolocalisé dans le cartilage de croissance dans la zone hypertrophique chez le poulet et la souris, indiquant un rôle de HARP dans la croissance osseuse endochondrale (Dreyfus et al., 1998b; Petersen and Rafii, 2001). La cinétique de l'expression de HARP dans le tibia en développement a été bien décrite chez le poulet. L'expression de HARP au niveau ARN apparait au 5^e jour après fécondation dans les progéniteurs chondrocytaires, soit 2 jours après la condensation des cellules mésenchymateuse formant la première ébauche du membre. Au 7^e jour, l'expression génique de HARP est localisée au niveau des chondrocytes de la zone de prolifération tandis que la protéine est retrouvée au niveau de la zone hypertrophique. Une baisse de la présence de HARP est observée lors de la vascularisation de la matrice du cartilage hypertrophique au 11^e jour (Dreyfus et al., 1998b). Dans la croissance des bois des cerfs, qui ressemble à la croissance endochondrale, HARP est retrouvé dans la zone dite de précartilage qui précède la différenciation chondrocytaire proprement dite des cellules mésenchymales (Clark, Lord, and Suttie, 2006). Corrélant ces observations, HARP a été localisé au niveau des ébauches cartilagineuses des membres des rats, alors que son récepteur le SDC3 n'est localisé que plus tard au niveau de la zone minéralisée des plaques de croissance (Imai et al., 1998). Ces résultats suggèrent l'implication de HARP dans le processus de différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance.

La culture de cartilage nasal d'embryon de poulet et de plaques de croissance de rat en présence de HARP conduit à la production de collagène 1, un marqueur de la différenciation

hypertrophique des chondrocytes (Tare et al., 2002a). Cette observation a été confirmée chez les souris surexprimant HARP, en effet, la matrice du cartilage articulaire de ces animaux présentait un marquage pour le collagène 1 (Tare et al., 2002b). Les souris surexprimant HARP ont des plaques de croissances plus étendues que les souris sauvages, étonnamment, cette observation est associée à un ralentissement de la croissance des animaux (Imai et al., 1998).

4.3 HARP et pathologies du tissu cartilagineux

Durant l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde humaine, des niveaux élevés de HARP sont retrouvés dans le liquide synovial (Pufe et al., 2003a; Pufe et al., 2003b). Les chondrocytes de cartilage arthrosique expriment HARP au niveau génique et protéique alors que le cartilage sain est largement négatif pour son expression. Les chondrocytes arthrosiques en culture expriment le récepteur ALK et les chondrocytes articulaires des zones arthrosées présentent des marquages spécifiques pour ALK. Dans les dernières phases de progression de l'arthrose, le SDC3 et ALK sont exprimés par les chondrocytes (Pfander, Swoboda, and Kirsch, 2001) Le traitement de chondrocytes normaux par HARP induit l'expression de ALK, que ce soit à partir de culture primaire ou de lignée chondrocytaire. Ce même traitement induit l'expression de HARP, de TIMP1 et 2 et inhibe l'expression des MMP1 et MMP13. (Pufe et al., 2003b).

La tendinopathie est une maladie dégénérative et inflammatoire du tendon due à son utilisation excessive, caractérisée entre autre par une différenciation chondrocytaire des ténocytes, la composante cellulaire du tendon. Cette différenciation chondrocytaire peut atteindre le stade hypertrophique et amener à une ossification de type endochondrale du tendon (O'Brien et al., 2012). Des travaux récents de notre laboratoire ont montré une corrélation entre l'accumulation de HARP dans la matrice et le développement d'une tendinopathie dans un modèle de sur-utilisation du tendon supra épineux chez le rat par une course sur tapis (Attia et al., 2011). Chez les rats ayant couru, l'expression du collagène 1, collagène principal du tendon, est diminuée, tandis qu'une augmentation de l'expression du collagène de type 2, des protéoglycannes decorine, aggrecanne, versicanne et biglycane sont observées. Ces modifications sont accompagnées par une induction de l'expression de Sox9, un facteur de transcription spécifique de la différenciation chondrogénique. Ces modifications sont associées à une accumulation de HARP dans la matrice sans modification de son expression génique par les ténocytes.

Il semble y avoir une relation spatio temporelle entre la présence de HARP et la progression de la dégénérescence cartilagineuse ((Attia et al., 2011; Pufe et al., 2003a; Pufe et al., 2003b). Deux hypothèses existent quant aux rôles de HARP dans ces pathologies. La première, soutenue par les travaux de Pufe et al. montrant que HARP potentialise la synthèse de glycosaminoglycannes par les

chondrocytes suggère que HARP participerait à une stabilisation de la MEC et donc à un phénomène de régénération compensatoire de la matrice lésée. La deuxième hypothèse basée sur les propriétés angiogéniques de HARP postule que HARP permettrait l'invasion vasculaire de la matrice cartilagineuse, un des symptômes retrouvé dans le cartilage arthrosé, et ainsi aggraver la dégradation de la matrice.

5 HARP et le tissu osseux

5.1 Le tissu osseux

L'os est un tissu minéralisé possédant une fonction de soutien. Ce tissu est constitué en moyenne de 70% de minéraux (cristaux d'apatite), 10% d'eau et de 20% de matière organique, dont 90% de collagène de type I. En plus de son rôle de support mécanique pour la locomotion et de protection des organes internes, l'os est le site de l'hématopoïèse grâce à la moelle osseuse contenant les précurseurs des tous les éléments figurés du sang. Il joue également un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique de l'organisme, en effet, il contient près de 99% du calcium et 90% du phosphate du corps.

Il existe 2 types principaux d'os définis par leur origine embryonnaire et leur type d'ossification :

Les os plats, originaires de l'ectoderme (Olsen, Reginato, and Wang, 2000), dont la croissance se fait par une ossification dite endoconjonctive (ou membranaire). L'ossification membranaire implique une différenciation des cellules mésenchymateuses directement en ostéoblastes permettant une ossification directe de la matrice sans passer par une étape cartilagineuse. Les os plats sont les os de la calvaria et de la face.

-Les os long et courts, originaires du mésoderme (Olsen, Reginato, and Wang, 2000), grandissant par une croissance dite endochondrale (ou cartilagineuse). La croissance endochondrale se caractérise par une étape intermédiaire de formation matricielle cartilagineuse impliquant des chondroblastes avant une invasion ostéoblastique de la matrice permettant l'ossification proprement dite. Les os longs présentent 2 structures principales, l'os cortical présent à la périphérie de l'os et possédant des propriétés mécaniques de résistance, et l'os trabéculaire formant des travées dans la partie centrale de l'os où la moelle osseuse prend place. (Figure 12).

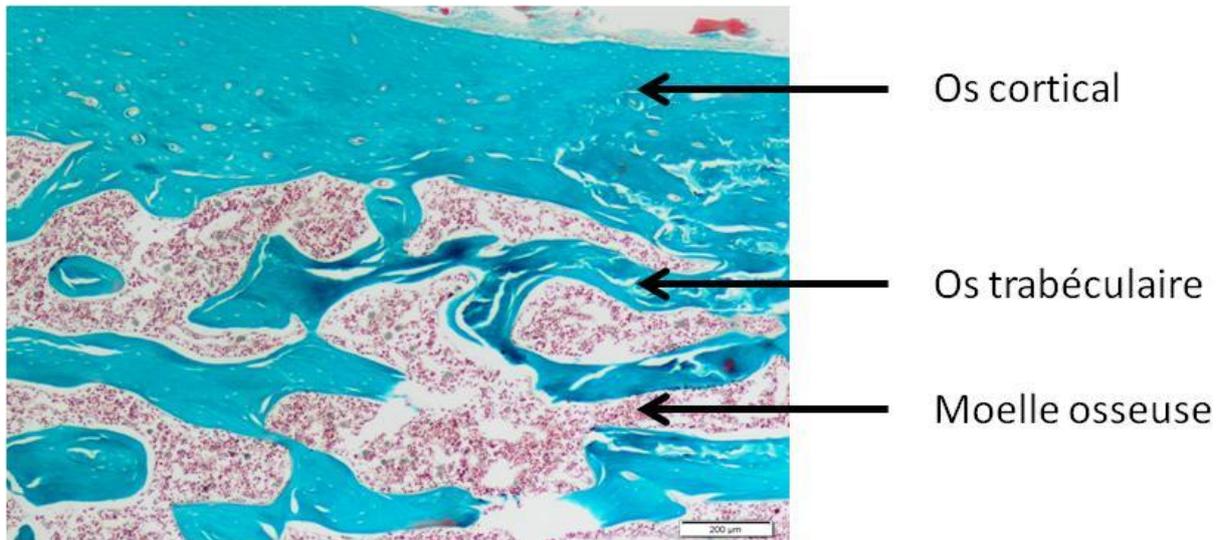


Figure 12 Structure de l'os (coupe de fémur de rat coloré au trichrome de Masson, x4).

L'os présente 2 structures principales, l'os cortical, à la périphérie, qui lui donne sa résistance à la compression et aux torsions et l'os trabéculaire, au centre, contenant la moelle osseuse.

5.1.1 Le remodelage osseux

L'os est un organe en remodelage constant par la dégradation de la matrice par les ostéoclastes et la synthèse de nouvelle matrice par les ostéoblastes (pour revue (Parfitt, 1994)). Le remodelage osseux permet l'adaptation du tissu aux contraintes mécaniques internes et externes et ainsi la conservation de ses fonctions mécaniques. L'intégrité tissulaire de l'os est assurée principalement par deux types cellulaires, les ostéoclastes qui sont des cellules hématopoïétiques dérivées des monocytes/macrophages qui dégradent la matrice et les ostéoblastes, cellules d'origine mésenchymateuses dérivées de cellules pré-ostéoblastique ou de cellules stromales mésenchymateuses qui synthétisent la matrice. L'os à l'état quiescent présente des cellules enchâssées dans la matrice appelées ostéocytes et des cellules bordant la surface osseuse appelées cellules bordantes ou ostéoblastes (Figure 13).

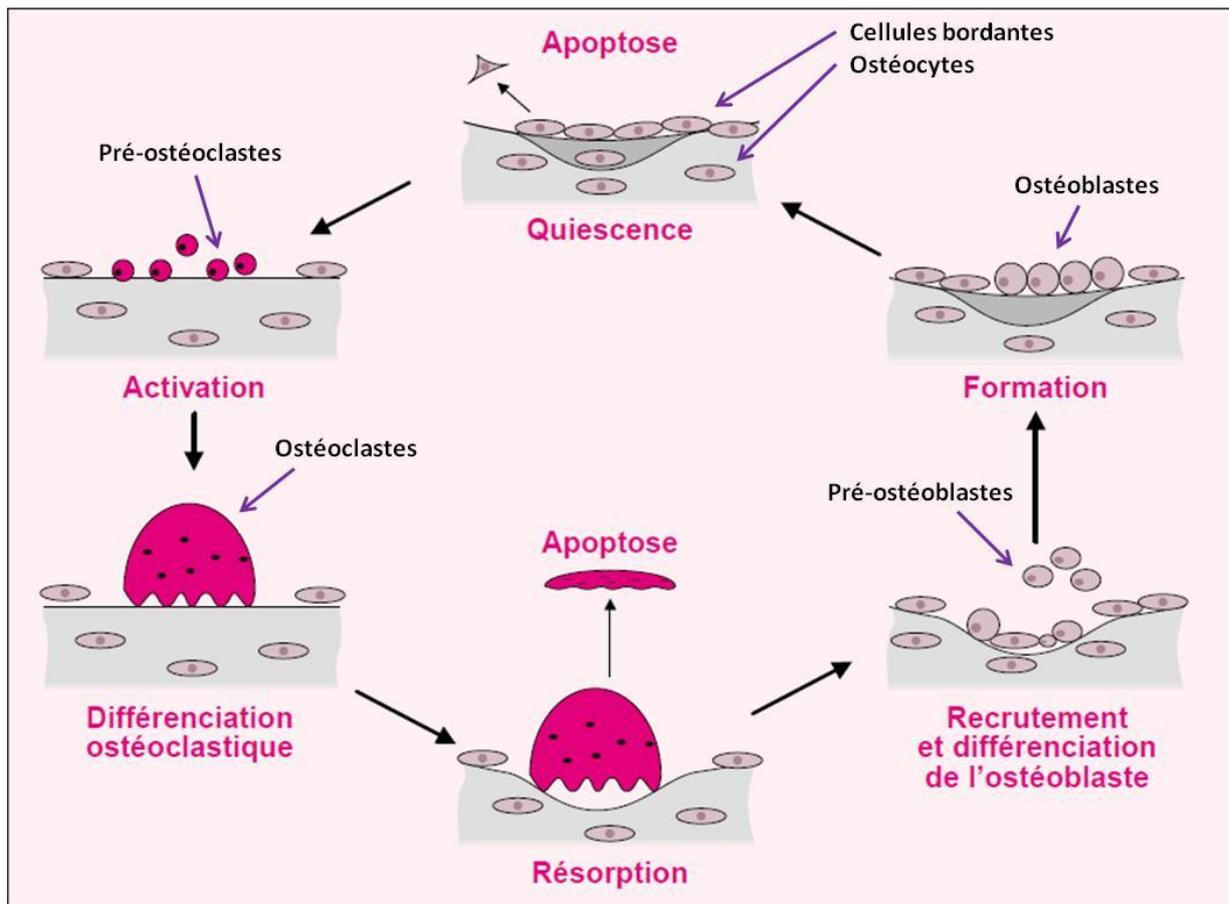


Figure 13 Le remodelage osseux (D'après (Marie, 2001))

La phase de résorption commence par l'activation des pré-ostéoclastes dérivés de la lignée monocyttaire en cellules matures capables de dégrader une région localisée de la matrice osseuse. Une phase proliférative des progéniteurs ostéoblastiques est ensuite observée, cellules qui migreront jusqu'à la zone dégradée (lacune de Howship). La phase de formation osseuse débute par la synthèse d'une nouvelle matrice non minéralisée (l'ostéoïde). Les ostéoblastes matures piégés dans la matrice se différencient en ostéocytes tandis que ceux en surface deviennent des cellules bordantes qui resteront quiescente jusqu'à ce qu'elle soit activées.

5.1.2 La régénération osseuse

La cicatrisation normale de l'os est un phénomène complexe impliquant la coordination de divers processus généralement caractérisés par quatre étapes se superposant (Figure 14).

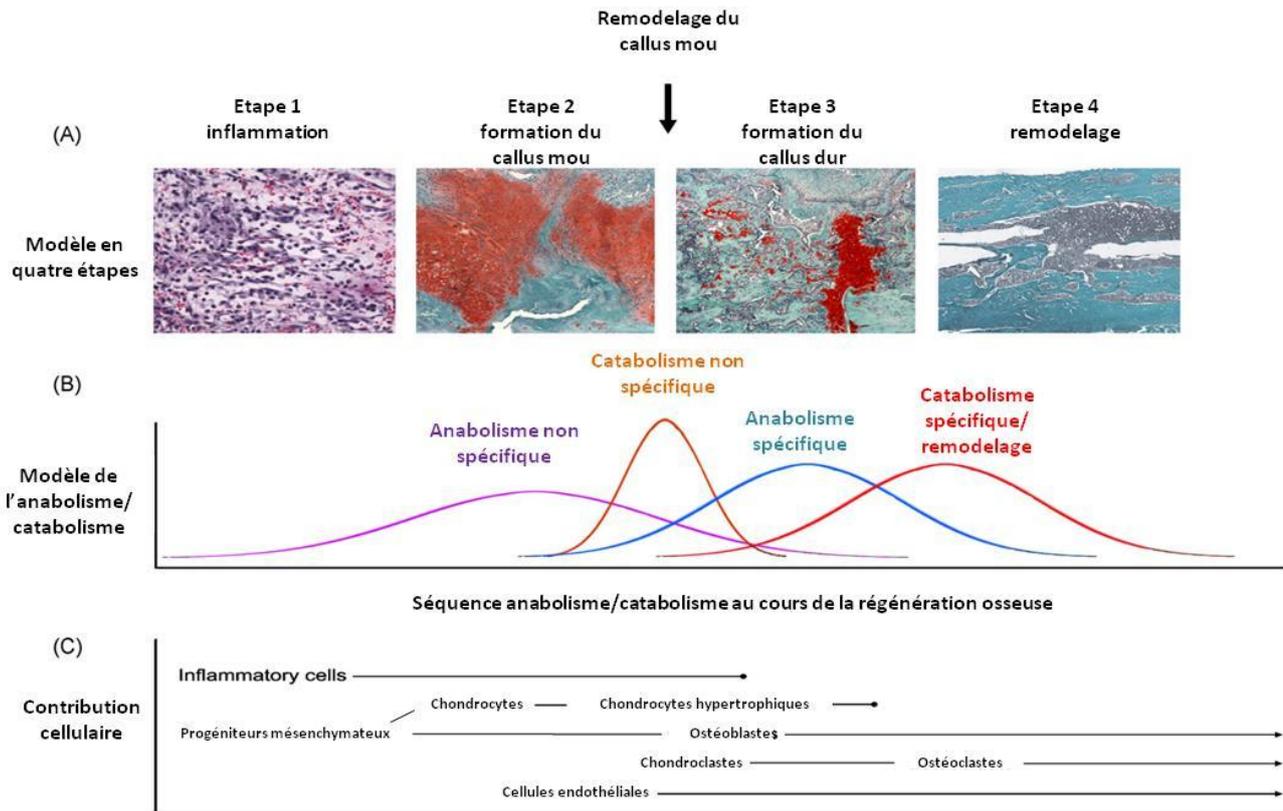


Figure 14 Schéma du modèle de la régénération osseuse et ses participants cellulaires (D'après (Schindeler et al., 2008))

La première phase non spécifique consiste en une inflammation participant à un anabolisme non spécifique. Cette étape est suivie de la formation d'un callus cartilagineux (étape 2) qui laissera place à un callus minéralisé par des ostéoblastes (étape 3) qui sera remodelé (étape 4) pour donner naissance à une nouvelle matrice fonctionnelle.

La première phase consiste en une inflammation non spécifique retrouvée dans tous les autres types de blessure. Le saignement qui accompagne la fracture se retrouve contenu par les tissus environnant et forme un hématome. Le site est ensuite envahi par de nombreuses cellules inflammatoires synthétisant de nombreuses cytokines (interleukines 1 et 6, $TNF\ \alpha$) et facteurs de croissance ($TGF\ \beta$ s, FGF-2, VEGF, PDGF, M-CSF). Le caillot subi ensuite une invasion vasculaire qui amène des cellules phagocytaires qui nettoieront les débris cellulaires. Cette première réponse facilite le recrutement de progéniteurs mésenchymateux venant du périoste, de la moelle osseuse, de la circulation et des autres tissus environnant.

L'étape suivante est caractérisée par la formation d'un callus fibro-cartilagineux (ou callus mou) qui servira de tuteur pour la formation osseuse proprement dite. A ce stade, l'os présente toujours une faible résistance aux forces de torsions et de pression. Le site de lésion doit donc être convenablement immobilisé afin d'éviter une destruction de la néo vascularisation, ce qui conduirait à des délais dans la réparation voir même à la formation de pseudarthrose.

Utilisant le patron formé par le callus mou, des pré-ostéoblastes synthétisent ensuite une matrice ostéoïde et la minéralisent donnant naissance au callus dur. Cette néo formation se produit à l'interface callus mou/os. Enfin, la dernière étape consiste en un remodelage du callus dur. Cet

événement récapitule les processus retrouvés dans le remodelage osseux décrit dans le paragraphe précédent (pour revue (Schindeler et al., 2008))

5.2 HARP et la physiologie du tissu osseux

L'ADNc de HARP a été isolé entre autre à partir de la lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1 et retrouvé dans la lignée d'ostéosarcome humain MG63, suggérant un rôle de HARP dans la physiologie osseuse. Cette hypothèse a été confortée par l'équipe du Pr Rauvala qui a montré que HARP induisait la migration de lignées de cellules ostéoblastiques humaines et de rat en chambre de Boyden mais aussi dans des conditions où HARP était immobilisé sur du plastique de culture (Imai et al., 1998). Ces observations furent reproduites par les équipes du Pr Wang et du Pr Oreffo (Li et al., 2005b; Yang et al., 2003). L'équipe du Pr Wang a aussi montré un effet intéressant de HARP sur les potentialités des progéniteurs ostéoblastiques issus de la moelle osseuse. En effet, l'addition de HARP à 10 pg/ml sur une culture primaire de moelle osseuse humaine permet, non seulement, d'augmenter la clonogénicité de progéniteurs ostéoblastiques mais aussi d'accroître le nombre de colonies positives pour la phosphatase alcaline, un marqueur de la différenciation ostéoblastique (Yang et al., 2003).

Des tests d'ostéoinduction sur une lignée murine myoblastique (C2C12) ont montré que, au contraire de la "Bone Morphogenetic Protein 2" (BMP2), le traitement par HARP seul n'induit pas de différenciation ostéoblastique. La différenciation ostéoblastique induite par la BMP2 est inhibée lorsque HARP est ajouté au milieu de culture dès le début de l'induction. Cependant, si HARP est ajouté après que la différenciation soit effective, une potentialisation de l'ostéoinduction caractérisée par l'activité phosphatase alcaline est observée (Tare et al., 2002a). Ces résultats suggèrent un rôle tardif de HARP dans la régulation de la différenciation ostéoblastique.

Des tests d'ostéoformation ectopique ont été réalisés afin de déterminer l'influence de HARP sur l'ostéoformation. Dans un modèle d'ostéoformation sous cutané chez le rat, l'association de HARP à des membranes de fibres de verre ne conduit à aucune formation osseuse. Cependant, on observe que l'association de HARP à de la BMP2 permet une augmentation du contenu calcique dans le support par rapport à la BMP2 seule (Sato et al., 2002). Ces résultats confortent les observations obtenues in vitro par Tare et al.. L'implantation de polymère d'acide lactique/glycolique associés à HARP et à des cellules prédifférenciées en ostéoblastes induit une formation osseuse et cartilagineuse après 6 semaines d'implantation sous cutanée alors que les polymères associés uniquement aux cellules ne permettent pas d'ostéoformation (Yang et al., 2003). HARP semble jouer un rôle principalement sur des cellules déjà différenciées, indiquant que HARP aurait principalement un effet dans les phases tardives de la différenciation et la calcification de la matrice. L'association de HARP à des biomatériaux ostéoinducteurs pourrait donc être intéressante dans le cadre des thérapies de régénération osseuse.

Dans les années 2000, des souris transgéniques surexprimant HARP (Tare et al., 2002b) ou inactivées (KO) pour HARP (Amet et al., 2001) ont été créées, permettant ainsi des études phénotypiques sur l'influence de HARP dans le tissu osseux. Les effets de l'inactivation de HARP sur le phénotype osseux sont controversés, en effet en 2004, Lehmann et al. n'ont observé aucune modification de la formation osseuse chez des souris KO par rapport à des souris sauvages (Lehmann et al., 2004), alors qu'en 2009, une étude plus approfondie de Imai et al. a montré que les os appendiculaires et scapulaires des souris KO étaient significativement plus courts que ceux des souris sauvages (Imai et al., 2009). Cette baisse de taille est associée à une diminution de la surface trabéculaire, du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Ces modifications sont associées à un remodelage moins important de l'os visible par une baisse de marquage à la calcéine, des marquages de l'activité phosphatase alcaline associée à la synthèse de matrice osseuse par les ostéoblastes et TRAP associée à l'activité de résorption par les ostéoclastes. Les propriétés biomécaniques des os de ces animaux sont aussi touchées avec une baisse de la résistance aux tests de cassures, reliée à une baisse globale de l'élasticité et de la rigidité de l'os. Cette différence semble être due à l'âge des animaux testés, Lhemann et al. ayant travaillé sur des animaux âgés de plus de 30 semaines et Imai et al. sur des animaux plus jeunes, âgés de 1 jour à 16 semaines.

Les souris surexprimant HARP présentent, elles, un phénotype osseux marqué. En effet, leur calvaria est près de 2 fois plus épaisse que celle des sauvages. Les animaux transgéniques atteignent moins vite leur taille adulte, mais cette différence est estompée à 30 semaines. Les animaux transgéniques présentent un contenu minéral osseux plus important (Tare et al., 2002b). Ces observations ont été confirmées par radiographie (Li et al., 2005a). Hashimoto et al. ont montré un phénotype osseux spécifiquement chez les femelles qui présentent une masse minérale et une densité osseuse plus importante. Ces modifications morphologiques sont associées à une augmentation des dépôts minéraux et de la formation osseuse des vertèbres et des fémurs. Les souris surexprimant HARP ont des os plus cassants que les souris sauvages, probablement à cause de leur fort contenu minéral qui conduit à une baisse d'élasticité (Hashimoto-Gotoh et al., 2004).

HARP semble donc être impliqué dans les phénomènes d'adaptation de l'os aux contraintes mécaniques de l'environnement, par une régulation du contenu minéral des os.

5.3 HARP dans les pathologies du tissu osseux

La pathologie principale touchant l'os est la fracture. L'os présente des capacités de régénération lorsqu'il est lésé, grâce aux capacités de synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire (MEC) par les cellules résidentes ou recrutées à partir des tissus environnants.

Des dosages sériques de HARP dans les sangs de patients ayant subis des fractures ont montré que les patients ayant eu une union osseuse avaient une plus forte concentration sérique de HARP dès

la première semaine du processus de réparation par rapport à ceux n'ayant pas eu de réparation spontanée (Weiss et al., 2009). Ce taux plus élevé a continué à augmenter durant les 8 premières semaines alors que les patients n'ayant pas réparé n'ont pas montré d'évolution de leur taux sérique de HARP.

Des expériences de fracture induites chez le rat ont montré la présence de HARP dans le callus fibreux formé 5 jours après la blessure, et dans le callus osseux, 10 jours après la fracture (Petersen and Rafii, 2001). Des expériences de défauts osseux induits chez la souris surexprimant HARP ont été réalisées par Li et coll. (Li et al., 2005a). Les callus de ces souris présentent une majorité de tissus fibreux et cartilagineux, de plus, le callus osseux s'est formé plus tardivement. Ces animaux présentent de plus des signes de réparations excessives localisés au niveau de la moelle osseuse en plus du site de lésion. Le traitement de la fracture avec une solution saline permet cependant une formation osseuse plus importante chez les animaux transgéniques que sauvages. Un traitement par de l'HARP exogène des souris transgéniques ou sauvages n'a pas modifié la réparation osseuse. De façon étonnante, le traitement du défaut par de la BMP2 chez les animaux transgénique a résulté en une formation d'os similaire à celle retrouvée chez les souris sauvages traités avec la solution saline.

Lors du vieillissement, on observe généralement une baisse de la densité osseuse associée à une diminution de la minéralisation des os, nommée ostéoporose. L'ostéoporose est un facteur de risque de fractures chez les personnes âgées, d'autant plus que leurs capacités de régénération sont diminuées.

Deux études ont impliqué HARP dans l'ostéoporose et le risque de fracture chez les personnes âgées. Une étude sur 530 femmes ménopausées a associé le polymorphisme du promoteur de HARP en position 1227 C>T à l'ostéoporose et aux fractures de la hanche résultantes (Mencej-Bedrac et al., 2011). De la même façon, une étude des variants génétiques associés à l'ostéoporose mâle effectuée sur une cohorte de près de 2000 hommes âgés de plus de 65 ans a montré une association entre le polymorphisme de HARP et la densité osseuse de la tête fémorale (Yerges et al., 2009). Des études de l'expression des gènes par microarray ont montré que les ostéoblastes de patients ostéoporotiques présentaient une baisse significative de l'expression de HARP par rapport à des patients non ostéoporotiques (Trost et al., 2010).

De façon plus anecdotique, les voyages dans l'espace induisent une modification morphologique de l'os, résultant en une baisse de l'organisation de l'os trabéculaire, ainsi qu'en une fragilisation globale de l'os due à une baisse de la densité et de la masse osseuse. Des expériences réalisées par Tavella et al. ont montré que des souris surexprimant HARP envoyées dans l'espace semblent être protégées de cette baisse globale de la qualité osseuse. En effet, ces animaux présentaient une organisation trabéculaire plus diffuse que les sauvages au sol, mais ont conservé près de 50 % de cette structure après 3 mois sur la Station Spatiale Internationale alors que les souris

sauvages ont vu leur os trabéculaire disparaître à 90% dans le même temps. Cette diminution a été accompagnée par une modification de la qualité de l'os restant avec une diminution d'épaisseur de 90% chez les animaux sauvages contre 50% chez les souris transgéniques. L'os cortical n'a pas subi de modification d'épaisseur chez les souris transgéniques alors que les sauvages ont vu une baisse de près de 50 % de leur épaisseur corticale. Ces phénotypes ont été observés sur les os longs et les vertèbres (Tavella et al.).

L'expression de HARP serait donc associée au maintien de l'intégrité osseuse au cours de la réparation et du vieillissement.

6 HARP et cellules souches

HARP a été très tôt impliqué dans la mise en place de nombreux organes, cependant ses activités sur des cellules immatures telles que les cellules souches n'ont commencées à être explorées que récemment.

Une étude s'est intéressée aux effets de HARP sur les cellules souches neurales. Une observation réalisée sur des souris inactivées pour HARP a montré une augmentation de 50% de la densité neuronale dans le cortex cérébral. Ce phénotype apparaît durant la neurogénèse corticale où les progéniteurs neuronaux des embryons KO présentent une augmentation du taux de prolifération comparativement aux embryons sauvages. Des études réalisées *in vitro* ont montré que lorsque HARP est ajouté au milieu de culture de neurosphères murines, leur prolifération est inhibée et une baisse de l'expression de la nestine, un marqueur de la souche des progéniteurs neuronaux, est fortement diminuée. Il semblerait que cet effet soit médié par une interaction avec le FGF-2 et son récepteur, le FGFR-1 (Hienola et al., 2004). Cet effet de HARP sur les progéniteurs neuronaux a été conforté en 2009 par Vazin et al. qui montrent que HARP, associé au SDF-1, à l'IGF-2 et à l'ephrin, induit la différenciation de cellules souches embryonnaires murine en neurones dopaminergiques (Vazin et al., 2009). HARP pourrait donc être impliqué dans les phénomènes de blocage de la prolifération associée à la différenciation.

La surexpression de HARP dans des progéniteurs rétiens de rat induit une baisse de la différenciation de ces cellules en bâtonnet, mais promeut leur différenciation en cellules gliales de type cellules de Müller et cellules bipolaires (Roger et al., 2006).

HARP est fortement impliqué dans la clonogénicité des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) mais également dans leur survie. En effet, il a été montré que les cellules MEF utilisées comme substrat pour leur survie synthétisent HARP. Les hESC expriment le récepteur RPTP ζ . Lorsque l'expression de ce récepteur est inhibée dans les hESC, on observe une baisse de l'émergence de colonies ainsi qu'une baisse du nombre de cellule dans chaque colonie. De plus,

l'utilisation d'un milieu de culture supplémenté en HARP permet un plus fort taux d'isolement d'hESC qui conservent leurs propriétés souche. Cet effet est associé temporellement à une activation de la voie Akt (Soh et al., 2007).

Concernant le compartiment médullaire, des études récentes ont démontré l'influence de HARP sur les propriétés des cellules souches hématopoïétiques (CSH). En effet, le traitement de cellules mononuclées de moelle osseuse de souris en culture avec HARP induit une augmentation marquée du nombre de colonies de CSH capables de repopulation à long terme chez la souris immunodéficente. Le même traitement appliqué à du sang de cordon ombilical humain a permis d'obtenir une repopulation plus importante par des cellules humaines du compartiment médullaire de souris immunodéprimées létalement irradiées. Cette augmentation était non seulement visible dans la moelle osseuse, mais aussi dans les populations myéloïdes et lymphoïdes circulantes. Les effets de HARP sur l'émergence des CSH sont inhibés par des inhibiteurs des voies Notch et Akt (Himburg et al., 2010). L'isolation de CSH sur couche de fibroblastes n'exprimant pas HARP résulte en une augmentation du nombre de cellules différenciées en culture. Lors d'expérience de greffe en série de moelle sauvage à des souris KO ou des souris sauvages, le nombre de cellules du donneur est plus important lors de la greffe aux souris KO, les cellules greffées présentent cependant une différenciation myéloïde plus prononcée au détriment de la différenciation lymphoïde, suggérant un rôle de HARP dans le contrôle de la prise de greffe (Istvanffy et al., 2011). Ces 2 études montrent un rôle important de HARP dans le maintien du compartiment médullaire, mais aussi dans la balance de différenciation vers les voies myéloïde ou lymphoïde des CSH.

Enfin, des expériences de migration en chambre de Boyden ont montré que HARP possède le même potentiel chimiotactique et mitotique que le VEGF sur les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC). Cet effet est bloqué par les inhibiteurs de la NO-synthase et de la voie Akt (Heiss et al., 2008). Cet effet sur les PEC pourrait permettre d'augmenter le nombre de progéniteurs dans les phénomènes de vasculogénèse observés dans la cicatrisation.

HARP semble être fortement impliqué dans la biologie des cellules souches, en fonction du type cellulaire observé, son effet est associé soit à une potentialisation de la différenciation soit à un composant de la niche permettant le maintien des cellules souches dans un état indifférencié.

CHAPITRE 2 : Bio ingénierie tissulaire et cellulaire dans l'os : la triade support/cellules/molécules bioactives

1 La bioingénierie

Le remplacement de tissus manquant chez le malade nécessite d'apporter les éléments cellulaires nécessaires à la récupération fonctionnelle de l'organe concerné. Les thérapies standards consistent actuellement à remplacer l'organe déficient soit par une autogreffe, soit par un organe provenant d'un don. Ces stratégies sont limitées par la morbidité associée à un second site de prélèvement chez le malade d'une part et par le manque d'organes transplantables disponibles d'autre part (Vacanti and Langer, 1999). De plus, les risques de transmissions virales et bactériennes ont participé à limiter le nombre d'organes valides pour une greffe. Pour palier à ce manque d'organe, des tests de xéno greffes ont été initiés. Cependant, cette approche présente des risques de transmission de zoonoses connues ou encore inconnues (Fishman, Greenwald, and Grossi, 2012).

Une nouvelle alternative s'est développée durant les 20 dernières années : L'ingénierie tissulaire. Cette nouvelle industrie a réalisé 3.6 milliards de dollars de chiffre d'affaire en 2011 et présentait une croissance de près de 50% entre 2007 et 2011 (Jaklenec et al., 2012). La bio ingénierie consiste à associer des supports, des cellules et des biomolécules permettant la croissance et la différenciation cellulaire et la formation d'un tissu fonctionnel (Figure 15).

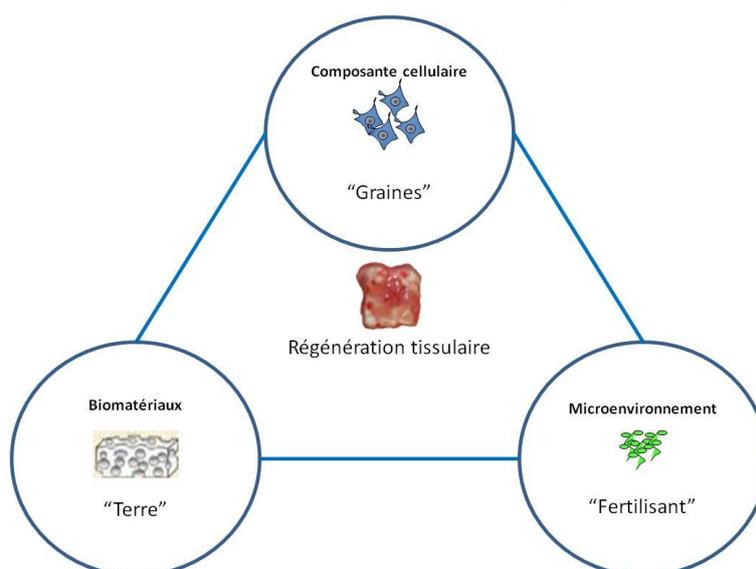


Figure 15 Principe de la bioingénierie, la triade support/cellules/matrice

La bioingénierie peut être considérée comme la culture d'un implant. Les cellules représentant la graine nécessaire à la production d'un tissu fonctionnel, Le biomatériau fournissant le substrat (terre) nécessaire à la croissance des cellules et les biomolécules (fertilisant) permettant de potentialiser la prolifération des cellules mais également leur engagement vers les voies de différenciation cellulaire spécifiques de l'organe cible.

Notre projet s'est principalement intéressé aux applications de régénération osseuse de la bioingénierie. Malgré ses capacités de régénération, lorsque l'os subit un défaut trop important, sa réparation n'est pas possible. Des défauts de formation du callus osseux peuvent aussi résulter en une absence de consolidation par la formation d'une structure pseudo articulaire appelée pseudarthrose. Celle-ci est caractérisée par une mobilité anormale de l'os non réparé et des douleurs lors de l'appui sur le membre concerné. Le traitement de référence de ces défauts réfractaires aux thérapies standards est l'autogreffe de tissu osseux issu de la crête iliaque du patient qui contient les composantes cellulaires et matricielles nécessaires à la réparation. Bien que cette approche soit efficace pour la réparation, elle présente des inconvénients. Au delà des défauts esthétiques engendrés, la création d'un nouveau site de blessure augmente les risques d'infection et de douleurs récurrentes associées chez le patient. De plus, des phénomènes de hernie des organes internes dus à la non fermeture du bassin ont été observés.

La greffe de tissu osseux, avec près de 2.2 million d'opération par an, est le second type de transplantation utilisée dans le monde, après la transfusion sanguine. Le champ d'application va de la chirurgie orthopédique à la dentisterie en passant par la neurochirurgie. Pour ces raisons, l'association de substituts osseux aux thérapeutiques classiques devient de première utilité pour minimiser les effets secondaires de l'autogreffe. L'utilisation de biomatériaux pour combler les larges défauts osseux tend à devenir le standard de la réparation osseuse (Carson and Bostrom, 2007; Giannoudis, Dinopoulos, and Tsiridis, 2005). Cependant, ils ne possèdent pas toutes les capacités mécaniques ni de résorption de l'os. De plus, ces substituts ne comprennent pas la composante cellulaire ni la composante protéique nécessaires à la formation d'un nouveau tissu fonctionnel.

2 Les biomatériaux pour le tissu osseux

La première utilisation de biomatériaux dans le système ostéo articulaire renseignée dans la littérature remonte à 1892. Van Meekeren utilisa du sulfate de calcium (Plâtre de Paris) pour combler un défaut osseux. La première utilisation, avec succès, de matériaux à base de phosphate de calcium remonte cependant à 1920 (LeGeros et al., 2003). Depuis les substituts naturels à base de chitine, corail ou collagènes sont utilisés et de nouveaux substituts osseux synthétiques sont développés. Il existe un consensus quant aux propriétés que doit posséder un biomatériau destiné à la régénération osseuse.

-L'ostéogénèse : le substitut doit pouvoir permettre la différenciation des cellules implantées avec lui. Même si un implant induit toujours une réponse biologique, il ne doit pas être uniquement encapsulé dans un tissu fibreux n'ayant pas de propriétés mécaniques capables de supporter le chargement physique induit par l'utilisation de l'os traité.

-L'ostéoinduction : cette caractéristique représente la capacité du support à recruter et/ou activer les cellules des tissus environnant.

-L'ostéoconduction : cette propriété représente la capacité du biomatériau à faciliter la vasculogénèse et la création d'un tissu osseux fonctionnel.

-L'ostéointégration : il s'agit de la propension de l'implant à s'intégrer au tissu osseux auquel il est accolé sans interface fibreuse.

La capacité de résorption du biomatériau semble devenir une propriété de plus en plus importante en chirurgie orthopédique.

Les biomatériaux pour la régénération du tissu osseux sont actuellement classés en 3 catégories.

2.1 Les substituts naturels

Des processus de traitement des os de cadavre ont permis d'obtenir des substituts osseux exempts de toute contamination virologique ou allogénique. Ce procédé appelé "Tutoplast®" consiste en une viro-inactivation de l'os, suivie d'une délipidation, d'une déprotéination et d'une lyophilisation permettant sa conservation à température ambiante pendant 5 ans. Ce produit présente donc les structures exactes de l'os normal mais est dépourvu de toute matrice protéique. Il semble posséder des propriétés de remodelage et de formation osseuse plus importante que les os n'ayant pas subis de transformation autre que la viro-inactivation (Coquelin et al., 2012). Ces substituts peuvent aussi être définis comme des greffons allogènes.

Le substitut naturel le plus utilisé est dérivé du corail marin. Certaines espèces de corail produisent une structure poreuse constituée de phosphate de calcium ressemblant à celui trouvée dans l'os trabéculaire. La première application clinique utilisant le corail en régénération osseuse a été faite en France à l'hôpital Raymond Poincaré en chirurgie orthopédique et faciale. Le corail peut être directement utilisé dans sa forme naturelle ou alors modifié chimiquement pour y intégrer une composante d'hydroxyapatite. Le corail présente une forte résistance aux forces de compression mais est cassant lorsqu'il est soumis à des forces de cisaillement. Leur étude a permis la mise au point des procédés de fabrication des céramiques calciques (pour revue (Demers et al., 2002)).

2.2 Les céramiques

Pour combler les larges défauts osseux, les chirurgiens s'orientent maintenant vers l'association de la greffe autologue et de biomatériaux possédant des structures chimiques et conformationnelles proches de celles de l'os trabéculaire. Ces matériaux présentent l'avantage d'être biocompatibles, c'est-à-dire de permettre la survie et la différenciation des cellules implantées. Ils

possèdent également des propriétés d'ostéoconduction permettant leur intégration dans l'os nouvellement formé. Leur résorbabilité est contrôlée de façon à permettre une pousse tissulaire en leur sein (Carson and Bostrom, 2007; Giannoudis, Dinopoulos, and Tsiridis, 2005). En plus de leur composition l'autre critère important définissant la vitesse et la qualité de la formation osseuse est la taille des pores dans le matériel (Tableau 1) (Karageorgiou and Kaplan, 2005; Kasten et al., 2008). Ce critère est à définir en fonction des contraintes mécaniques subies au site d'implantation ainsi que de la taille du défaut à combler car plus les pores seront grands, plus la résistance du matériel à la pression sera faible.

Taille des pores	Tissu préférentiellement formé
<10µm	Aucun
15 à 50µm	Tissu fibrovasculaire
50 à 150µm	Tissu ostéoïde
>150µm	Tissu osseux

Tableau 1 Tissus préférentiellement formés en fonction de la taille des pores du substitut (D'après (Karageorgiou and Kaplan, 2005; Kasten et al., 2008))

2.2.1 Les céramiques bio actives

Les céramiques bio-actives sont capables de former un lien physique avec l'os par la formation rapide de cristaux d'apatite à leur surface après leur implantation. Cependant, elles ne sont pas résorbables et la solidité du défaut comblé est directement reliée à celle de la liaison entre la céramique et l'os de l'hôte. Elles sont composées principalement de dioxyde de silice et contiennent un fort taux de dioxyde de sodium et de monoxyde de calcium. De plus, elles présentent un ratio $\text{CaO/P}_2\text{O}_2$ similaire à celui retrouvé dans l'os. Ces céramiques, de part leur faible résistance mécanique, sont dédiées au comblement de défauts petits à moyens (Carson and Bostrom, 2007).

2.2.2 Les céramiques bio inertes

Les céramiques bio-inertes sont généralement composées d'oxydes de métaux comme l'alumine (Al_2O_3), le zircon (ZrO_2) ou le titane (TiO_2). Ces matériaux ne réagissent pas avec les tissus environnant. Leur grande résistance mécanique à la compression les a amenés à être utilisés dans le comblement de larges défauts osseux ainsi que dans les prothèses de tête fémorale. Leur utilisation est cependant limitée aux sites ne subissant pas de contraintes de torsion.

2.2.3 Les céramiques bio absorbables

Les céramiques bio absorbables sont composées de phosphate tricalcique β (TCP β) $CA_3(PO_4)_2$ associées ou non à de l'hydroxyapatite (HA) $CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, composés appartenant tous deux à la famille des apatites. Le TCP β présente un taux de résorption 10 à 20 fois plus rapide que l'HA. L'association de ces deux composants permet de contrôler la vitesse de résorption de l'implant mais aussi de moduler la résistance de l'implant aux contraintes mécaniques. En effet, l'HA présente une structure sujette aux cassures et à un manque de résorption par les cellules de l'hôte. Les céramiques calciques sont produites commercialement sous forme d'implants poreux, d'implants denses non poreux ou de granules. Il existe également quelques formules injectables qui permettent de combler les défauts ne subissant pas de charge mécanique (Carson and Bostrom, 2007; Giannoudis, Dinopoulos, and Tsiridis, 2005). Bien qu'elles possèdent une bonne résistance aux forces de pression, ces céramiques présentent une fragilité importante aux forces de torsion et de cisaillement impliquant une immobilisation du membre touché (Carson and Bostrom, 2007). L'avantage de ces céramiques est leur propension à se lier facilement à l'os du receveur, leur biocompatibilité mais aussi leur forte affinité pour les facteurs de croissance locaux ou exogènes nécessaires pour la régénération osseuse (Tazaki et al., 2009). De plus, elles permettent une différenciation ostéoblastique des cellules implantées ou recrutées de novo sur le site d'implantation (Saldana et al., 2009).

2.3 Les polymères

Les polymères utilisés en régénération osseuse peuvent être classés en 2 catégories principales : les polymères naturels et les polymères synthétiques. Ces deux types de polymères peuvent être utilisés comme véhicule pour un relargage contrôlé de facteurs de croissance.

Les polymères naturels peuvent être composés d'acide hyaluronique ou de collagène. Ces composés sont présentés sous forme de gel, ce qui réduit fortement leur résistance mécanique. Leur composition identique à celle des composants matriciels normaux réduit leur demi-vie sur le site de lésion par l'action des protéases ou des glycanases endogènes. Pour ces raisons, ils sont souvent associés à des céramiques calciques ce qui les rend plus difficiles à atteindre pour les enzymes et confère une certaine résistance mécanique à l'implant (Giannoudis, Dinopoulos, and Tsiridis, 2005).

Les ciments de polymères comme le polyméthylméthacrylate (PMMA) ont été utilisés pour combler les larges défauts osseux. Cependant leur fragmentation induit des ostéolyses et ne ils sont pas résorbables, conduisant à une faible consolidation de l'os. Maintenant, des polymères partiellement résorbables, tels que les acides polyglycoliques (PGA) ou polylactiques (PLA) commencent à être utilisés. Ces composés n'induisent pas d'ostéolyse, cependant, leur produits de dégradation, l'acide

lactique, est irritant et peut causer des abcès non septiques. Un drainage de l'abcès en condition aseptique permet généralement de palier à ce problème (Tiainen et al., 2002).

Enfin, les chimistes commencent à synthétiser de nouvelles molécules. Leurs procédés de fabrication permettent de contrôler précisément leurs propriétés de dégradation et fonctionnelles.

3 La composante cellulaire de la bio ingénierie

L'absence de progéniteurs dans les biomatériaux conduit à une formation osseuse non optimale. Ceci a été illustré dans une étude publiée en 2000 par l'équipe d'Hervé Petite. Ce travail s'est intéressé à la réparation osseuse dans un défaut osseux critique induit dans le tibia de mouton. Le comblement du défaut par un morceau de corail seul n'a pas permis une régénération efficace, caractérisée par une absence de remodelage voir une lyse du support et une quasi absence d'ostéointégration. Cependant, lorsque des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) ont été co-implantées avec le support, un remodelage et une ostéointégration de l'implant ont été observés (Petite et al., 2000). Ce travail démontre l'importance de la part cellulaire dans la bioingénierie. Les études réalisées par la suite dans ce domaine ont eu pour objectif d'optimiser la survie des cellules implantées, le recrutement des cellules de l'hôte et/ou la différenciation de ces cellules.

3.1 Les cellules stromales mésenchymateuses

Les CSM sont des cellules immatures adultes capables d'une part de s'autorenouveler mais aussi de se différencier en cellules matures spécialisées. Les CSM présentent des avantages par rapport aux cellules souches embryonnaires. En effet, le risque tumoral associé est plus faible et surtout leur prélèvement est moins problématique au niveau éthique.

3.1.1 Origine et purification

La présence de cellules non hématopoïétiques dans la moelle osseuse a été évoquée pour la première fois il y a 130 ans par Conheim, un pathologiste allemand. Son travail a montré la possibilité que la moelle osseuse puisse contenir des cellules de type fibroblastique qui synthétiseraient du collagène durant la réparation tissulaire. Les travaux de Friedenstein en 1976 ont ensuite confirmé la présence dans la moelle osseuse de cellules qui pouvaient se différencier dans différentes voies mésenchymateuses (pour revue (Chamberlain et al., 2007)). Nous parlerons de ces potentialités dans les paragraphes suivants. Des cellules présentant des potentialités similaires ont ensuite été isolées

d'autres organes comme le tissu adipeux (Nathan et al., 2003), le placenta (Fukuchi et al., 2004) et d'autres organes (da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi, 2006). Ce manuscrit s'intéressera particulièrement aux CSM issues du tissu médullaire.

Le critère principal pour définir les CSM est leur capacité à adhérer au plastique. En effet, la mise en culture de moelle osseuse permet d'obtenir, après lavage des cellules hématopoïétiques (non adhérentes), une population cellulaire à l'apparence fibroblastique à caractéristique clonale. La cellule à l'origine de la colonie est appelée "Colony forming unit fibroblast" (CFU-F). Les CSM sont une population rare dans la moelle osseuse, la fréquence d'émergence des CFU-F a permis de déterminer qu'elles représentaient seulement 1 cellule sur 10^4 à 1 cellule sur 10^5 des cellules mononuclées de la moelle osseuse (pour revue (Chamberlain et al., 2007)).

Après une première phase de quiescence en culture, les CSM se multiplient rapidement, permettant d'en obtenir une grande quantité dans un but de thérapie cellulaire. Cependant, leur habilité à se multiplier et à se différencier diminue avec le temps. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux protocoles permettant soit de maintenir leurs potentialités soit de les préorienter vers le phénotype d'intérêt durant leur culture.

3.1.2 Caractéristiques phénotypiques

3.1.2.1 *Marqueurs de surface*

La cytométrie en flux a permis l'étude des antigènes membranaires et a abouti à un consensus sur le profil d'expression de marqueurs de surface des CSM. Bien qu'il n'existe pas de marqueur spécifique des CSM ou de leur immaturité, comme le CD34 pour les cellules souches hématopoïétiques, un panel de marqueurs négatifs et positifs a été décrit (pour revue (Chamberlain et al., 2007)).

Parmi les marqueurs négatifs des CSM, on retrouve des marqueurs des populations hématopoïétiques et endothéliales : CD3 et CD4 (corécepteurs des lymphocytes T), CD11a (LFA-1 pour lymphocyte function-associated antigen 1), CD14 (marqueur porté par les populations macrophagiques), CD45 (L-CA pour leucocyte common antigen), les molécules de co-activation lymphocytaire B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), CD40 (Bp50) et CD154 (CD40-L)(marqueur lymphocytaire de type B). Les CSM n'expriment pas non plus le CD31 (PE-CAM-1 pour platelet endothelial cell adhesion molecule) ni le CD34 (marqueur des progéniteurs hématopoïétiques).

Le panel de marqueurs positifs reconnus pour les CSM comprend, entre autre, des ligands dont les récepteurs sont présents à la surface des cellules matures des lignées lymphocytaires, comme les CD58 (LFA-3 pour lymphocyte function associated antigen 3), CD72 (protéine Lyb-2), CD102 (ICAM-2 pour Inter-cellular adhesion molecule 2), CD106 (VCAM-1 pour vascular cell adhesion

molecule 1) et le CD166 (ALCAM pour Australian level crossing assessment model). Ce panel témoigne des étroites relations existant entre les CSM et les cellules du système immunitaire (Majumdar et al., 2003). Les CSM expriment également les : CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique), CD54 (ICAM1), CD73 (5' terminal nucleotidase ou SH3), CD90 (THY-1 pour thymocyte differentiation antigen 1), CD105 (endoglin ou SH2), SSEA-3 (stage specific embryonic antigen 3), SSEA-4 et le HLA ABC (human leukocyte antigen ABC). Etonnement, les CSM semblent également exprimer un marqueur classiquement utilisé pour identifier les cellules nerveuses : la nestine (Mendez-Ferrer et al., 2010).

3.1.2.2 *Les potentialités de différenciation des CSM*

Les CSM ont tout d'abord été caractérisées phénotypiquement par leur capacité à se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes et en adipocytes (Figure 16). Il a ensuite été montré qu'elles possédaient également des capacités à se différencier en myoblastes, ténocytes et fibroblastes. Ce manuscrit s'intéressera aux différenciations ostéoblastique, chondrogénique et adipogénique, avec un intérêt particulier pour les différenciations ostéoblastique et chondrogénique qui rendent les CSM particulièrement intéressantes dans la thérapie cellulaire du tissu ostéoarticulaire.

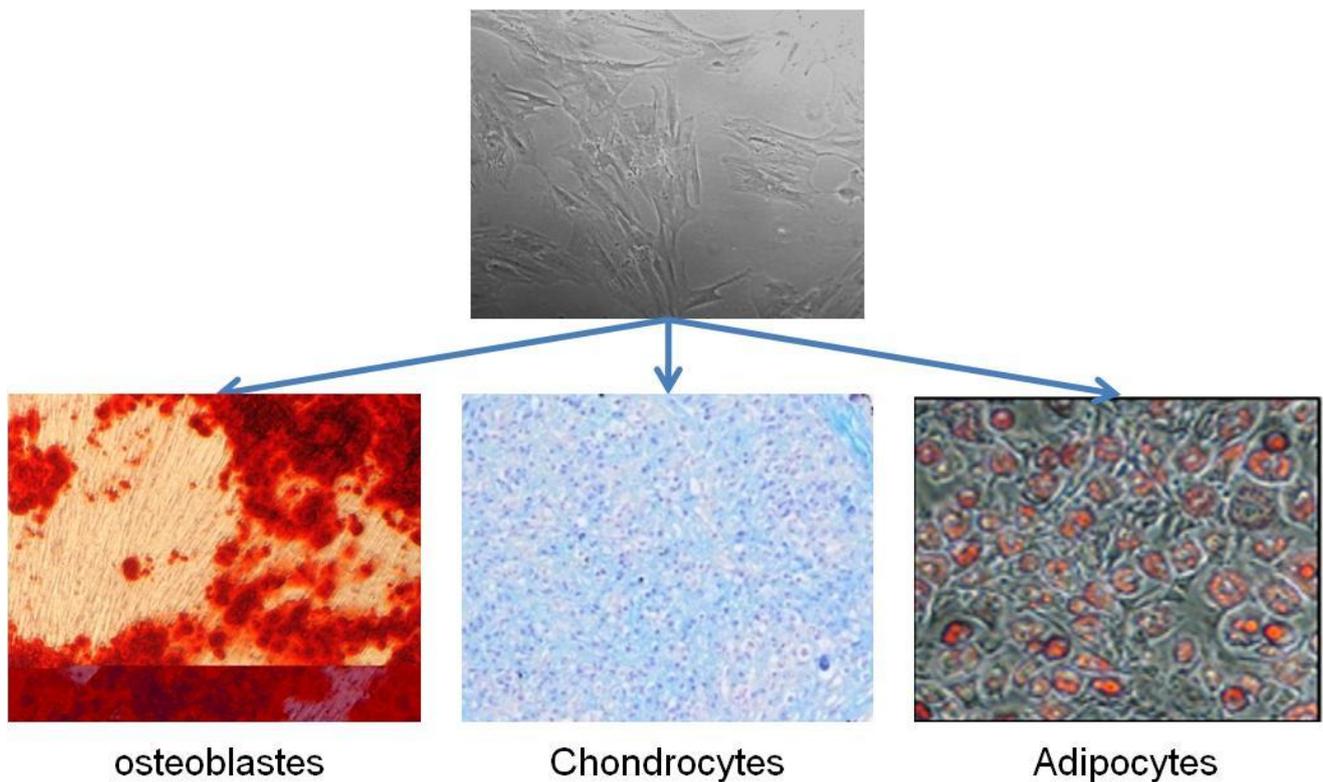


Figure 16 Schéma de la tripotentialité des CSM

Les CSM en culture présentent une morphologie fibroblastique caractéristique. L'ajout de facteurs spécifiques dans leur milieu de culture permet d'orienter ces cellules vers les trois voies de différenciation principales des CSM. Des colorations histologiques permettent d'attester de la différenciation. Un marquage au rouge alizarine permet de mettre en évidence les dépôts d'hydroxyapatite caractéristiques de la différenciation ostéoblastique. Une coloration au bleu alcian met en évidence la forte accumulation de GAG durant la différenciation chondrogénique. Une coloration des lipides à l'Oil redO permet de mettre en évidence des vésicules graisseuses dans le cytoplasme des cellules s'étant différenciées en adipocytes.

La différenciation adipogénique est obtenue par un traitement de CSM en monocouche par de la dexaméthazone, du 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), d'indométhacine et d'insuline. Cette différenciation est mise en évidence par une coloration des vésicules lipidiques à l'Oil redO. L'expression génique de la "Fatty acid binding protein 4" (FABP4) ou du "Peroxisome proliferator activated receptor γ " (PPAR γ) permet également de mettre en évidence l'engagement vers la voie adipocytaire (Pittenger et al., 1999). La présence de nombreuses petites vésicules lipidiques correspond morphologiquement à des cellules du tissu adipeux brun plutôt qu'à celles du tissu adipeux blanc qui ne contiennent qu'une seule vacuole occupant une grande partie du cytoplasme et repoussant le noyau à la périphérie de la cellule. La différenciation adipocytaire des CSM est étudiée dans le cadre de la chirurgie plastique.

La différenciation ostéoblastique des CSM s'obtient classiquement par l'ajout d'acide ascorbique, de β -glycérophosphate et de dexaméthazone au milieu de culture de CSM cultivées en monocouche. Les cellules expriment rapidement le facteur de transcription RUNX2, marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. La matrice extracellulaire montre une accumulation d'agrégats

calciques visibles par une coloration au rouge alizarine ou au Von Kossa. Les cellules différenciées expriment aussi un panel de gènes associés soit à la minéralisation de la matrice comme la phosphatase alcaline, soit associés à la mise en place de la matrice ostéoïde comme la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéopontine et le collagène de type 1. Le traitement par le cocktail ostéoinducteur induit aussi l'expression de la BMP2 (Pittenger et al., 1999).

Enfin, la différenciation chondrocytaire est réalisée en cultivant les CSM en microculot, ce qui permet de favoriser les échanges cellulaires et la formation de matrice extracellulaire (Mackay et al., 1998). Le milieu de différenciation ne contient pas de sérum mais est supplémenté en dexaméthazone, en acide ascorbique, en L-proline, en sélénium insuline transferrine et en TGF β 3. La différenciation est caractérisée par une accumulation de GAG sulfatés révélée par une coloration au bleu alcian ou à la safranine O. Le microculot présente également une forte accumulation de collagène 2. Les facteurs de transcription principaux impliqués dans ce processus sont des protéines de la famille Sox (SRY-box containing genes) : Sox5, Sox6 et Sox9. Bien que l'aggrécane et le collagène 2 soient les principaux gènes regardés pour valider la différenciation, on observe aussi l'expression de protéoglycannes importants dans l'assemblage et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) comme les "small leucine repeats proteoglycans" (SLRP) (Pelttari, Steck, and Richter, 2008).

3.1.3 Fonctions physiologiques et pathologiques

Bien que les CSM soient faciles à isoler *in vitro*, l'absence de marqueur spécifique rend difficile l'étude de leurs fonctions *in vivo*. Cependant, des études sur leurs productions de cytokines ou leur capacité à soutenir l'hématopoïèse suggèrent qu'elles pourraient avoir un rôle important dans la niche des cellules souches hématopoïétiques. En effet, des travaux réalisés en 2000 par Majumdar et al. ont montré que les CSM humaines expriment fortement des cytokines importantes dans l'hématopoïèse comme l'interleukine (IL)-6, L'IL-11, le "Leukemia inhibitory factor" (LIF), le "Macrophage colony stimulatory factor" (M-CSF) et le "Stem cell factor" (SCF). Cette expression est associée à une capacité à soutenir la culture à long terme des cellules souches hématopoïétiques les plus immatures : les "long-term culture initiating cell" (LTC-IC) (Majumdar et al., 2000). Ces fonctions ont été confirmées *in vivo* chez la souris par des expériences réalisées par Mendez-Ferrer et al.. Des comarquages des CSM nestine+ et des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse ont démontré leur étroite association. Des expériences d'irradiation létale d'animaux déficients en CSM nestine+ ont montré que le compartiment hématopoïétique de ces souris n'était pas recolonisé de façon optimale (Mendez-Ferrer et al., 2010). Un modèle de la régulation de la niche hématopoïétique par les CSM a été proposé en 2008 par Wagner et al.. Ce modèle fait intervenir d'une part les facteurs environnementaux extrinsèques que sont les pressions mécaniques, osmotiques et de dioxygène. Les CSM interviendraient, elles, par l'intermédiaire des contacts cellulaires, mais aussi par la synthèse de

facteurs de croissance (SCF, SDF-1, Wnt, angiopoïétine -1, thrombopoïétine, Flt-3 ligand (FL)) et de protéines de la MEC (collagènes, ostéopontine, fibronectine, hyaluronane, thrombospondin 1 (THBS)) qui maintiendraient les CSH dans leur état indifférencié (Figure 17).

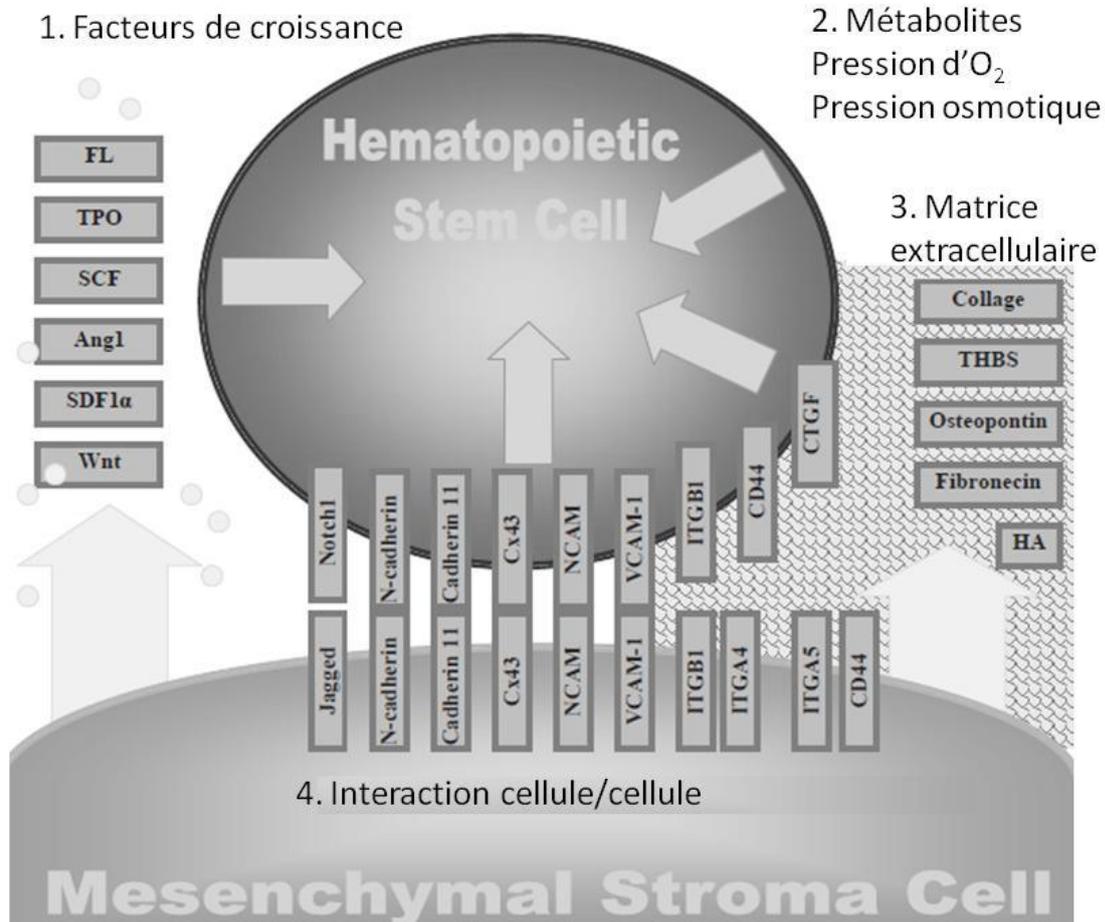


Figure 17 Modèle de la régulation de la niche des CSH par les CSM (D'après (Wagner, Saffrich, and Ho, 2008))

La régulation de la niche des CSH interviendrait par les interactions cellulaires via les molécules d'adhésion, mais aussi par la forte synthèse de cytokines par les CSM. De plus, leur capacité à synthétiser des composants de la matrice extracellulaire comme l'ostéopontine, la fibronectine et l'acide hyaluronique (HA) permettrait également de maintenir le statut indifférencié des CSH.

Les capacités de différenciation des CSM suggèrent qu'elles seraient impliquées dans la formation du callus lors de la réparation osseuse. Une étude élégante réalisée en 2009 par Granero-Molto et al. a montré l'implication des CSM dans la régénération osseuse. En effet, des CSM murines, exprimant la luciférase, injectées par voie sanguine dans des souris ayant subi une fracture du tibia ont migré sur le site de blessure en 3 jours. L'infusion de CSM a permis d'augmenter la taille du callus ainsi que sa composition en tissus cartilagineux et osseux. Le callus montrait une forte présence de collagène de type 2 et de type 10, indiquant une formation osseuse de type endochondral. Les cellules injectées ont été retrouvées sous forme d'ostéocytes prisonniers dans la nouvelle matrice osseuse (Granero-Molto et al., 2009). Ces résultats ne permettent cependant pas de déterminer complètement le rôle des CSM. Elles interviendraient probablement par une synthèse de cytokines et de facteurs de

croissance ainsi que par une différenciation directe dans les types cellulaires nécessaires à la régénération. L'hétérogénéité des CSM retrouvée chez un même patient suggère que ces différentes fonctions pourraient être tenues par différentes sous populations de CSM.

Lors de l'arthrose, on peut observer une pousse de spicules chondro-osseux à l'interface os/cartilage de l'articulation. Leur formation semble dépendre d'un mécanisme similaire à celui de la formation osseuse endochondrale. Bien que ce la n'ait pas été démontré, les propriétés de migration et de différenciation des CSM suggèrent qu'elles pourraient être impliquées dans la formation de ces ostéophytes (van der Kraan and van den Berg, 2007).

4 Molécules bio actives et bio ingénierie

L'un des challenges de la bio ingénierie est de potentialiser la réparation des tissus lésés. Pour cela, la seule présence d'un tuteur pour la repousse osseuse n'est pas suffisante. En effet, il manque la composante matricielle du tissu permettant une colonisation optimale de l'implant ainsi que la survie et la potentialisation des propriétés des cellules résidentes ou implantées avec les biomatériaux. Pour cela, les recherches s'orientent vers l'association de biomolécules à des supports permettant un relargage contrôlé dans le temps pour optimiser leurs actions ou une protection de ces molécules vis-à-vis de l'environnement délétère que représente un site de lésion.

4.1 Les facteurs de croissances

Les faibles propriétés ostéoinductives intrinsèques des biomatériaux a conduit à leur association à des biomolécules permettant un meilleur recrutement des progéniteurs ou des ostéoblastes sur le site de greffe. De plus, toute régénération dépend de la vascularisation, il est donc d'un grand intérêt d'associer des molécules pro-angiogéniques en complément des facteurs ostéoinducteurs.

4.1.1 Facteurs de croissance ostéoinducteur

4.1.1.1 Les "Bone Morphogenetic Protein"

Les Bone Morphogenetic Protein (BMP) ont tout d'abord été identifiées comme des facteurs de croissance capables d'induire une formation osseuse ectopique dans des tissus mous pour les BMP2, 4 et 7. Leur rôle a ensuite été élargi à la mise en place d'autres structures que l'os, comme les

vaisseaux sanguins par une induction de l'expression de VEGF par les cellules cibles (pour revue (Towler, 2009)).

La BMP 2 est l'un des premiers facteurs de croissance à avoir été utilisé dans les contextes de régénération osseuse, elle est le facteur de croissance le plus étudié dans ce contexte. L'implantation de TCP β chargés avec de la BMP2 dans des muscles chez la souris conduit à la formation d'un tissu cartilagineux 7 jours après l'implantation. Après 14 et 21 jours dans l'animal, une formation de tissu ostéoïde et d'os lamellaire ainsi qu'une invasion vasculaire sont observées (Liang et al., 2005). Des expériences réalisées par Sawyer et coll. en 2009 ont confirmé l'action réparatrice de la BMP2 associée ici à des biomatériaux, composés de TCP, de collagène et de caprolactone, en site orthotopique dans la calvaria de rat (Sawyer et al., 2009). D'autres membres de la famille des BMP telles que les BMP4 et BMP7 ont été étudiés dans le contexte de la régénération osseuse. Il semble qu'il n'y ait pas de différence significative quant à l'efficacité de ces différents facteurs ostéoinducteurs sur la réparation (Hyun et al., 2005).

Actuellement, seuls 2 membres de la famille des BMP possèdent une autorisation de mise sur le marché, la BMP2 dans les fractures ouvertes de la jambe, et la BMP7 dans les pseudarthroses résistantes du tibia (Obert, 2007). Il est à noter que quelques cas d'ostéolyse vertébrale ou de la métaphyse de l'os concerné ont été rapportés après un traitement avec de la BMP2 (Balseiro and Nottmeier, 2010; Lewandrowski, Nanson, and Calderon, 2007; Owens et al., 2011). Ces effets secondaires peuvent être dus à des problèmes de doses des protéines recombinantes, en effet, leur présentation sous forme d'éponges imbibées limite le contrôle de la quantité déposée sur le site de lésion. De plus, les quantités utilisées durant l'intervention sont liées à un coût élevé.

4.1.1.2 *Le lysat plaquettaire*

Le lysat plaquettaire (LP) est obtenu par lyse d'un concentré plaquettaire d'aphérèse. Sa forte concentration en facteurs de croissance tels que le Platelet derived growth factor (PDGF), les Fibroblast growth factor (FGF), les Insulin like growth factor (IGF) et les Transforming growth factor β (TGF β) mais aussi de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, Angiopoïétine 1) font du lysat plaquettaire un bon candidat dans les protocoles de régénération osseuse. Doucet et al. ont montré que la culture de moelle osseuse en LP permet d'accroître la taille des CFU-F mais également de potentialiser la prolifération des CSM tout en leur permettant de conserver leur potentiel de différenciation chondroblastique, ostéoblastique et adipogénique mais aussi leurs propriétés immunomodulatrices. Ces travaux ont également démontré in vitro une potentialisation de la différenciation ostéoblastique des CSM cultivées en LP. Le fait qu'il soit d'origine humaine permet en outre d'éviter les risques de transmission de zoonose contrairement au sérum de veau foetal (SVF) classiquement utilisé en culture. (Doucet et al., 2005).

Des travaux récents réalisés par Chevallier et al. ont confirmé fonctionnellement *in vivo* les effets observés *in vitro* par Doucet et al.. En effet, des expériences d'ostéoformation en site ectopique dans la souris immunodéprimée ont montré que les cellules pré-orientées grâce au LP étaient capables de produire une matrice osseuse lorsqu'elles étaient associées à des céramiques HA/TCP β alors que celles cultivées en SVF ne produisaient qu'un tissu fibreux (Chevallier et al., 2009).

Malgré la présence de facteurs angiogéniques dans le LP, il n'existe actuellement pas d'étude rapportant un effet potentialisateur de la vascularisation par le LP. Il existe également une grande variabilité en termes de quantité des différents facteurs de croissance selon l'origine du donneur ou la méthode de préparation (Gruber et al., 2004). Bien que ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation du LP dans les protocoles de régénération osseuse, des investigations seront toutefois nécessaires avant son application dans des protocoles de régénération cliniques.

4.1.2 Facteurs de croissance angiogéniques

La néo-vascularisation est considérée comme étant un facteur important de la régénération tissulaire. En effet, l'environnement d'un tissu lésé est hypoxique et l'approvisionnement en facteurs nutritifs et en facteurs de croissance est limité à une diffusion passive. La survie des cellules implantées dans ces sites est donc fortement dépendante d'une angiogénèse efficace. Dans ce cadre, l'association de facteurs angiogéniques comme le "Vascular endothelial growth factor" (VEGF) à des facteurs ostéogéniques comme la BMP2 a été étudiée dans le cadre de la régénération osseuse.

Deux études réalisées sur des polymères d'acide glycolique permettant des relargages progressifs et différentiels de VEGF et de BMP2 ont démontré l'intérêt de l'association de ces deux facteurs de croissance. La première étude réalisée dans un modèle de défaut fémoral critique chez la souris immunodéficiente a montré une formation osseuse de type endochondral plus importante dans les groupes associant les 2 facteurs que dans les groupes comportant un facteur de croissance seul (Kanczler et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés la même année par Kempen et al. qui ont montré que le relargage séquentiel de VEGF (en 7 jours) et de BMP2 (en 4 semaines) par un biomatériau permet de potentialiser la formation osseuse ectopique après 8 semaines d'implantation chez le rat. Cependant, aucune différence ne fut observée entre les différents groupes en site orthotopique après 8 semaines (Kempen et al., 2009).. La présence des composants matriciels et cellulaires nécessaires à la régénération présents à proximité du site de lésion a pu permettre une formation osseuse plus efficace et plus rapide en site orthotopique. L'analyse des implants à 8 semaines est donc peut être trop tardive pour observer un effet précoce des facteurs co-implantés

4.2 Les glycosaminoglycannes

Les glycosaminoglycannes (GAG) sont des polysaccharides sulfatés caractérisés par leur grande variabilité structurale. Ils interagissent avec de nombreux ligands protéiques et régulent leurs activités. Ces molécules permettent de potentialiser l'action de différents facteurs de croissance en facilitant leur présentation à leurs récepteurs de haute affinité. La liaison des protéines aux GAG permet également de les protéger des protéases endogènes, augmentant ainsi leur demi-vie dans la MEC. Les facteurs de croissance pouvant se lier aux GAG font partie de la superfamille des "heparin binding growth factors" (HBGF). Cette famille regroupe les membres de la famille du TGF- β impliqués dans la formation osseuse et cartilagineuse, des VEGF impliqués dans l'angiogénèse et également le facteur de croissance HARP. Leur rôle dans la mise en place et le maintien de la MEC est lié à la capacité des GAG de se lier aux protéines matricielles comme les collagènes. Ces fonctions leur permettent d'orienter les fonctions biologiques d'une cellule au sein de son microenvironnement et d'influencer les processus de régénération tissulaire. Ces propriétés en font des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cadre des stratégies de régénération tissulaire.

4.2.1 Structure et fonctions

Les GAG sont des chaînes linéaires polysaccharidiques constituées de la répétition d'unités disaccharidiques. Un des deux résidus glucidique est un glucide aminé, le N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou le N-acétylgalactosamine (GalNAc). Le second sucre est soit un acide uronique comme le glucuronate (GlcA) ou sa forme épimérisée l'iduronate (IdoA), soit un galactose (Gal). On distingue 4 grandes familles de GAG : les héparanes sulfates (HS), les chondroïtines sulfates (CS), les kératanes sulfates (KS) et l'acide hyaluronique (AH). Le dermatane sulfate (DS) est rattaché à la famille des chondroïtines sulfates. Ces familles sont définies en fonction de la composition en sucre de leurs unités disaccharidiques. L'AH est le seul GAG à ne pas être sulfaté.

Les GAG présentent une grande diversité structurale en fonction de leur taux de sulfatation et de leur longueur qui sont définis durant leurs synthèses. Ces modifications permettent aux GAG d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques par des liaisons électrostatiques délimitées ou bien grâce à des séquences oligosaccharidiques complexes spécifiques (Lyon and Gallagher, 1998). Ainsi, les HS constituent des récepteurs de basse affinité pour de nombreux facteurs de croissance nommés "Heparin binding growth factors", permettant ainsi de les concentrer localement ou de contrôler leur localisation (Gallagher, 2001). Ces interactions permettent aussi de protéger les facteurs de croissance de la dégradation par les protéases et ainsi d'allonger leur demi-vie mais aussi de potentialiser leur action en facilitant leur dimérisation et leur liaison à leurs récepteurs de haute affinité (Bernfield et al., 1999).

4.2.1.1 *Les héparanes sulfates*

Les noms héparanes sulfates et héparine proviennent du fait que ces composés ont été, à l'origine, isolés de tissus hépatiques. Les HS sont formés d'une succession de dimères de GlcNAc et de GlcA. Le groupe des HS se démarque des autres familles de GAG par leur plus grande complexité structurale, due à la grande variabilité des positions des groupements sulfates. Ils ont une multitude de fonctions dont la plupart impliquent des interactions avec d'autres macromolécules biologiquement actives.

L'héparine est un HS hypersulfaté. Elle est synthétisée par les mastocytes du tissu conjonctif. Les chaînes d'héparine (PM : 60.000 à 100.000 kDa) sont synthétisées sur un core protéique, la serglycine, avant d'être clivées de façon aléatoire en fragments faisant de 5.000 à 25.000 kDa qui seront stockés dans les granules de sécrétion du cytoplasme des mastocytes. L'héparine a été le premier GAG à être utilisé en clinique pour ses propriétés d'inhibition de la coagulation (pour revue (Wessler and Gitel, 1986)).

4.2.1.2 *Les chondroïtines sulfates*

Les CS sont les GAG majoritaires de la matrice cartilagineuse. Elles sont constituées de disaccharides formés d'un GalNAc et d'un acide hexuronique, GlcA ou IdoA. Il existe 5 classes de CS allant de A à K en fonction des positions des sulfatations sur les sucres de la chaîne saccharidique (Sugahara et al., 2003). Tout comme les HS, les CS sont capables de fixer de nombreuses protéines et de moduler leurs activités. Elles participent aux processus cicatriciels en influençant la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire (pour revue voir (Trowbridge and Gallo, 2002)).

4.2.1.3 *Les kératanes sulfates*

Les KS sont composés de la répétition d'un motif disaccharidique de GlcNAc et de Gal. Chaque disaccharide peut être sulfaté en position 6 sur l'un des deux oses (Bragulla and Homberger, 2009). La masse moléculaire de la chaîne saccharidique des KS se situe entre 4.000 et 22.000 kDa. Il existe 2 types de KS (I et II), identifiés par l'acide aminé auquel ils sont reliés sur les protéoglycannes. Ils jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et les processus de cicatrisation cornéenne.

4.2.1.4 *L'acide hyaluronique*

L'AH a été isolé de l'humeur vitré bovine. Il est constitué d'une succession de dimères de GlcA et GlcNAc liés en β (1-3) ou β (1-4) et n'est pas sulfaté (Blundell, Deangelis, and Almond,

2006). La molécule d'AH peut atteindre un nombre de 25.000 répétitions de dimères, soit une masse molaire de 4.000 kDa.

L'AH est connu pour ses qualités structurales, notamment pour conférer leur élasticité aux tissus. L'AH est utilisé en thérapie dans l'arthrose afin de fournir de la lubrification à l'articulation endommagée et permet aussi de ralentir la progression des symptômes (Ge et al., 2006).

4.2.2 Glycosaminoglycannes et HARP

Deux études publiées par le laboratoire CRRET ont montré que HARP se liait aux GAG avec un Kd de 13nM pour l'héparine et de 51 nM pour les DS. Le co-traitement de cellules épithéliales bovines avec HARP et des HS, des CS-A ou des DS a résulté en une potentialisation de la prolifération induite par HARP (Vacherot et al., 1999). Des expériences réalisées sur les lignées NIH-3T3 ont montré que les GAG potentialisent la dimérisation de HARP (Bernard-Pierrot et al., 1999). L'activation des voies de signalisation intracellulaire des récepteurs RPTP ζ et ALK implique leur dimérisation (Perez-Pinera, Berenson, and Deuel, 2008; Stoica et al., 2001). L'action des GAG sur HARP permet probablement de favoriser la dimérisation de ses récepteurs. La fixation de HARP à l'héparine induit un changement conformationnel de la protéine au niveau des feuillet β de la protéine. La réduction des ponts disulfures diminue la fixation de l'héparine à HARP indiquant la nécessité d'une conformation native de la protéine pour interagir avec l'héparine. Ces données suggèrent également que la liaison de HARP aux GAG se fait par ses domaines TSR (Kilpelainen et al., 2000).

Enfin, des expériences de co-purification de HARP et d'oligosaccharides ont permis d'identifier les séquences saccharidiques spécifiques de liaison de HARP. Ces expériences ont également permis de déterminer que HARP se liait préférentiellement aux CS résistants à la chondroïtinase B. En effet, des préparations de CS cérébraux traités par la chondroïtinase ABC ou la chondroïtinase A ne sont pas capable de rentrer en compétition avec les CS natifs dans des expériences de Biacore, alors que ceux traités avec la chondroïtinase B conservaient une capacité de compétition de 65%. Cette étude a également caractérisé les séquences disaccharidiques minimales de faible affinité (GlcA(2-O-sulfate) β 1-3GalNAc(6-O-sulfate) et IdoA(2-O-sulfate) β 1-3GalNAc(6-O-sulfate)) mais également déterminé que les séquences de haute affinité étaient des decasaccharides composés des disaccharides suivant : (GlcA β 1-3GalNAc(4, 6-O-disulfate)), (GlcA(2-O-sulfate) β 1-3GalNAc(4-O-sulfate)) ou de ces disaccharides comprenant la forme épimérisée du GlcA (Bao, Muramatsu, and Sugahara, 2005).

Ces données indiquent un rôle important des GAG pour la signalisation médiée par HARP. La liaison de HARP aux GAG se fait sur des séquences saccharidiques spécifiques. L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage où le contenu glycanique de la MEC est modifié, durant cette

maladie, on retrouve également des taux élevés de HARP dans la synovie de l'articulation. Il serait donc intéressant de déterminer les changements structuraux des CS durant les maladies dégénératives du cartilage et de comparer leurs propriétés de liaison à HARP à celles des GAG en conditions normale.

4.2.3 Les protéoglycannes

Les protéoglycannes (PG) sont formés par le greffage covalent de chaînes de GAG sur des troncs protéiques (ou core protéique). Les HS et CS/DS sont reliés par des résidus sérine à leur core protéique par l'intermédiaire d'un xylose. Bien qu'il n'existe pas de séquence consensus pour la xylosylation, les résidus sérine présentent invariablement une glycine à leur côté C-terminal. Les KS I sont reliés à leur core protéiques par une asparagine, tandis que les KS II sont eux reliés soit à une sérine soit à une thréonine par l'intermédiaire d'un GalNAc. Les caractéristiques fonctionnelles des PG dépendent principalement du type de leurs chaînes de GAG, ce qui permet de définir 4 familles de PG : les HSPG, les CSPG, les KSPG et les DSPG. Il existe cependant des PG présentant différents types de GAG attachés à leur core protéique. De plus, la composition du core protéique permet de définir plusieurs familles de PG.

4.2.3.1 Les "small leucin repeats proteoglycan"

Les "Small leucin repeats proteoglycan" (SLRP) sont une famille de PG matriciels dont le core protéique comprend de 6 à 10 résidus leucine adjacents (Hocking, Shinomura, and McQuillan, 1998; Iozzo, 1999). Cette famille comprend, entre autre, la décorine (DCN), le biglycane (BGC), la fibromoduline (FMOD) et le lumican (LUM). Ils présentent des sites d'attachement pour les CS et/ou les KS. La DCN est le seul membre de la famille à ne posséder qu'un seul site d'attachement pour les GAG (Fisher, Termine, and Young, 1989). Le BGC présente lui deux sites de fixation pour des chaînes de GAG, cependant, la redondance observée entre les séquences protéique du BGC et de la DCN fait penser que BGC est le résultat d'une duplication du gène de la DCN. LUM et FMOD présentent plusieurs sites potentiels de fixation pour des chaînes de KS (Figure 18). La DCN et le BGC peuvent lier le TGF β 1, modulant ainsi son activité (pour revue (Knudson and Knudson, 2001)). Les SLRP interviennent principalement dans la mise en place et le maintien de la MEC grâce à leurs interactions avec les collagènes. Ces interactions leur permettent de protéger les collagènes des protéases (Geng, McQuillan, and Roughley, 2006), mais également d'organiser et de réguler la taille des fibres de collagène (pour revue: (Kalamajski and Oldberg, 2010)).

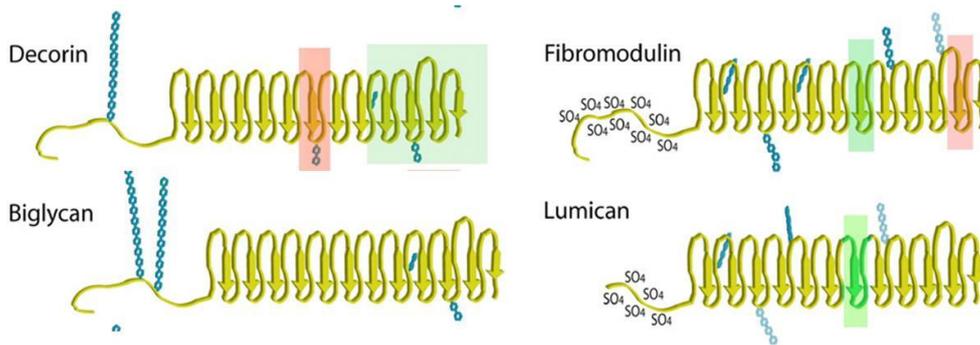


Figure 18 Schéma de la structure de la décorine, du biglycane, de la fibromoduline et du lumican. (D'après (Kalamajski and Oldberg, 2010))

Les régions d'interaction avec les collagènes sont surlignées en rouge (haute affinité), ou en vert (basse affinité). Les glycosylations des cores protéiques sont indiquées en bleu foncé (confirmées expérimentalement) ou en bleu clair (sites potentiels). Les sites possibles de sulfatation des tyrosines sont notées "SO₄".

4.2.3.2 La famille des lecticans ou "hyaluronan binding proteoglycans"

La famille des lecticans, des PG matriciels, est définie par la présence de domaines globulaires communs retrouvés dans la séquence du core protéique de ses différents membres. L'aggrécane (ACAN) comprend 3 domaines globulaires (G1, G2 et G3) et 3 domaines interglobulaires. Les 3 autres membres de cette famille, le versican/Pg-M (VCAN), le neurocan et le brevican contiennent des domaines globulaires G1 et G2 similaires à ceux de l'ACAN. La partie N-terminale de leurs cores protéiques contient le domaine G1 qui interagit avec l'AH (pour revue (Knudson and Knudson, 2001)). Les PG de cette famille peuvent compter jusqu'à 100 chaînes de CS sur leur core protéique (Figure 19). Leur rôle principal est l'hydratation de la membrane. Le VCAN peut également intervenir dans les mécanismes de différenciation des adipocytes (Zizola et al., 2007), mais également dans la chondrogénèse (Choocheep et al., 2010).

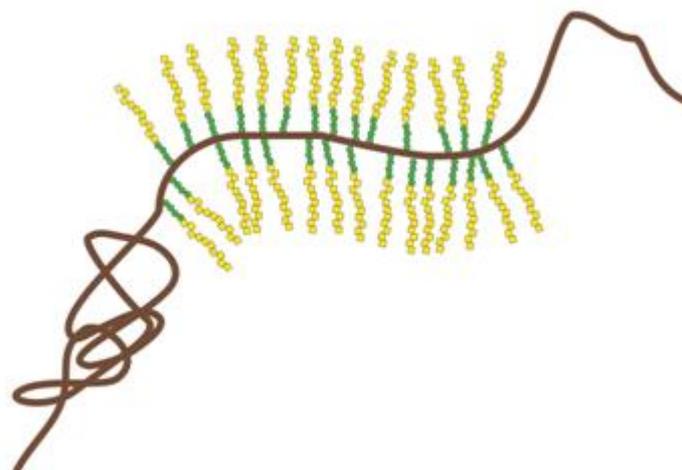


Figure 19 Schéma de la structure de l'aggrécane (D'après (Esko, 2009))

L'aggrécane, PG matriciel, est composé d'un core protéique (marron) de 200kDa sur lequel peuvent se fixer jusqu'à 100 chaînes de CS (jaune).

4.2.3.3 *Le perlecan*

Le perlecan (PRCAN) est un HSPG principalement retrouvé dans la membrane basale. Le domaine N-terminal contient le site d'attachement des GAG. Son core protéique comprend également des domaines homologues à ceux du récepteur aux "low density lipoprotein", à la laminine, et contient 21 répétitions de domaines de type immunoglobuline. La partie C-terminale contient des motifs similaires à l'EGF. Bien que le PRCAN soit un PG de la membrane basale, il a été retrouvé dans le cartilage, un tissu n'en comprenant pas. Dans le cartilage, le PRCAN comprend des chaînes de CS en plus de ces chaînes de HS. La déficience en PRCAN conduit à un défaut de la formation osseuse de type endochondrale caractérisée par une réduction du réseau fibrillaire de collagène, suggérant un rôle du PRCAN dans la structure de la matrice (pour revue (Knudson and Knudson, 2001)).

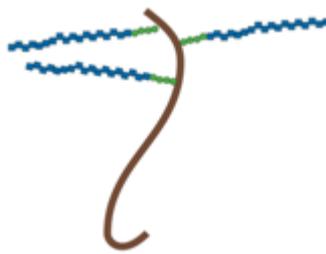


Figure 20 Schéma de la structure du perlecan (D'après (Esko, 2009))

Le perlecan est un PG matriciel, est composé d'un core protéique (marron) sur lequel viennent se fixer des chaînes de HS (bleu).

4.2.3.4 *Les syndécans*

Les syndécans (SDC) sont une famille de 4 HSPG membranaires. Les SDC peuvent également porter des CS. Chaque SDC possède un domaine intracellulaire, un domaine intramembranaire et un domaine extracellulaire qui est la région la moins conservée. Cet ectodomaine présente des séquences consensus de type Ser-Gly sur lesquelles se greffent de 3 à 5 chaînes de GAG. Le domaine intracellulaire des SDC a été décrit précédemment dans le paragraphe s'intéressant au SDC3 (récepteur de basse affinité pour HARP). Les SDC coopèrent avec différents récepteurs dans la signalisation intracellulaire des protéines Wnt, Hedgehog, FGFs et TGF β . Ils peuvent aussi interférer dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Whiteford et al., 2007).

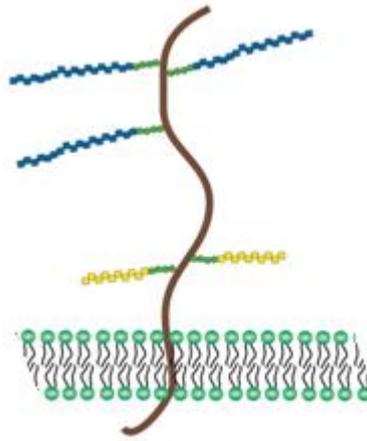


Figure 21 Schéma de la structure des syndécans (D'après (Esko, 2009))

Les syndécans sont composés d'un core protéique composé d'un domaine extracellulaire sur lequel se fixent des chaînes de HS (bleu) et parfois de CS (jaune), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire relié à des phosphatases ou des kinases qui activent des voies de signalisation intracellulaires.

4.2.3.5 Les glypicans

Les glypicans (GPC) sont une famille de 6 protéines membranaires reliées à la membrane cellulaire par une ancre de type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI). Les GPC sont principalement des HSPG (Figure 22). Le fait qu'ils ne soient pas reliés au cytosquelette ni à des kinases intracellulaires permet de penser qu'ils ont un rôle de récepteur de basse affinité pour de nombreux morphogènes (Tumova, Woods, and Couchman, 2000).

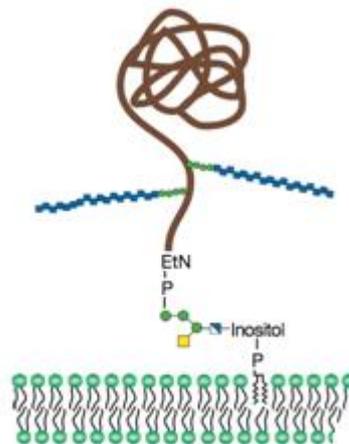


Figure 22 Schéma de la structure des glypicans (D'après (Esko, 2009))

Les glypicans sont composés d'un core protéique relié à la membrane par une ancre GPI à leur extrémité C-terminale. Les glypicans portent des chaînes de HS (bleu).

4.2.4 Les mimétiques des GAG

Dans un tissu lésé, les GAG présentent toujours leurs capacités de liaison aux facteurs de croissance endogènes pour les protéger contre de la dégradation par les protéases et potentialiser leurs effets. Cependant, le tissu cicatriciel de remplacement est souvent fonctionnellement altéré par rapport au tissu sain d'origine (Barritault and Caruelle, 2006). La présence de glycanases dans le tissu lésé

peut en partie expliquer la perte d'activité des GAG endogènes. Dans ce cadre, des mimétiques de GAG dérivés du dextran (polyglucose), ont été développés. En plus d'assurer les mêmes fonctions que les GAG endogènes, ces mimétiques présentent l'avantage d'être résistants aux glycanases. Cette résistance est expliquée par le fait que les liaisons entre les unités saccharidiques se fait par des liaisons $\alpha(1-6)$ qui ne sont pas reconnues par les glycanases des mammifères, contrairement aux liaisons $\alpha(1-3)$, $\beta(1-3)$ ou $\beta(1-4)$ des GAG naturels.

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle génération de mimétiques dérivés du dextran est développée en collaboration avec le laboratoire CRRET. Leur synthèse est chimique est maîtrisée et surtout reproductible (Papy-Garcia D., 2005). Ces mimétiques présentent des taux de substitution de groupement sulfate et carboxylate similaires à ceux des HS. Les recherches cliniques sur la molécule leader (OTR4120) ont abouti à la commercialisation de deux dispositifs thérapeutiques pour le traitement des ulcères de la peau et de la cornée (Chebbi et al., 2008; Desgranges et al., 1999).

Les mimétiques présentent une activité proangiogénique expliquée par la potentialisation des effets du VEGF en favorisant sa liaison à ses récepteurs de haute affinité VEGFR-1 et VEGFR-2 (Rouet et al., 2005).

Les mimétiques ont favorisé la réparation de l'os dans plusieurs modèles de défaut de calvaria. Une étude a testé l'application d'une matrice de collagène imbibée de ces molécules dans un défaut de calvaria chez le rat. Dès 14 jours, le comblement osseux était significativement augmenté, sans inflammation, et des nodules osseux s'étaient formés dans le tissu conjonctif fibreux. Le processus d'ostéorésorption par les ostéoclastes avait été accéléré, ce qui avait conduit à une maturation tissulaire plus rapide (Colombier et al., 1999; Lafont et al., 2004). Ces résultats montrent un fort potentiel de l'OTR4120 dans le cadre de la régénération osseuse.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1

Effets de HARP sur les voies de différenciations chondroblastiques et ostéoblastiques des CSM humaines

- **Article 1**

“Pleiotrophin commits human mesenchymal stromal cells toward hypertrophy during chondrogenesis”

Thibault Boudierlique, Emilie Henault, Angélique Lebouvier, Hélène Rouard, José Courty, Patricia Albanese and Nathalie Chevallier

Soumis à Biomaterials

Running head: Pleiotrophin and hMSC chondrogenesis

Pleiotrophin commits human mesenchymal stromal cells toward hypertrophy during chondrogenesis

Thibault Boudierlique ^{a,b}, Emilie Henault ^a, Angélique Lebouvier ^{b,c}, Helene Rouard ^{b,c}, José Courty ^a, Patricia Albanese ^{a,*,#} and Nathalie Chevallier ^{b,c,*}.

^a EAC CNRS 7149, Université Paris Est, Sciences and Technology Faculty, Créteil, France

^b EA3952, Cellular and Tissular Bioengineering Laboratory, Henri Mondor Hospital, Paris-EST Creteil University, France

^c Cell Therapy Facility, EFS Ile de France, Creteil, France

* These authors contributes equally to this work

Corresponding author : Patricia Albanese, albanese@u-pec.fr

CHAPITRE 1 Effets de HARP sur les voies de différenciations chondroblastiques et ostéoblastiques des CSM humaines

1 Introduction

Lors d'une fracture, la première étape de la réparation osseuse passe par la création d'un tissu de transition appelé callus. Les différentes étapes de la formation du callus jusqu'à l'obtention d'un nouveau tissu fonctionnel récapitulent les événements survenant durant la croissance osseuse endochondrale. Durant la formation osseuse endochondrale, les chondrocytes des plaques de croissance prolifèrent en synthétisant une matrice principalement composée de collagène de type 2 et de protéoglycannes. Lorsqu'ils atteignent la zone dite hypertrophique, les chondrocytes sont plus gros, calcifient leur matrice, et synthétisent des protéines spécifiques de cette zone hypertrophique comme le collagène de type 10 et la MMP13. Ce changement matriciel est associé à une dégradation de la matrice par les MMPs, qui permettra une invasion vasculaire, permettant le recrutement des chondroclastes et des ostéoblastes qui participeront à l'ossification proprement dite (Olsen, Reginato, and Wang, 2000).

Durant la régénération osseuse, de nombreux facteurs de croissance, comme les FGF ou les BMP, sont régulés finement pour synthétiser une nouvelle matrice osseuse fonctionnelle. Parmi ces facteurs de croissances, HARP a été montré comme étant localisé dans le callus chez le rat (Petersen et al., 2004) mais aussi dans la zone hypertrophique des plaques de croissance murine (Petersen and Rafii, 2001). De plus, lors de l'arthrose, la protéine HARP est retrouvée dans la synovie de l'articulation, et durant cette pathologie dégénérative du cartilage les chondrocytes articulaires des zones en dégradation présentent un phénotype hypertrophique (Pufe et al., 2003a; Pufe et al., 2003b). Ces corrélations spatio-temporelles ont été attribuées à un effet de HARP sur l'invasion vasculaire ou alors comme potentialisateur de l'ossification observées dans ces processus, sans pour autant que des résultats puissent venir soutenir cette hypothèse.

Des travaux réalisés sur des CSM humaines ont montré de faibles effets de HARP sur la différenciation ostéoblastique, caractérisée par une augmentation de l'activité phosphatase alcaline (Yang et al., 2003). Des études réalisées sur des chondrocytes articulaires semblent plus intéressantes. En effet, l'ajout de HARP au milieu de culture de chondrocytes bovins a permis de stopper leur prolifération et d'augmenter leur synthèse de glycosaminoglycannes (Tapp et al., 1999).

Notre hypothèse est que HARP pourrait ne pas être impliqué uniquement dans les phénomènes d'angiogénèse mais pourrait également être impliqué dans la formation du callus cartilagineux et osseux ou des ostéophytes. Pour étayer cette hypothèse, nous avons étudié les effets *in vitro* de HARP sur des CSM humaines durant leurs différenciations dans les voies ostéoblastique et chondroblastique.

Ces résultats sont décrits ci-après et font l'objet de l'article 1 actuellement en cours de soumission à la revue à comité de lecture international "Biomaterials".

Lors de l'embryogénèse, les progéniteurs cartilagineux subissent une condensation avant leur différenciation proprement dite (pour revue (Olsen, Reginato, and Wang, 2000)). Nous avons donc voulu évaluer l'impact de l'organisation cellulaire sur la réponse à HARP. Pour cela, nous avons comparé la réponse à HARP de CSMh adhérentes au plastique (2D) à des CSMh cultivées en culot (3D). Ces données complémentaires sont décrites à la suite de l'article 1.

2 Article

Running head: Pleiotrophin and hMSC chondrogenesis

Pleiotrophin commits human mesenchymal stromal cells toward hypertrophy during chondrogenesis

Thibault Boudierlique ^{a,b}, Emilie Henault ^a, Angelique Lebouvier ^{b,c}, Helene Rouard ^{b,c}, José Courty ^a, Patricia Albanese ^{a,*,#} and Nathalie Chevallier ^{b,c,*}.

^a EAC CNRS 7149, Université Paris Est, Sciences and Technology Faculty, Créteil, France

^b EA3952, Cellular and Tissular Bioengineering Laboratory, Henri Mondor Hospital, Paris-EST Creteil University, France

^c Cell Therapy Facility, EFS Ile de France, Creteil, France

* These authors contributes equally to this work

Corresponding author : Patricia Albanese, albanese@u-pec.fr

Abstract

Pleiotrophin (PTN) is a growth factor expressed in growth plate matrices during bone development and also overexpressed in the callus during bone healing. Bone healing is a complicated process that recapitulates endochondral bone development which involves many cell types such as chondrocytes, osteoblasts and mesenchymal stromal cells (MSC). As MSC are the key cellular component of bone regeneration since they differentiate toward chondrogenic and osteoblastic lineages. This study aims to determine PTN properties on osteoblastic and chondrogenic differentiation of human MSC. We studied human MSC response to PTN under osteoblastic and chondrogenic induction by histological analysis and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. No effect of PTN was observed on osteoblastic differentiation. In contrast, PTN dramatically potentiated chondrogenic differentiation as seen by a strong increase of proteoglycans and cartilage related genes expression such as Sox9, collagen 2 and COMP. Moreover, gene expressions of MMP13, collagen 10 and alkaline phosphatase, potent markers of chondrocyte hypertrophy, were also increased. PTN enhanced calcification and collagen 10 content in chondrogenic pellets. These effects were associated with modulations of PTN receptors expression during differentiation. These data suggest a new role of PTN in bone regeneration as an inducer of hypertrophy during chondrogenic differentiation of MSC. This is of major interest since PTN or derived peptides could be used as new regenerative tools to associate with scaffold in bone repair field.

Introduction

Bone formation during growth and regeneration passes through a common process known as endochondral bone formation (1). In this process, chondrocytes in growth plates proliferate while synthesizing cartilage extracellular matrix mainly composed of proteoglycans and collagen 2 (col2). When chondroblasts reach the hypertrophic zone, they are bigger sized and express specific hypertrophic markers such as matrix metalloprotease 13 (MMP13), collagen 10 (col10) and alkaline phosphatase (ALP). Hypertrophic chondrocytes calcify their surrounding matrix before undergoing apoptosis (2). Concomitant matrix degradation by MMPs allows vessels ingrowth and chondroclasts invasion to prepare osteoblasts incoming. Osteoid matrix based on collagen 1, is synthesized and calcified by osteoblasts to provide a functional bone. Then, throughout life, bone is submitted to a constant remodeling process, alternating matrix degradation and bone synthesis.

Bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) are the key cellular component of bone regeneration since they differentiate toward chondrogenic and osteoblastic lineages and release growth factors (3, 4). During bone and cartilage formation, many growth factors are tightly regulated to give rise to a suitable matrix. The transforming growth factor (TGF) super-family in particular bone morphogenetic proteins (BMP) and TGF β are the most known factors involved in this processes (1). However, numerous other growth factors are also involved in osteoarticular organogenesis. Among them, Pleiotrophin (PTN) is a 136 amino acid growth factor that has been first isolated from brain and bone matrices (5-7). PTN, also known as heparin affin regulatory peptide (HARP), share 90% homology between bovine, rat, chicken and human (6, 8, 9) suggesting an important role in metabolism. PTN has three known receptors, anaplastic lymphoma kinase (ALK) which is defined as a high affinity receptor (10). The heparan sulfate proteoglycan syndecan 3 (SDC3) and the chondroitin sulfate proteoglycan protein tyrosine phosphatase receptor type z (PTPRz) are defined as low affinity receptors (11, 12).

PTN is widely expressed in many tissues during fetal development (13, 14) whereas its post-natal expression is predominantly restricted to nervous system and bone (14). PTN has been implicated in many processes such as neurite outgrowth during brain development (15) and endothelial cell properties in normal and pathological angiogenesis (for review see (16)). Finally data suggest that PTN is involved in bone and cartilage development and regeneration processes since it was localized around hypertrophic chondrocytes and osteoprogenitors in rat, mice and chicken developing leg (8, 17, 18). Moreover, in vitro studies showed that PTN treatment stimulates the proteoglycan synthesis of bovine mature chondrocytes (19) and enhances chondrogenesis of chicken limb bud mesenchymal cells in pellet culture (20). Other in vitro experiments showed that PTN induces migration of osteoblast cell lines (8) and osteoprogenitors from human bone marrow (21), as well as osteoblastic differentiation of bone marrow derived cells (21, 22).

PTN overexpression under osteocalcin promoter in transgenic mice induces a higher bone mineral content and a delayed bone growth kinetic compared to wild-type (23). Furthermore, bone

mass loss due to estrogen deficiency is compensated in PTN transgenic mice (24). However relevance of PTN effects on bone physiology still remain controversial since Lehmann and coll. showed no specific bone phenotype in PTN deficient mice (25). Imai and coll. confirmed that PTN knockout and wild type mice had the same skeletal morphology but they observed a growth retardation of their weight-bearing bones. In addition to their impaired growth, they showed an osteopenic phenotype that develops in adult deficient mice (26).

During bone regeneration, in rat, PTN is expressed in the callus (27) and human patients with fracture union showed higher seric levels of PTN than patients with delayed union (28). Because of its known angiogenic properties in physiological and pathological conditions (16), it was supposed that PTN could induce vessel invasion in the callus (18). However, few data are available on a potential effect of PTN on chondrocytes hypertrophy commitment which could in part explain its role in cartilage extracellular matrix during bone repair.

The aim of this study was to define the effects of PTN on human MSC (hMSC) differentiation toward osteoblastic and chondroblastic lineages with a focus on chondrocytic hypertrophy. We evaluate osteoblastic and chondroblastic differentiation lineages obtained from cultured hMSC in presence of recombinant human PTN by histological and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis. We then focus on hypertrophic late differentiation step and establish a new role of PTN on endochondral bone formation.

Materials and methods

Human mesenchymal stromal cells isolation

Human bone marrow (3- to 5-ml volumes) was obtained from iliac crest marrow aspirates of patients undergoing standard bone marrow transplantation procedures (Henri Mondor Hospital, AP-HP Créteil, France) after receiving their informed consent. Bone marrow aspirates from 3 healthy donors (26-38 years old) were used. Nucleated cells from fresh marrow were seeded at $2 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ in 225-cm^2 flasks. Cell sample was used for the confirmation of hMSC characteristics as previously described (29). Briefly, all the hMSC are positive for CD90, CD105, CD73, negative for CD34 and CD45 and able to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages (data not shown). hMSCs were expanded in α -modified Eagle's medium (α MEM) (Life technologies, Cergy Pontoise, France) containing 10% foetal bovine serum (FBS) (StemCell Technologies, Grenoble, France) supplemented with 0,5% Cifloxacin (Bayer Pharma, Puteaux, France). Culture medium was changed twice every week and cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C . When cells reached 80-90% confluence (passage 0, P0), they were detached using trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Austria) and then replated at $1000\text{ cells}/\text{cm}^2$ (passage 1, P1).

Human MSC differentiation

All differentiations were performed at passage 2. For osteogenic differentiation, cells were seeded in 6-well plates. When cells reached 80% confluence, media were supplemented with a minimal osteoinductive media based on 50 mM L-ascorbic acid-2-phosphate and 10 mM β -

glycerophosphate (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) with increasing doses of PTN (produced and purified as described in (30)). On days 0, 7 and 14, cells were washed twice with HBSS (Life technologies) and lysed for RNA extraction. On day 21, Alizarin Red-S (ARS) (Sigma Aldrich) staining was performed to reveal calcium deposition. ARS was recovered by acetic acid extraction as described by Gregory et al. (31) to assess relative quantification of calcium deposition. Chondrogenic differentiation was performed in pellet culture using Stempro Chondrogenesis Differentiation Kit (Life technologies) as described by manufacturer with increasing doses of PTN. On days 0, 7, 14, pellets were lysed for RNA extraction. On day 14, pellets were frozen to perform sulfated glycosaminoglycans (GAG) extraction as previously described in (32). GAG quantification was realized on five pellets per condition for three patients and normalized with pellets volume. On day 21, pellets were fixed in formaldehyde for further histological analysis.

Quantitative real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total mRNA from osteoblastic and chondroblastic cultures were isolated using RNeasy mini kit (Qiagen, France) and TRIzol® reagent (Life technologies) respectively, as described by manufacturers. DNase (Promega, France)-treated RNA were reverse transcribed with RT Superscript III (Life technologies), cDNA real-time amplification was performed with FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Meylan, France) following manufacturer procedures and monitored with the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (PerkinElmer/Applied Biosystem, Rotkreuz, Switzerland). Primers (Table 1) were designed by Primer3output software (33) and obtained by Eurofins MWG (Huntsville, Germany). Primers efficiency was checked to be between 95% and 100%. Amounts of cDNAs of interest were normalized to GAPDH ($\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{\text{GAPDH}}$). Results are reported as relative gene expression ($2^{-\Delta CT}$).

Histological analysis

Chondrogenic pellets were fixed in formaldehyde 4% (Sigma Aldrich) and embedded in paraffin. Sections (3µm) were stained with Alcian blue 8GX and counterstained with hematoxylin reagents (Sigma Aldrich), or stained with ARS alone. Immunohistochemical staining for collagen II (clone 6b3, MerckMillipore Saint-Quentin en Yveline, France) and collagen X (Sigma Aldrich) was carried out after antigen retrieval with boiled citrate buffer during 2 minutes (Dako, Trappes, France) and incubation with primary antibody overnight at 4°C. Revelation was performed using a goat anti mouse multiHRP (MerckMillipore) and histogreen (Eurobio-Abcys, Les Ulis, France) and counterstained with hematoxylin (Sigma Aldrich).

Statistical analysis

Results were expressed as mean of values \pm standard error mean (SEM) from three independent patients with at least 3 to 5 values per condition and per patient. Statistical analyses were performed using a one way anova Kruskal-Wallis test (GraphPad Software). Differences between groups with a p-value of ≤ 0.05 were considered to be significant.

Results

PTN does not modulate osteoblastic differentiation of hMSC

To test PTN properties on osteoblastic differentiation, hMSC were cultured with increasing concentrations of PTN in basal (ND) or in minimal osteoinductive (AB) medium. Calcium deposition was examined by ARS staining at day 21 and quantified by optic density measurement. In absence of PTN, AB cells showed a threefold increase of mineralization as compared to ND cells (Figure 1A and 1B). Addition of PTN did not significantly modulate calcium deposition (Figure 1A and 1B). Osteoblastic markers expressions were analyzed by qRT-PCR at days 0, 7 and 14. In absence of PTN, AB medium induced significantly the expression of BMP2, BSP, OP and ON between day 0 and day 7. BMP2, BSP and OP were increased by fourfold at day 14 as compared to day 7, whereas the expression levels of OC and ALP were not significantly modified during the differentiation process (Figure 1C). Addition of PTN at 50 pg/ml or 500 pg/ml didn't show any significant effect on the expression of osteoblastic markers in AB medium (Figure 1C) as well as in ND medium (data not shown). These data suggest that PTN has no impact on osteoblastic differentiation of hMSC.

PTN potentiates chondrogenic differentiation of hMSC

Chondrogenic potential of PTN was tested on hMSC cultured in micromass with chondroinductive medium (CM). Slices of micromass were immunostained for col2 at day 21 (Figure 2A). In absence of PTN, CM pellets showed few hot spots of col2 staining and a slight shadow of staining throughout the pellet. Same results were obtained on pellets treated with 50 pg/ml of PTN. Surprisingly pellets treated with 500 pg/ml of PTN had hot spots staining but also showed a strong staining at the periphery and a slight shadow throughout the pellet. Chondrogenic markers expression was further analyzed by qRT-PCR at days 0, 7 and 14 (Figure 2C). Col2 was not expressed at day 0. In CM alone, col2 expression was significantly induced between day 0 and day 7 whereas Sox9, COMP and col9 expressions were not modified. Between day 7 and day 14, CM condition is associated with an up regulation of Sox9 (8-fold), col2 (3-fold) and COMP (3-fold) expressions. PTN at 50 pg/ml had no significant effect on chondrogenic gene expression as compared to CM alone. In contrast, addition of 500 pg/ml of PTN induced a massive increase of Sox9 (600-fold), collagen 2 (60-fold), collagen 9 (160-fold) and COMP (50-fold) expressions at day 14 as compared to CM alone. Same analysis of PTN effect on chondrogenic gene expression was performed in ND condition (data not shown). Whereas addition of 50 pg/ml of PTN did not have any effect, treatment with 500 pg/ml of PTN induced a significant increase of collagen 9 at day 7 and Sox9 at day 14. All together these results show a potentiation of hMSC chondrogenic differentiation by PTN.

PTN stimulates proteoglycan synthesis during chondrogenic differentiation of hMSC

GAG synthesis is of major importance in cartilage by giving its compressive strength and participating to collagen fibrils organization (34). We evaluated PTN effects on GAG presence in hMSC pellets by alcian blue staining at day 21. Without PTN, micromasses were stained by alcian blue mainly at the periphery. When pellets were treated with PTN they were stained intensely

throughout the pellet, especially for the 500 pg/ml dose (Figure 3A). Quantification of GAG content per mm³ confirmed our histological observations (Figure 3B) since PTN treated pellets (500 pg/ml) showed a significant 2-fold increase of GAG content as compared to CM alone.

Proteoglycans core expressions were assayed by qRT-PCR at days 0, 7 and 14. In absence of PTN, CM significantly enhanced ACAN expression at day 7 and DCN expression at day 14 whereas having no effect on VCAN and BGN expression (Figure 3C). ACAN expression was drastically decreased at day 14 in CM. ACAN expression at day 7 was decreased by PTN treatments, either at 50 pg/ml or 500 pg/ml, whereas a clear induction of expression was observed at day 14 as compared to CM alone. This result suggests that PTN could be involved in modulation of ACAN expression during chondrogenic differentiation. PTN treatments clearly induced an increase of DCN expression from day 7 to day 14. Compared to CM alone, PTN treatments augmented significantly expression of VCAN at day 14. Finally PTN treatment at 500 pg/ml strongly induced expression of BGN at day 14. These data clearly indicate an inductive effect of PTN on proteoglycan core expression during chondrogenic differentiation.

PTN commits hMSC toward chondrogenic hypertrophy

We then investigate PTN effects on hypertrophic differentiation of chondroinduced hMSC. We stained Pellets with Alizarin Red (Figure 4A) and for collagen 10 (Figure 4B) at day 21. Surprisingly, pellets treated with 500 pg/ml of PTN showed an intense red staining with hot spots around hypertrophic cells, whereas the two others conditions had only red shadow staining (Figure 4A). Pellets treated with 500 pg/ml of PTN showed an intense staining for collagen 10 mostly at the periphery of the micromass whereas the two others conditions showed only slight shadows with few hot spots (Figure 4B). We then analyzed expression of hypertrophic markers by qRT-PCR on days 0, 7 and 14. MMP13 and col10 were not expressed at day 0. CM induced MMP13 and col10 expression at day 7 and day 14. ALP expression was concomitantly decreased during chondrogenic induction. We observed that whereas 50 pg/ml of PTN had no effect as compared to CM alone, 500 pg/ml of PTN strongly increased expression of MMP13 (60-fold) and col10 (15-fold) at day 14 as compared to CM alone. Moreover, ALP expression was induced at day 14 by PTN treatment at 500 pg/ml (Figure 4C). These data clearly show an inductive effect of PTN on the commitment of hMSC toward a hypertrophic state.

PTN receptors expressions are modulated during chondrogenic differentiation

As we show that PTN plays a role in chondrogenic hypertrophic differentiation of hMSC, we investigate the expression profiles of PTN receptors by qRT-PCR analysis during hMSC chondrogenic differentiation. The three receptors are expressed in hMSC before differentiation (Figure 5A), with a higher gene expression of SDC3 as compared to PTPRz and ALK. We then analyzed their expressions during chondroinduction of hMSC in CM condition. Whereas ALK expression was not modulated during chondrocytic differentiation in absence of PTN, its expression was strongly and transiently induced at day 7 by the 500 pg/ml dose of PTN. In contrast, PTPRz expression was induced by CM

treatment at day 14 and no significant modulation was observed with 500 pg/ml of PTN. Surprisingly PTPRz expression was prematurely induced at day 7 with 50 pg/ml of PTN but did not increase at day 14. Finally, SDC3 expression was down regulated during chondroinduction at day 7 and 14 but was strongly up regulated by PTN treatments with a significant increase for 500 pg/ml at day 14. Our data indicate the presence of the three known PTN receptors on hMSC and the modulation of their expression during hMSC chondrogenesis.

Discussion

Bone formation and repair can be obtained by a direct intramembranous bone formation or by an endochondral formation, involving a cartilage template formation prior to ossification. These processes involve complex extracellular matrix protein deposition and growth factors expression. Among them PTN is a heparin binding growth factor expressed in growth plate of mice during prenatal and post-natal bone formation. Its expression is down regulated during adulthood but is induced in the callus during bone healing (18, 27). We hypothesized here that PTN effect in bone could be due in part to its activity on chondrogenic differentiation during endochondral bone formation. We then decided to compare the effect of PTN during chondroblastic and osteoblastic differentiation of hMSC.

First, we did not observe any osteogenic effect of PTN (50 to 500 pg/ml) on hMSC cultured in basal or in minimal osteoinductive media either by gene expression analysis or by calcium staining. Previous data obtained by Yang et coll. suggest that very low doses, such as 10 pg/ml, of PTN are able to potentiate hMSC osteoblastic differentiation which was characterized by ALP activity. However, a higher dose of 10 ng/ml has no effect on osteoblastic differentiation. Our results confirm the hypothesis suggesting that PTN effects on osteoblastic differentiation are low dose dependant (21).

Inversely our results clearly indicate that higher doses of PTN (500 pg/ml) enhances the expression of cartilage specific protein (Sox9, col2, col9 and COMP), proteoglycan core (BGN, DCN and VCAN) and GAG synthesis during chondrogenic differentiation of hMSC. Previous data had already indicated that PTN potentiates late chondrogenic markers such as col2 expression at protein and gene level and GAG synthesis in mature chondrocytes from articular cartilage but also that PTN modulates proteoglycan protein expression such as BGC and ACAN, whereas having no effect on DCN (19). Our results indicate for the first time that PTN can have a differentiation potential even on immature adult stromal cells. Moreover, PTN induces the expression of early marker of chondrogenic differentiation like Sox9 in these cells. Our results suggest that transduction pathways activated by PTN treatment are also able to potentiate late chondrogenic gene expression. Together, these data indicate an important role of PTN in stem cell biology.

Previous immunostaining studies indicated that PTN was present in hypertrophic zone of growth plate and callus in mice, rat and chicken (17, 18, 27), successively expressed by chondroblasts and osteoblasts. Our results demonstrate for the first time that PTN enhances hypertrophic markers

expression such as MMP13, col10 and ALP during chondrogenic differentiation of hMSC. Moreover, PTN treated pellet showed calcium deposits associated to col10 immunostaining around hypertrophic cells. These results suggest that PTN is involved in chondrocytic hypertrophy which is of great interest since chondrocyte hypertrophy is a key step in endochondral bone formation (2). It remains to elucidate if PTN acts alone to induce hypertrophy or if its properties on hypertrophy are mediated through interaction with other growth factors such as TGF β or BMP that were previously described as inducers of chondrogenesis (for review see (1)).

We demonstrate that PTN induces chondrocytic hypertrophy of hMSC. Previous results obtained by Tapp et coll. showed that PTN inhibits mature chondrocytes proliferation (19). Taken together, these data may suggest that the growth retardation observed in PTN overexpressing mice (23) could be due to an inhibition of chondrocytes proliferation in the proliferating zone of growth plate associated to a premature hypertrophic induction and matrix calcification in this mouse strain. Surprisingly, the absence of PTN also results in growth retardation in young PTN KO mice (26). As we showed a major role of PTN on chondrocytic hypertrophy commitment, this issue could be explained by a slowdown of progenitor's chondrogenic differentiation.

The analysis of PTN receptors gene expression profiles indicates for the first time that the three known receptors PTPRz, ALK and SDC3 are expressed by hMSC, with high level of SDC3 expression as compared to PTPRz and ALK that are very low in these undifferentiated cells. As Seghatoleslami et al. have previously showed that blocking SDC3 with an antibody inhibits chondrogenic differentiation (35), we can hypothesized that the chondrogenic differentiation of hMSC observed after PTN addition pass in part through SDC3. PTN is expressed in the callus (27). As SDC3 had also been shown to be involved in osteoblasts migration (8), the expression of SDC3 by hMSC could allow them to be recruited on site via the PTN/SDC3 pathway where they can play a role in callus formation (3).

Chondrogenic differentiation of hMSC was associated with an upregulation of PTPRz and SDC3, whereas ALK expression was not induced. This suggests that these 2 proteoglycans are modulated during chondrogenesis and could play a role in this commitment. This is in agreement with previous data showing that SDC3 is involved in chondrogenic differentiation (35). Whereas PTPRz has already been involved in bone growth through its expression by osteoblasts (36), no data are available on its link with chondrogenesis. We show for the first time that hMSC chondrogenic differentiation is associated with an up-regulation of PTPRz expression. As the β -catenin pathway can be activated by PTPRz (37) and is essential for cartilage and bone development (38), it would be of interest to test if PTN effects on chondrogenesis pass through β -catenin activation via PTPRz pathway.

Treatment with PTN in chondrogenic medium is associated with an enhancement of SDC3 and a strong induction of ALK expression whereas PTPRz is not modified compared to chondrogenic medium alone. These data suggest that PTN effect on chondrogenic differentiation of hMSC may pass in part through the induction of SDC3, leading to an increase of SDC3 downstream signalization

pathway activation. Furthermore, the strong ALK induction by PTN may suggest its role in hypertrophic commitment and matrix mineralization. Concomitantly, we observed that osteogenic differentiation of hMSC is associated with an exclusive up-regulation of ALK expression (data not shown). This is of great interest since PI3k/Akt pathway, which is the downstream effector of ALK (10), was involved in matrix mineralization (39). Mice defective for Akt exhibits normal growth plate morphology but their hypertrophic chondrocyte failed to mineralize their surrounding matrix resulting in dwarfism.

Conclusion

Because of their differentiation properties MSC are regarded as promising tools in bone regenerative protocols. However, the remaining challenge in bone engineering is to generate a functional organ. Endochondral bone formation seems to be the more efficient way to attain this purpose according to the different cellular components involved in this process. Indeed, endochondral bone formation goes along with vascular invasion and matrix remodeling (1). Our findings show that PTN treatment potentiates chondrogenic differentiation of hMSC and induces their hypertrophy, highlighting a new role of PTN in bone metabolism. This new PTN effect could be an important cue in the shift of chondrocytes toward hypertrophy observed in the callus during bone regeneration. Its known angiogenic properties (16) associated to our findings suggest that the association of PTN with hMSC and scaffold could allow a physiological repair in bone lesion.

Acknowledgment

Bouderlique Thibault doctoral fellowship was supported by the French Ministère de l'enseignement et de la recherche.

References

1. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(5):459-66.
2. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
3. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 2007;38 Suppl 1:S26-32.
4. Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells. 2008.
5. Courty J, Dauchel MC, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180(1):145-51.
6. Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* 1990;265(28):16721-4.
7. Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T. Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173(1):246-51.
8. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol* 1998;143(4):1113-28.

9. Deuel TF, Zhang N, Yeh HJ, Silos-Santiago I, Wang ZY. Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):162-71.
10. Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 2002;277(39):35990-8.
11. Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem* 1994;269(17):12999-3004.
12. Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* 1996;271(35):21446-52.
13. Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* 1995;121(1):37-51.
14. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol (Berl)* 1992;186(4):387-406.
15. Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 1989;8(10):2933-41.
16. Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15(3):210-4.
17. Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, Raulais D, Vigny M. HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg. *Int J Dev Biol* 1998;42(2):189-98.
18. Petersen W, Rafii M. Immunolocalization of the angiogenic factor pleiotrophin (PTN) in the growth plate of mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121(7):414-6.
19. Tapp H, Hernandez DJ, Neame PJ, Koob TJ. Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage. *Matrix Biol* 1999;18(6):543-56.
20. Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, Raulais D, Vigny M. HB-GAM/pleiotrophin but not RIHB/midkine enhances chondrogenesis in micromass culture. *Exp Cell Res* 1998;241(1):171-80.
21. Yang X, Tare RS, Partridge KA, Roach HI, Clarke NM, Howdle SM, et al. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res* 2003;18(1):47-57.
22. Tare RS, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI. Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res* 2002;17(11):2009-20.
23. Tare RS, Oreffo RO, Sato K, Rauvala H, Clarke NM, Roach HI. Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298(3):324-32.
24. Masuda H, Tsujimura A, Yoshioka M, Arai Y, Kuboki Y, Mukai T, et al. Bone mass loss due to estrogen deficiency is compensated in transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238(2):528-33.
25. Lehmann W, Schinke T, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Gebauer M, Pogoda P, et al. Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone* 2004;35(6):1247-55.
26. Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Buki K, Matsusue Y, et al. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone* 2009;44(5):785-94.
27. Petersen W, Wildemann B, Pufe T, Raschke M, Schmidmaier G. The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004;124(9):603-7.

28. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(7):989-97.
29. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*;31(2):270-8.
30. Seddon AP, Hulmes JD, Decker MM, Kovessi I, Fairhurst JL, Backer J, et al. Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor. *Protein Expr Purif* 1994;5(1):14-21.
31. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329(1):77-84.
32. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefiere V, Caruelle JP, Martelly I, Papy-Garcia D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 2003;13(9):647-53.
33. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86.
34. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(2):69-78.
35. Seghatoleslami MR, Kosher RA. Inhibition of in vitro limb cartilage differentiation by syndecan-3 antibodies. *Dev Dyn* 1996;207(1):114-9.
36. Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M, Mueldner C, et al. The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone* 2008;42(3):524-34.
37. Meng K, Rodriguez-Pena A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, et al. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2603-8.
38. Chen M, Zhu M, Awad H, Li TF, Sheu TJ, Boyce BF, et al. Inhibition of beta-catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 9):1455-65.
39. Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, et al. Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development*;138(8):1507-19.

Gene	Primer sequence	Accession number	Product size
Housekeeping gene			
GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (GAPDH)	forward 5'-TGC CTG ATG AGA CAG AGG TG-3' reverse 5'-TCC ACC TGG ACA GGA TTA GC-3'	NM_002046.3	97
Osteoblastic markers			
Bone SialoProtein (BSP)	forward 5'-AAA ACG AAG AAA GCG AAG CA-3' reverse 5'-TTT CTG CCT CTG TGC TGT TG-3'	NM_004967.3	84
Bone MorphoGenetic Protein 2 (BMP2)	forward 5'-TGT GTC CCG ACA GAA CTC AG-3' reverse 5'-ACA ACC CTC CAC AAC CAT GT-3'	NM_001200.2	99
OsteoCalcin (OC)	forward 5'-GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT-3' reverse 5'-TCC CAG CCA TTG ATA CAG GT-3'	NM_199173.4	95
OsteoNectin (ON)	forward 5'-TGC CTG ATG AGA CAG AGG TG-3' reverse 5'-TCC ACC TGG ACA GGA TTA GC-3'	NM_003118.2	82
OsteoPontin (OP)	forward 5'-CGC AGA CCT GAC ATC CAG TA-3' reverse 5'-ATG GCC TTG TAT GCA CCA TT-3'	NM_001040058.1	92
Osteoblastic/hypertrophic markers			
Alkaline phosphatase (ALP)	forward 5'- CCA CGT CTT CAC ATT TGG TG-3' reverse 5'- GCA GTG AAG GGC TTC TTG TC-3'	NM_000478.4	96
Matrix metalloproteinase 13 (MMP13)	forward 5'-TTG AGC TGG ACT CAT TGT CG-3' reverse 5'- GGA GCC TCT CAG TCA TGG AG-3'	NM_002427.3	172
Collagen 10A1 (col10)	forward 5'- GCT AAG GGT GAA AGG GGT TC-3' reverse 5'- CTC CAG GAT CAC CTT TTG GA-3'	NM_000493.3	118
Chondroblastic markers			
SRY-box9 (Sox9)	forward 5'- AGA CAG CCC CCT ATC GAC TT-3' reverse 5'- CGG CAG GTA CTG GTC AAA CT-3'	NM_000346.3	108
Collagen 2A1 (col2)	forward 5'-TGG AAA ACC TGG AAA AGC TG-3' reverse 5'-TGT GAC CTT TGA CAC CAG GA-3'	NM_001844.4	98
Collagen 9A1 (col9)	forward 5'- GCA GGT TTG CAT GAG AGT CA-3' reverse 5'- TGG GAA ACC ATT CTC TCC AG-3'	NM_078485.3	142
Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)	forward 5'- ACA ATG ACG GAG TCC CTG AC-3' reverse 5'- TCT GCA TCA AAG TCG TCC TG-3'	NM_000095.2	115
Proteoglycan core			
Aggrecan (ACAN)	forward 5'- AGG AGT CCC TGA CCT GGT TT-3' reverse 5'-TTC AAC CAA ACT GGT GTC CA-3'	NM_001135.3	85
Biglycan (BGN)	forward 5'- GGA CTC TGT CAC ACC CAC CT-3' reverse 5'- AGC TCG GAG ATG TCG TTG TT-3'	NM_001711.4	159
Decorin (DCN)	forward 5'- GGA CCG TTT CAA CAG AGA GG-3' reverse 5'- GAC CAC TCG AAG ATG GCA TT-3'	NM_133507.2	147
Versican (VCAN)	forward 5'- GGT GCA CTT TGT GAG CAA GA-3' reverse 5'- TTC GTG AGA CAG GAT GCT TG-3'	NM_001119808.1	159
PTN receptors			
Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase (ALK)	forward 5'- GCC AGA AAC TGC CTC TTG AC-3' reverse 5'- GCT CGC CCT GTA GAT GTC TC -3'	NM_014654.3	90
Protein tyrosine phosphatase receptor type z (PTPRz)	forward 5'- CCC CAA CAA GAG GAA GTG AA-3' reverse 5'- AGT GAC TGG TTG GGA AGT GG-3'	NM_002851.2	80
Syndecan 3 (SDC3)	forward 5'- CCA GAG ACC TTC CTG ACC AC-3' reverse 5'- CTT CTG GCA GCT CGA AGT CT -3'	NM_014654.3	85

Table 1. Primers sequences

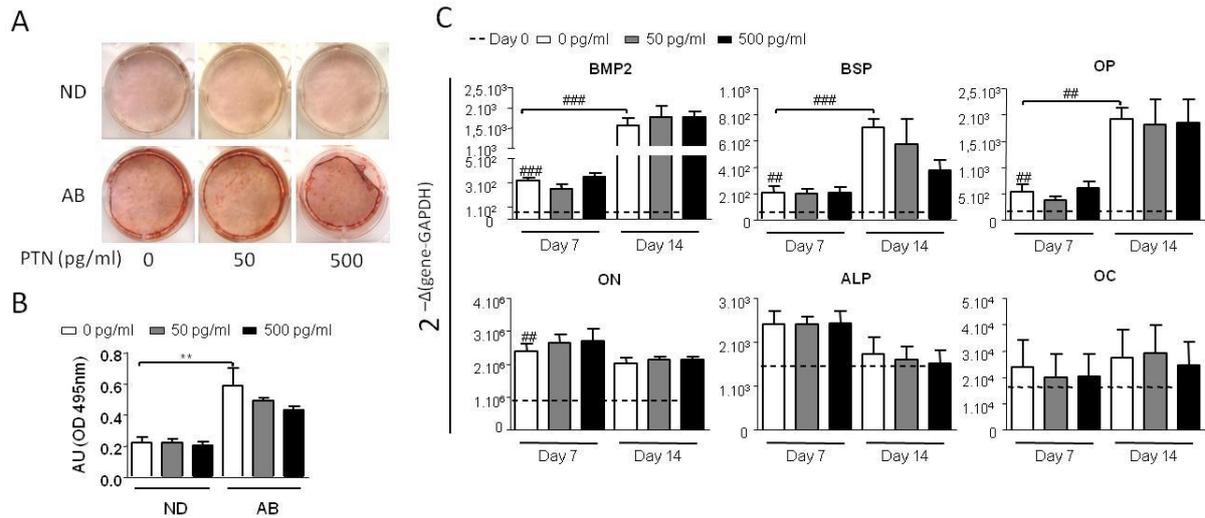


Figure 1. PTN effects on hMSC osteoblastic commitment. hMSC from 3 independent patients were cultured in basal medium (ND) or in osteoinductive medium (AB) in absence or with increasing doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml grey boxes and 500 pg/ml black boxes). All conditions were performed in triplicate per patient. **(A):** Alizarin red S staining after 21 days of culture. Well picture per condition is representative of the three tested patients. **(B):** Alizarin Red S dosage after 21 days of culture, the optical density was reported as Arbitrary Unit (AU). **(C):** qRT-PCR analysis of osteoblastic genes expression after 0, 7 and 14 days culture with AB medium. Expression levels of osteoblastic genes are related to GAPDH. Values are the mean and SEM calculated from triplicates experiment from 3 independent patients. Values of each gene expression from hMSC at day 0 are represented by straightened lines. Statistical analysis were performed between values from free-PTN conditions at day 0, 7 and 14 (##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) and between values from the same day (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

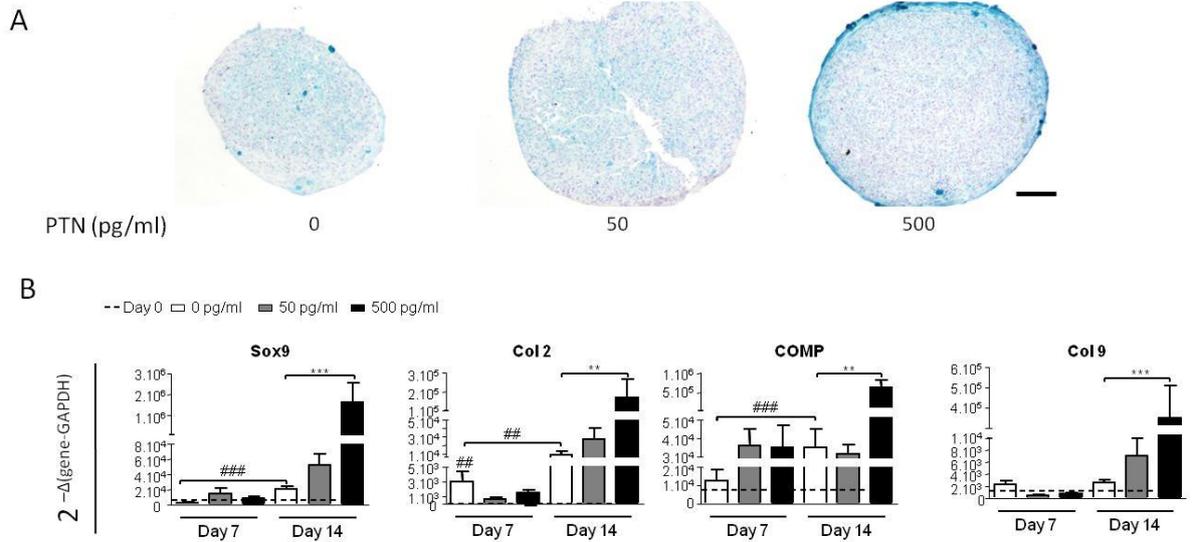


Figure 2. PTN effects on hMSC chondrogenesis. hMSC from 3 independent patients were cultured in micromass with chondrogenic medium in absence or with increasing doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml grey boxes and 500 pg/ml black boxes). All conditions were performed in triplicate per patient. (A): Collagen 2 immunostaining of 21 days chondrogenic pellets. Picture per condition is representative of the three tested patients. Bars represent 100 μ m. (B): qRT-PCR analysis of cartilage related genes expression after 0, 7 and 14 days culture under chondrogenic induction. Expression levels of chondrogenic genes are related to GAPDH. Values are the mean and SEM calculated from triplicates experiment from 3 independent patients. Values of each gene expression from hMSC at day 0 are represented by straightened lines. Statistical analysis were performed between values from free-PTN conditions at day 0, 7 and 14 (##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) and between values from the same day (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

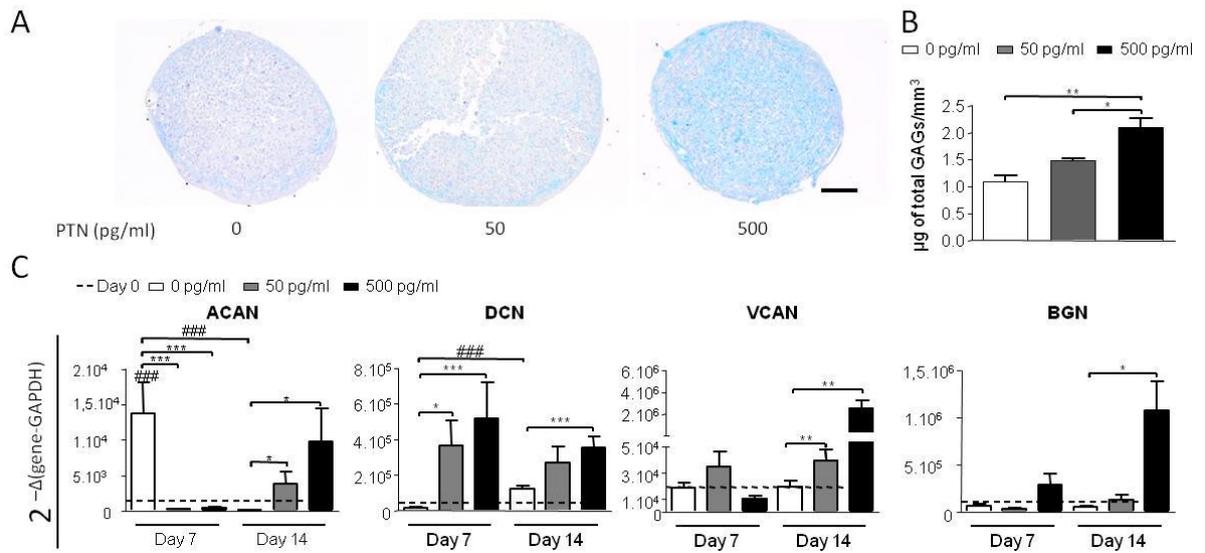


Figure 3. PTN effects on glycosaminoglycans content and proteoglycans genes expression during hMSC chondrogenesis. hMSC from 3 independent patients were cultured in micromass with chondrogenic medium in absence or with increasing doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml grey boxes and 500 pg/ml black boxes). All conditions were performed in triplicate per patient. **(A):** Alcian blue staining of 21 days chondrogenic pellets. Picture per condition is representative of the three tested patients. Bars represent 100µm. **(B):** Total sulfated GAGs quantification in 14 days chondrogenic pellets. GAG amount was normalized according to pellet volume and reported as µg of total GAGs per mm³. **(C):** qRT-PCR analysis of proteoglycan proteic core genes expression after 0, 7 and 14 days culture under chondrogenic induction. Expression levels of proteoglycan genes are related to GAPDH. Values are the mean and SEM calculated from triplicates experiment from 3 independent patients. Values of each gene expression from hMSC at day 0 are represented by straightened lines. Statistical analysis were performed between values from free-PTN conditions at day 0, 7 and 14 (###: p<0.001), and between values from the same day (*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

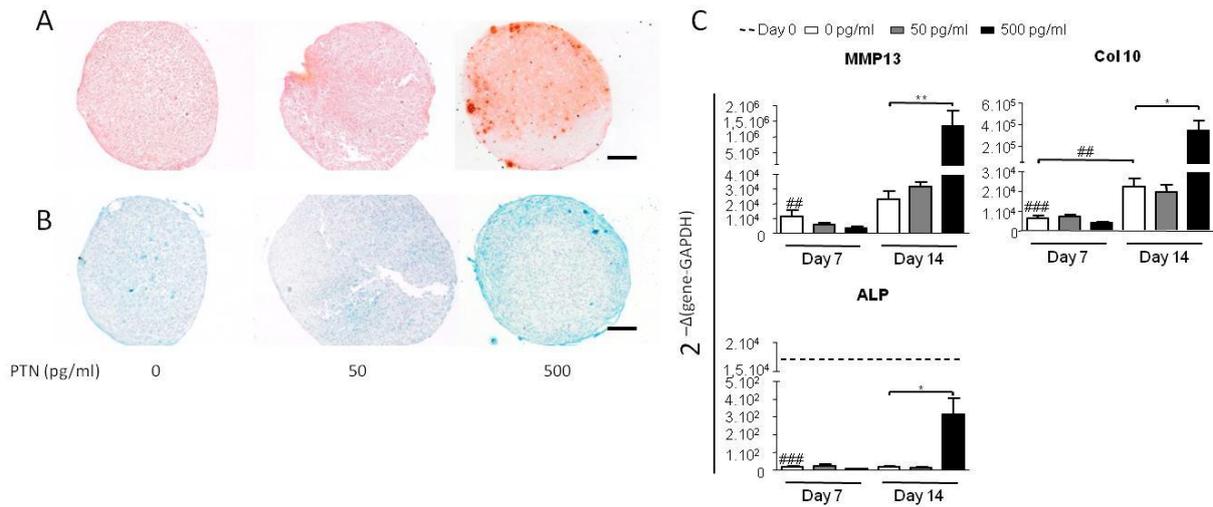


Figure 4. PTN effects on hypertrophy commitment during hMSC chondrogenesis. hMSC from 3 independent patients were cultured in micromass with chondrogenic medium in absence or with increasing doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml grey boxes and 500 pg/ml black boxes). All conditions were performed in triplicate per patient. **(A):** Alizarin red staining of 21 days chondrogenic pellets. Picture per condition is representative of the three tested patients. Bars represent 100 μ m. **(B):** Collagen10 immunostaining of 21 days chondrogenic pellets. Picture per condition is representative of the three tested patients. Bars represent 100 μ m. **(C):** qRT-PCR analysis of hypertrophic related genes expression after 0, 7 and 14 days culture under chondrogenic induction. Expression levels of hypertrophic genes are related to GAPDH. Values are the mean and SEM calculated from triplicates experiment from 3 independent patients. Values of each gene expression from hMSC at day 0 are represented by straightened lines. Statistical analysis were performed between values from free-PTN conditions at day 0, 7 and 14 (##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$, and between values from the same day (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

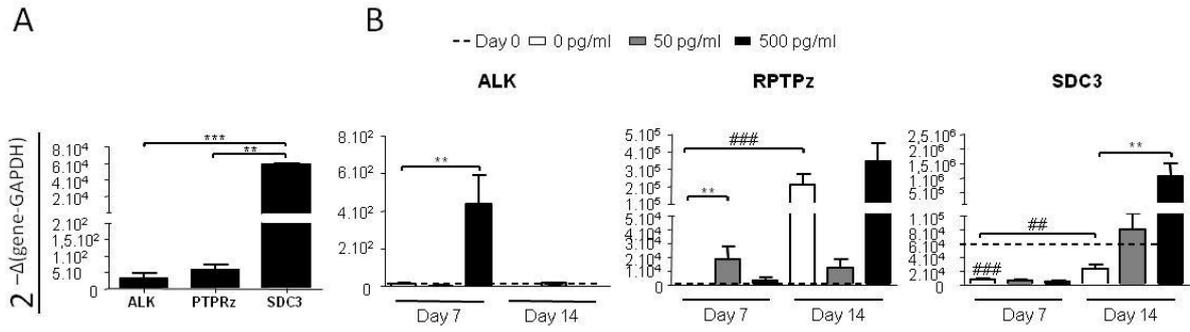


Figure 5. PTN effects on PTN receptors gene expression during hMSC chondrogenesis. hMSC from 3 independent patients were cultured in micromass with chondrogenic medium in absence or with increasing doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml grey boxes and 500 pg/ml black boxes). All conditions were performed in triplicate per patient. **(A):** qRT-PCR analysis of PTN receptors genes expression before differentiation induction. Expression levels of PTN receptors genes are related to GAPDH. **(B):** qRT-PCR analysis of PTN receptors genes expression after 0, 7 and 14 days culture under chondrogenic induction. Expression levels of chondrogenic genes are related to GAPDH. Values are the mean and SEM calculated from triplicates experiment from 3 independent patients. Values of each gene expression from hMSC at day 0 are represented by straightened lines. Statistical analysis were performed between values from free-PTN conditions at day 0, 7 and 14 (##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) and between values from the same day (**: $p < 0.01$).

3 Résultats complémentaires

3.1 Introduction

En parallèle des expériences relatées dans l'article 1, nous avons également étudié les effets de HARP sur les CSMh cultivées en milieu de culture basal (contrôle non différenciateur). De plus, nous avons utilisé deux systèmes de culture. Le premier a consisté à cultiver les CSMh sur du plastique de culture (2D). La deuxième a consisté à cultiver les cellules en culot (3D). Ces paramètres ont été testés de façon à évaluer et comparer l'influence de l'organisation cellulaire dans laquelle se trouvent les CSMh sur l'expression des marqueurs de différenciation, lors des différenciations ostéoblastiques et chondrogénique. Ces analyses, initialement réalisées comme contrôles des conditions de différenciations, décrites dans l'article 1, nous permettent de décrire en résultats complémentaires un effet différentiel de HARP en fonction de l'organisation cellulaire utilisée pour la culture des CSMh.

3.2 Résultats

3.2.1 Effets de HARP sur l'expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 2D non différenciées.

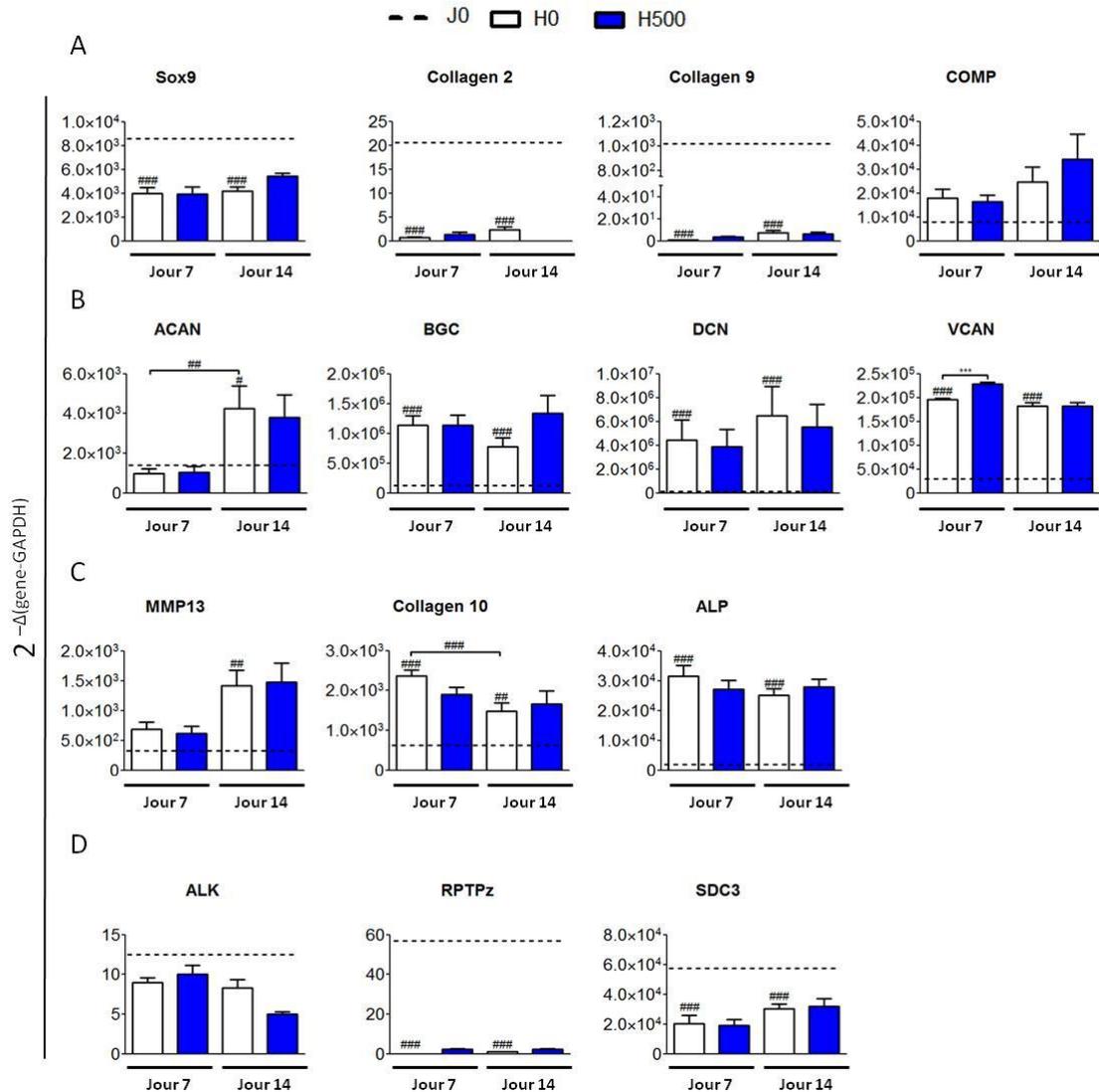


Figure 23 Expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 2D non différenciées, en absence ou en présence de HARP.

Après 7 et 14 jours de culture en 2D en milieu basal supplémenté ou non en HARP (blanc: 0 pg/ml (H0); bleu: 500 pg/ml (H500)), les ARN de CSMh de trois patients sont extraits. Une analyse est effectuée, par RT-quantitative PCR sur les ARN totaux, de l'expression des gènes codant pour (A) marqueurs de différenciation chondrogénique Sox9 (SRV-box 9), collagène 2, collagène 9 et COMP (cartilage oligomeric matrix protein), (B) protéoglycannes aggrécane (ACAN), biglycane (BGC), décorine (DCN) et versican (VCAN), (C) marqueurs de différenciation hypertrophique "matrix metalloprotease 13" (MMP13), collagène 10 et phosphatase alcaline (ALP), (D) récepteurs de HARP "anaplastic lymphoma kinase" (ALK), "receptor protein tyrosin phosphatase type z" (RTPz). Le niveau d'expression des gènes au jour 0 avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type des 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-\Delta(\text{gène-GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions sans HARP (#: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) et entre les valeurs du même jour (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression de marqueurs de la différenciation chondrocytaire et hypertrophique en absence de HARP. Alors que les CSM sont maintenues en 2D dans un milieu basal (non différenciateur), l'expression des marqueurs chondrocytaires collagène2, Sox9 et collagène 9 est fortement et significativement inhibée dès le 7^e jour de culture, tandis que l'expression de COMP est faiblement augmentée de façon non significative, (Figure 23 A).

A l'inverse, les profils d'expression de tous les PG étudiés ainsi que des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire sont tous augmentés de façon très significative dès J7 pour la plupart d'entre eux. (Figure 23 B, C).

Concernant les récepteurs de HARP, tandis que l'expression de ALK, faible à sous confluence, n'est pas modifiée significativement, l'expression du SDC3 et de RPTPz est inhibée dès le 7^e jour de culture (Figure 23 D).

Enfin lorsque HARP, à la dose de 500 pg/ml, est ajouté à ces cultures à long terme (14 jours) en 2D, on n'observe aucun effet de HARP sur l'expression génique des CSM, (Figure 23).

La culture des CSM en 2D est associée à une inhibition des marqueurs chondrocytaires Sox9, collagène 2 et collagène9. On observe cependant une induction de l'expression des PG et des marqueurs normalement associés à l'hypertrophie chondrocytaire (collagène 10, MMP13) ou à la minéralisation (ALP), indiquant un processus de remodelage de la matrice. On observe également une forte baisse de l'expression de RPTPz et de SDC3. L'expression du récepteur ALK, à la limite de détection au jour 0, ne semble pas être modifiée.

3.2.2 Effets de HARP sur l'expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 3D non différenciées.

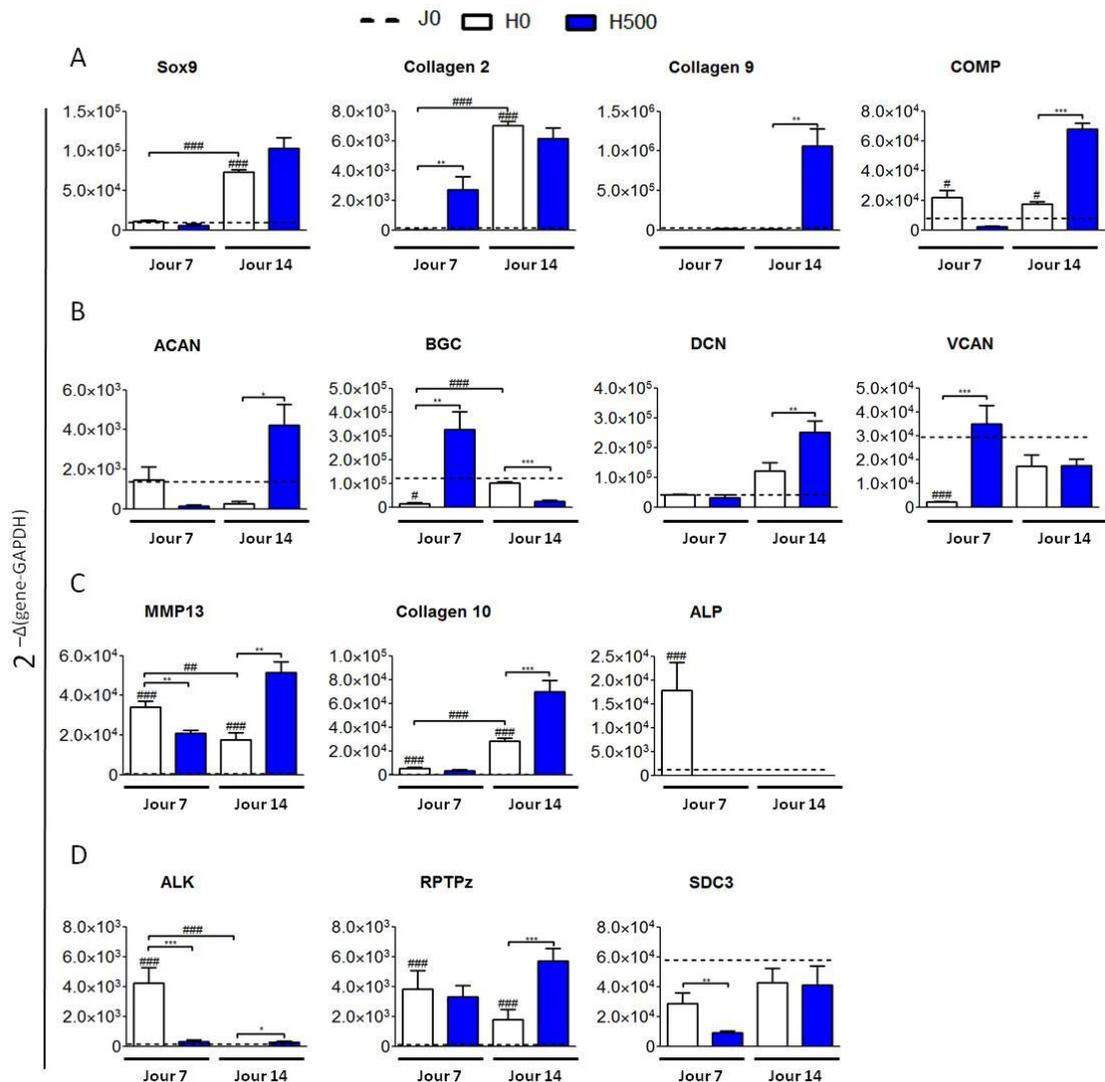


Figure 24 Expression des marqueurs de différenciation et des récepteurs de HARP par les CSMh en culture 3D non différenciées, en absence ou en présence de HARP.

Après 7 et 14 jours de culture en 3D en milieu basal supplémenté ou non en HARP (blanc: 0 pg/ml (H0); bleu: 500 pg/ml (H500)), les ARN de CSMh de trois patients sont extraits. Une analyse est effectuée, par RT-quantitative PCR sur les ARN totaux, de l'expression des gènes codant pour (A) marqueurs de différenciation chondrogénique Sox9 (SRY-box 9), collagène 2, collagène 9 et COMP (cartilage oligomeric matrix protein), (B) protéoglycannes aggrégante (ACAN), biglycane (BGC), décorine (DCN) et versican (VCAN), (C) marqueurs de différenciation hypertrophique "matrix metalloprotease 13" (MMP13), collagène 10 et phosphatase alcaline (ALP), (D) récepteurs de HARP "Anaplastic lymphoma kinase" (ALK), "receptor protein tyrosin phosphatase type z" (RPTPz). Le niveau d'expression des gènes au jour 0 avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type des 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-\Delta(\text{gène-GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions sans HARP (#: p < 0.05; ##: p < 0.01; ###: p < 0.001) et entre les valeurs du même jour (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

La culture en 3D, en absence de HARP, est associée à une induction de l'expression de COMP dès le 7^e jour et de Sox9 et du collagène 2 au 14^e jour, tandis que l'expression du collagène 9

n'est pas modifiée (Figure 24 A). L'expression d'ACAN et de DCN n'est pas modifiée par la culture en 3D, tandis que celle de BGC et de VCAN est inhibée au 7^e jour de culture et retrouve son état de base au 14^e jour (Figure 24 B). Les expressions des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire sont fortement induites par la culture en 3D, et ce dès le 7^e jour de culture (Figure 24 C). La culture en 3D potentialise l'expression de ALK et de RPTPz au 7^e jour, tandis que l'expression de SDC3 n'est pas significativement modifiée (Figure 24 D).

Le traitement par HARP des CSMh cultivées en 3D est associé à une augmentation de l'expression du collagène 2 au 7^e jour et du collagène 9 et de COMP au 14^e jour (Figure 24 A). HARP induit l'expression de BGC et VCAN dès le 7^e jour de culture et d'ACAN et DCN au 14^e jour (Figure 24 B). Des réductions de l'expression de la MMP13 au 7^e jour et de l'ALP au 7^e et 14^e jour sont également observées. HARP potentialise l'expression de la MMP13 et de coll10 au 14^e jour (Figure 24 C). HARP réduit significativement l'expression ALK dès le 7^e jour, cette expression n'est pas modifiée au 14^e jour. HARP potentialise l'expression de RPTPz au 14^e jour. Aucune différence significative de la modulation de l'expression du SDC3 n'est observée (Figure 24 D).

La culture en 3D des CSMh induit l'expression des marqueurs de différenciations chondrocytaires précoces, et hypertrophiques tardifs. On observe cependant que les expressions des PG ne sont pas modifiées par rapport au J0. La culture en 3D est la seule à potentialiser l'expression des récepteurs de HARP, c'est également la seule condition où des effets de HARP sont observés.

4 Discussion

Hormis quelques études montrant un léger effet potentialisateur de HARP sur l'ostéoinduction des progéniteurs mésenchymateux réalisés par le groupe du Pr Oreffo (Tare et al., 2002a; Yang et al., 2003)(ces résultats sont plus amplement décrits dans le chapitre décrivant le rôle de HARP dans le système ostéoarticulaire), il n'existe que peu de données sur des effets de HARP sur les autres propriétés de ces cellules. La première partie de mon travail de thèse a donc consisté à évaluer les effets de HARP sur la différenciation des CSMh.

4.1 HARP et la chondrogénèse des CSMh

La présence de HARP dans les esquisses cartilagineuses des membres chez le rat (Vanderwinden et al., 1992), le poulet (Dreyfus et al., 1998b) et la souris (Petersen and Rafii, 2001) suggère son implication dans le développement ostéoarticulaire. Des études sur des chondrocytes articulaires en culture montrent que l'addition de HARP à leur milieu de culture induit la production de GAG et de collagène 2 (Tapp et al., 1999). Nos travaux montrent pour la première fois les effets potentialisateurs de HARP sur différentes propriétés des CSMh dont la chondrogénèse. En effet, l'association de HARP à un milieu chondroinducteur potentialise l'expression des marqueurs de la différenciation chondrocytaire, mais également celle des cores protéiques des PG, qui constituent avec leurs chaînes de GAGs, les éléments les plus importants de la matrice cartilagineuse. Ces résultats sont confortés par l'observation que le traitement par HARP à lui seul, sur des cellules en 3D, en milieu de prolifération contrôlé, sans autres facteurs inducteurs de chondrogénèse, conduit à l'induction de l'expression des collagènes 2 et 9 ainsi que de COMP.

Durant la croissance osseuse endochondrale, les chondrocytes de la zone hypertrophique subissent une différenciation connue sous le nom d'hypertrophie chondrocytaire (pour revue (Olsen, Reginato, and Wang, 2000)). Ce phénomène est également retrouvé dans le callus lors de la régénération osseuse. Il a été montré que HARP était exprimé au niveau protéique comme au niveau génique dans ces zones (Dreyfus et al., 1998b; Petersen and Rafii, 2001; Petersen et al., 2004) sans que son rôle n'ait été clarifié. Le fait que HARP ait des propriétés angiogéniques (Christman et al., 2005; Laaroubi et al., 1994; Perez-Pinera, Berenson, and Deuel, 2008; Polykratis et al., 2005; Souttou, Raulais, and Vigny, 2001) a permis d'émettre l'hypothèse que HARP pourrait participer à l'invasion vasculaire observée dans les zones chondrocytaires hypertrophiques (Adams, Cohen, and Lasso, 2007; Doblare and Garcia, 2003; Olsen, Reginato, and Wang, 2000; Schindeler et al., 2008). Nos données indiquent pour la première fois que HARP pourrait également avoir un rôle direct dans l'induction de l'hypertrophie chondrocytaire. En effet, nous avons montré que HARP induit l'expression de marqueurs de l'hypertrophie tels que la MMP13, le collagène 10 et l'ALP, mais

également l'accumulation de collagène 10 et de calcium dans la MEC des CSMh chondroinduites. Un phénotype similaire a été retrouvé lors de la culture des culots cellulaire, en milieu basique en ce qui concerne la MMP13 et le collagène 10. Ces résultats suggèrent que HARP pourrait avoir un rôle important dans le passage de l'état de chondrocyte à celui de chondrocyte hypertrophique en plus de ses rôles présumés sur l'angiogénèse ou l'ostéoinduction durant la formation osseuse endochondrale.

4.2 La réponse à HARP en fonction de l'organisation cellulaire

La réponse des CSMh au traitement par HARP semble être reliée aux interactions des cellules entre elles durant la culture. En effet, nos résultats montrent que HARP n'a pas d'effet sur l'expression des marqueurs chondrocytaires lorsque les CSMh sont cultivées en 2D. En revanche, les CSMh cultivées en 3D en présence de HARP montrent une forte expression des collagènes 2 et 9 ainsi que de COMP. L'expression des PG est également potentialisée par HARP lors de la culture en 3D, alors que ce n'est pas le cas des cellules en 2D. Des effets de l'organisation cellulaire sur la réponse à la BMP6 ont également été observés sur la différenciation (Kemmis et al., 2010). Ces travaux montrent que la BMP6 induit l'expression de gènes ostéoblastiques uniquement lorsque des CSM murines issues du tissu adipeux (ADSC) sont cultivées en 2D, mais pas lorsque ces cellules sont cultivées en 3D. Inversement, une augmentation de l'expression de gènes chondrocytaires (Sox9 et ACAN) est observée lorsque les cellules sont cultivées en 3D en présence de BMP6

Durant la formation des ébauches cartilagineuses, les progéniteurs mésenchymateux subissent une étape de condensation avant de se différencier en chondrocyte (pour revue (Bielby, Jones, and McGonagle, 2007)). De plus, la culture des cellules en 3D induit une inhibition de la prolifération (Kemmis et al., 2010). Ce type de culture pourrait mimer les premières étapes de la mise en place des ébauches osseuse et ainsi permettre une étape de prédifférenciation des CSMh. Le fait que HARP n'ait pas d'effet sur les CSMh cultivées en 2D au contraire de celles cultivées en 3D suggère que HARP agirait sur les CSM une fois qu'elles sont prédifférenciées.

4.3 Les récepteurs de HARP et la différenciation

L'analyse des récepteurs de HARP dans les CSMh indique qu'elles expriment ALK, RPTPz et le SDC3. Cependant, le niveau d'expression du SDC3 est bien plus élevé que ceux des 2 autres récepteurs. En absence de HARP, la différenciation chondrocytaire des CSMh est associée à une induction de l'expression de RPTPz et du SDC3, tandis que ALK reste très faiblement exprimé.

De précédentes expériences ont suggéré un rôle important du SDC3 au cours de la différenciation chondrocytaire, puisqu'il a été montré que l'inactivation de ce protéoglycane par des anticorps durant la différenciation de cellules mésenchymateuses de poulet inhibait leur différenciation

chondrogénique (Seghatoleslami and Kosher, 1996). Le traitement par HARP des cellules durant la chondroinduction induit une augmentation de l'expression du SDC3. Ces données suggèrent que les effets de HARP pourraient passer en partie par l'activation des voies de signalisation intracellulaire en aval du SDC3.

Nos résultats montrent également pour la 1^e fois que la différenciation chondrocytaire est associée avec une forte induction de l'expression de RPTPz. Bien que RPTPz puisse activer un grand nombre de voies de signalisation intracellulaire, il n'a jusqu'à maintenant jamais été associé avec la chondrogénèse. Parmi ces voies de signalisation, la voie β -caténine est impliquée dans la chondrogénèse (Chen et al., 2008; Meng et al., 2000). En effet, dans des souris dont l'expression de la β -caténine a été spécifiquement inactivée dans les chondrocytes, on observe que ceux-ci présentent des défauts de différenciation et de prolifération, amenant à un ralentissement de la croissance de ces animaux par rapport aux souris sauvages. Une forte augmentation de la présence de RPTPz à la surface des CSMh en différenciation pourrait donc être associée à une déphosphorylation de la β -caténine qui serait ainsi activée. Un tel rôle de RPTPz est conforté par nos observations durant la culture en 3D en milieu basal, en effet, l'induction de RPTPz est concomitante à l'expression des collagènes 2, 9 et de COMP et des marqueurs de l'hypertrophie MMP13 et du collagène 10.

Enfin, nous avons également observé une induction spécifique d'ALK par le traitement à la dose de 500 pg/ml dès le 7^e jour, associée à l'induction de l'expression des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire au 14^e jour. La voie Pi3k/Akt, une des cibles intracellulaires de ALK, semble être impliquée dans l'hypertrophie chondrocytaire. En effet, une étude des souris inactivées pour Akt montre que ces animaux souffrent de nanisme. Alors que leurs plaques de croissance présentent une morphologie normale, leurs chondrocytes hypertrophiques présentent une défaillance à minéraliser leur matrice (Fukai et al., 2010). On peut donc émettre l'hypothèse que l'induction de l'hypertrophie par HARP est due en partie à l'activation du récepteur ALK.

En revanche, l'expression de ALK et de l'ALP ont été inhibées durant le traitement avec HARP durant la culture en 3D en milieu basal. Ces données suggèrent que ALK pourrait être impliqué dans la minéralisation de la matrice via l'induction de l'ALP et que l'expression des autres marqueurs de l'hypertrophie serait régulée par un autre récepteur de HARP.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 2

Potentialisation des propriétés des CSM humaines par
HARP associé à un substitut osseux.

Application dans un modèle d'ostéof ormation ectopique
murin et orthotopique chez le rat

- **Article 2**

“Pleiotrophin associated to a porous biphasic ceramic scaffold modulates human mesenchymal stromal cells differentiation and induces endochondral bone regeneration”

Thibault Boudierlique, Jean Christophe Fricain, Laura Coquelin, Guilhem Frescaline, Julie Léotot, Hélène Rouard, José Courty, Nathalie Chevallier and Patricia Albanese

Article en préparation

Running title: Pleiotrophin induces endochondral bone regeneration

Pleiotrophin associated to a porous biphasic ceramic scaffold modulates human mesenchymal stromal cells differentiation and induces endochondral bone regeneration.

Thibault Boudierlique ^{a,b}, Jean-Christophe Fricain^c, Laura Coquelin ^{b,d}, Guilhem Frescaline ^a, Julie Léotot ^{b,d}, Helene Rouard ^{b,d}, José Courty ^a, Nathalie Chevallier ^{b,d,*,#} and Patricia Albanese ^{a,*}.

^a University Paris EST, CRRET laboratory (EAC CNRS 7149) UPEC, F-94000, Créteil, France.

^b EA3952, Cellular and Tissular Bioengineering Laboratory, Henri Mondor Hospital,

^c Inserm U 1026, Tissue BioEngineering, University Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

^d Cell Therapy Facility, EFS Ile de France, Creteil, France

* These authors contributes equally to this work

Corresponding author: Nathalie Chevallier, Nathalie.chevallier@efs.sante.fr

CHAPITRE 2 Potentialisation des propriétés des CSM humaines par HARP associé à un substitut osseux. Application dans un modèle d'ostéoformation ectopique murin et de régénération osseuse chez le rat

1 Introduction

L'ingénierie tissulaire dans les contextes de régénération osseuse représente une alternative à la greffe osseuse autologue, présentant de forts risques de morbidité et d'effets secondaires associés (pour revue (Carson and Bostrom, 2007)). Dans ce but, des substituts naturels ou synthétiques ont été développés pour combler les larges défauts osseux. L'association de cellules ostéoprogénitrices telles que les CSM à ces substituts est devenue une évidence depuis que la preuve de leur efficacité dans ce contexte a été apportée (Petite et al., 2000). Cependant, il est nécessaire de rendre plus efficace le processus de réparation en améliorant d'une part la survie des cellules implantées mais également leur différenciation vers la voie ostéoblastique, permettant une formation osseuse de type intramembranaire, ou vers la voie chondrocytaire, permettant une formation osseuse de type endochondrale.

La co-implantation de facteurs ostéoinducteurs comme les BMPs (Hyun et al., 2005; Liang et al., 2005; Sawyer et al., 2009; Tazaki et al., 2009) ou du lysat plaquettaire (Chevallier et al., 2009; Doucet et al., 2005) semble être une approche prometteuse pour une formation osseuse directe. L'association de protéines angiogéniques comme le VEGF aux facteurs ostéoinducteurs semble d'une part potentialiser l'angiogénèse mais également la formation osseuse en site ectopique (Kanczler et al., 2009; Kempen et al., 2009). L'efficacité de la formation osseuse semble donc être étroitement associée à l'angiogénèse.

Dans ce cadre, HARP semble être un bon candidat dans le contexte de la réparation osseuse. En effet, HARP est étudié depuis de nombreuses années pour son rôle dans l'angiogénèse normale et tumorale (Christman et al., 2005; Laaroubi et al., 1994; Li et al., 2005b; Papadimitriou et al., 2009; Perez-Pinera, Berenson, and Deuel, 2008; Polykratis et al., 2005; Polytarchou et al., 2009; Souttou, Raulais, and Vigny, 2001). De plus, des travaux réalisés en 2003 par Yang et coll. ont démontré que l'association de HARP à des polymères de type PLGA et des CSM prédifférenciées en ostéoblastes permettait une formation osseuse après 6 semaines en position ectopique dans la souris immunodéprimée (Yang et al., 2003).

Les résultats décrits dans l'article 1 montrent pour la première fois les effets potentialisateurs de HARP sur la différenciation chondrogénique des CSMh. Nous avons donc envisagé d'associer HARP à des céramiques calciques poreuses fournies par la société CEREVER. L'hypothèse sous jacente de ce travail est que HARP pourrait permettre d'orienter les CSMh vers un phénotype

chondrogénique et ainsi obtenir une formation osseuse de type endochondral. De plus, les propriétés de chemo-attraction de HARP sur les progéniteurs ostéoblastiques pourrait permettre un recrutement de cellules de l'hôte.

Nous avons donc développé les techniques d'immobilisation et de dosage de HARP sur des céramiques biphasés composés de 65% d'hydroxyapatite et 35% de phosphate tricalcique (TCP35). D'après les compositions de biomatériaux, l'immobilisation de HARP semble se faire principalement par des interactions ioniques. Nous avons tout d'abord évalué les effets des céramiques sur la différenciation des CSMh par RT-PCR quantitative, puis les effets de HARP associé aux biomatériaux sur les mêmes propriétés. Ces tests in vitro ont montré que les TCP35 possèdent des propriétés différenciatrices ostéoblastiques et chondrogéniques intéressantes. De plus, ils potentialisent l'expression génique des protéines angiogéniques telles que l'angiopoïétine 1 et le VEGF.

Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité des TCP35 associés à HARP et aux CSMh dans un modèle d'ostéoformation in vivo dans un modèle de greffe ectopique. Ces résultats sont présentés à la suite des études in vitro. Nous avons également étudié les propriétés de ces organoïdes dans un modèle de réparation osseuse du condyle fémoral chez le rat. Ces résultats indiquent que HARP permettrait la formation d'une matrice cartilagineuse et osseuse dans l'implant et ainsi une réparation osseuse de type endochondral.

Ces résultats font l'objet de l'article 2 présenté ci-après dans une version préliminaire.

2 Résultats

2.1 Article

Running title: Pleiotrophin induces endochondral bone regeneration

Pleiotrophin associated to a porous biphasic ceramic scaffold modulates human mesenchymal stromal cells differentiation and induces endochondral bone regeneration.

Thibault Boudierlique ^{a,b}, Jean-Christophe Fricain^c, Laura Coquelin ^{b,d}, Guilhem Frescaline ^a, Julie Léotot ^{b,d}, Helene Rouard ^{b,d}, José Courty ^a, Nathalie Chevallier ^{b,d,*,#} and Patricia Albanese ^{a,*}.

^a University Paris EST, CRRET laboratory (EAC CNRS 7149) UPEC, F-94000, Créteil, France.

^b EA3952, Cellular and Tissular Bioengineering Laboratory, Henri Mondor Hospital,

^c Inserm U 1026, Tissue BioEngineering, University Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

^d Cell Therapy Facility, EFS Ile de France, Creteil, France

* These authors contributes equally to this work

Corresponding author: Nathalie Chevallier, Nathalie.chevallier@efs.sante.fr

Abstract

Despite progresses in bone regeneration field, there is still few options available to replace autologous bone grafts. Research is now focused on tissue engineering, using growth factors involved in physiological bone repair such as BMPs and osteoprogenitors such as mesenchymal stromal cells (MSC). Among growth factors involved in bone repair, pleiotrophin (PTN) is a 136 amino acid growth factor expressed in growth plate matrices during bone development and also overexpressed in the callus during bone healing. Moreover, we previously demonstrate that PTN induces hypertrophic differentiation of chondroinduced MSC. As endochondral bone regeneration involved hypertrophic chondrocyte, we hypothesize that PTN association to scaffolds (TCP35/PTN) may induced endochondral bone regeneration. The aim of this study was to evaluate osteoformation ability of constructs associating biphasic scaffolds and PTN *in vivo*. PTN potentiates MSC chemoattraction and colonization of the scaffold. Moreover, the expression of chondrogenic markers by hMSC was enhanced by TCP35/PTN constructs. In an *in vivo* ectopic model of osteoformation, TCP35/PTN constructs associated or not with MSC did not induce bone nor cartilage formation. However, in an orthotopic model of bone defect, whereas scaffolds alone had no effect on bone regeneration, TCP35/PTN constructs clearly induced an endochondral bone formation. These data indicate that the association of PTN to scaffold is of major interest in bone regeneration field by allowing host cells recruitment and promoting endochondral bone regeneration.

Introduction

In the context of bone regeneration, tissue engineering is an alternative to autologous bone graft which is often associated to a high risk of morbidity and side effects [1]. To avoid these medical complications, natural or synthetic biodegradable substitutes are currently developed to fill large bone defects. Despite their osteoinductive and osteoconductive properties, it became evident that their efficiency are clearly improved by combination with osteoprogenitors cells such as mesenchymal stromal cells (MSC) [2, 3]. These cellular therapeutic products will provide the important cellular part for bone regeneration.

However, these engineering strategies still require elements of the extracellular matrix, such as growth factors, to promote cell survival or cell differentiation toward the osteoblastic pathway, allowing intramembranous bone formation, or toward chondrogenesis, allowing endochondral bone formation [4]. Association of osteoinductive factors such as BMPs is a promising approach for direct bone formation since it was demonstrated that BMPs, when associated to scaffolds, are able to induce bone formation even when they were grafted in muscle[5, 6]. The combination of angiogenic proteins such as VEGF to BMPs was also assessed to optimize vascularization of the scaffold and survival of implanted cells. This association stimulates bone formation in ectopic site through potentiation of osteoinductive factors on one hand but also angiogenesis on other hand [7, 8]. Then, bone formation appears to be closely related to efficient angiogenesis.

Pleiotrophin (PTN) is a 136 amino acid growth factor that was first isolated from brain and bone matrices in which its post-natal expression is predominantly restricted [9-11], whereas being widely expressed in many tissues during fetal development [12, 13]. PTN, also known as heparin affinity regulatory peptide (HARP), has three known receptors : anaplastic lymphoma kinase (ALK) which is defined as a high affinity receptor [14], the heparan sulfate proteoglycan syndecan 3 (SDC3) and the chondroitin sulfate proteoglycan protein tyrosine phosphatase receptor type z (PTPRz) are both defined as low affinity receptors [15, 16].

Initially, PTN has been implicated in many biological processes such as neurite outgrowth during brain development [17] and endothelial cell properties in normal and pathological angiogenesis (for review see [18]). Indeed, plasmid-induced expression of PTN in an ischemic myocardium led to the formation of a new vasculature that connects to the preexisting vascular system [19].

Numerous data suggest that PTN is involved in bone and cartilage development and regeneration processes. PTN expression is localized around hypertrophic chondrocytes and osteoprogenitors in growth plate matrices during bone development [20-22]. In vitro studies showed that PTN enhances chondrogenesis [23] and induces migration as well as differentiation of bone marrow derived osteoprogenitors [21, 24, 25]. Moreover we recently demonstrated that PTN treatment is clearly able to induce hypertrophy during chondrogenic differentiation of human MSC [26]. PTN overexpression in transgenic mice induces a high bone mineral content [27], but relevance of its inactivation effect on bone physiology still remain controversial: PTN deficient mice do not present specific bone phenotype

on skeletal morphology [28] but a growth retardation of the weight-bearing bones was observed, with an osteopenic phenotype that develops in adult mice [29]. Finally, PTN is expressed in the callus during bone healing in rat [30], and human patients with fracture union showed higher seric levels of PTN than patients with delayed union [31].

According to these pleiotrophic effects on migration, osteoformation, chondrogenesis and angiogenesis we suggest that PTN could optimize tissue engineering strategies of bone repair. We then associated PTN to a porous biphasic calcium phosphate scaffold and human MSC, and test its ability to potentiate human MSC migration and differentiation properties in vitro. We then analyze if this new tissue engineering strategy is able to stimulate bone formation, through intramembraneous or endochondral bone formation pathways.

Materials and methods

Materials

PTN was produced as previously described [32] and then submitted to an anti endotoxin treatment before use on cells. Scaffolds made of hydroxyapatite (65%) - beta tricalcium phosphate (35%) (TCP35) presenting an average porosity of 65+/-5% (60+/-5% macroporosity and 40+/-5% microporosity) and a specific surface area of 0,8 m²/g were kindly provided by Ceraver (Roissy, France).

Human mesenchymal stromal cells isolation

Human bone marrow (3 to 5 ml volume) was obtained from iliac crest marrow aspirates of patients undergoing standard bone marrow transplantation procedures (Henri Mondor Hospital, AP-HP Créteil, France) after receiving their informed consent. Bone marrow aspirates from 6 healthy donors (24-42 years old, mean age: 32 years) were used. Nucleated cells from fresh marrow were seeded at 2.10⁵/cm² in 225 cm² flasks. Cell sample was used for the confirmation of hMSC characteristics as previously described [33]. Briefly, all the hMSC are positive for CD90, CD105, CD73, negative for CD34 and CD45 and able to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages (data not shown). hMSCs were expanded in α -modified Eagle's medium (α MEM) (Life technologies, Cergy Pontoise, France) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (StemCell Technologies, Grenoble, France) supplemented with 0,5% Cifloxacin (Bayer Pharma, Puteaux, France). Culture medium was changed twice every week and cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. When cells reached 80-90% confluence (passage 0, P0), they were detached using trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Austria) and then replated at 1000 cells/cm² (passage 1, P1).

Cell proliferation assay

Cells were seeded at 1000c/cm² in 25cm² flasks in triplicate for 6 patients. After 5 days of culture in aMEM-10% FBS containing increasing doses of PTN, cells were detached using trypsin and counted. Proliferation rate of each condition is expressed as fold change of the control condition.-

Scaffold functionalization and colonization

TCP35 were incubated overnight at 37°C in aMEM 0,5% Cifloxacin containing PTN (0 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml). Then scaffolds were washed 2 times in aMEM 0,5% Cifloxacin to eliminate uncoated PTN. Coated or uncoated TCP35 were individually loaded with 3.10^5 hMSCs in 20 µL of aMEM 10% SVF into 96 well culture plates for 3 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Constructs were then directly implanted in animals or cultured in 1 ml of aMEM 10%SVF into 24 well culture plates for 7 days for RNA analysis.

PTN quantification on scaffolds

A modified ELISA test was used in order to evaluate PTN coating efficiency and stability just after coating or after 3 and 6 days. Briefly, scaffolds were washed three times with PBS-0.05% Tween. Saturation of unspecific site was done with PBS-3% BSA. After washing, primary antibody against PTN (goat anti human PTN, R&D System) was applied for 1 hour at 37 °C. Then, after washing steps, secondary antibody (HRP conjugate rabbit anti-goat, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) was applied for 1 hour at 37°C. Then TMB substrate kit (Thermo Scientific) was applied and reaction was stopped with addition of an equal volume of H₂SO₄ (2N). 100 µl of reaction medium were then read with TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC). Non coated scaffolds served as blank. Values are reported to a standard curve done in parallel.

Scaffold cell loading measurement

Cell-seeding efficiency was performed using an indirect method. After 3 h of contact with 3.10^5 hMSCs, bone substitute was removed and cells that did not attach to the scaffold were quantified by DNA picogreen® labeling. Then, cells that adhered to the bone substitute were deduced by subtraction. Briefly, cells that remained floating in the medium and that adhered to the bottom of the plate were lysed with Tris (10mM, pH8), EDTA (1mM), 0.1% Triton X100 and 0.2 mg/mL of proteinase K. Samples were incubated overnight at 52 °C and then frozen-thawed three times, vortexed, and sonicated for 10 min. In parallel, a standard curve with cell range from 0 to 3.10^5 hMSCs was carried out simultaneously. DNA samples were labeled with picogreen® (Invitrogen) that only bound double-strand DNA. After 10 min of incubation at room temperature in the dark, the fluorescence was measured at 520nm with TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan). Standard curve was then used to quantify cells.

hMSC migration assay

Migration assays were performed in 24-well micro-chemotaxis chambers (Corning Costar, USA) using polycarbonate membranes with 8-µm pores as described previously [34]. Briefly, $2,5.10^5$ P2 hMSC were starved in migration medium (MM) composed of RPMI 1640 (Invitrogen), 0.25% BSA (Fraction V, Sigma-Aldrich) for 24h, then they were seeded in the upper part of a Boyden chamber. The bottom part was filled with 0.6 mL of MM with soluble PTN (0 pg/ml, 50 pg/ml or 500 pg/ml) or with a PTN coated TCP35 scaffold (0 pg/cm², 4 pg/cm², 10 pg/cm²). Plates were incubated for 12 h at 37 °C. Then cells from the upper chamber and scaffolds in the bottom chamber were removed and the number of migrating cells was evaluated by a MTS assay (Promega). MTS reagent was added to the

bottom chamber, after 4 hours at 37 °C in 5% CO₂, 100µl of medium was collected and absorbance was measured at 490 nm with TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan). Test was performed two times for each of the 6 patients. Values are reported as a fold change of the scaffold without PTN.

RT-qPCR

Total RNA was isolated from hMSC cultured on scaffolds on day 0 and day 7 using an RNeasy mini-kit as described by the manufacturer (Qiagen). Dnase (Qiagen)–treated RNA were reverse transcribed with RT superscript III (Invitrogen), cDNA real-time amplification was performed with FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Meylan, France) following manufacturer procedures and monitored with the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (PerkinElmer/Applied Biosystem, Rotkreuz, Switzerland). Primers (Table 1) were designed by Primer3output software [35] and obtained by Eurofins MWG (Huntsville, Germany). Primers efficiency was checked to be between 95% and 100%. Amounts of cDNAs of interest were normalized to GAPDH ($\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{\text{GAPDH}}$) and to day 0. Results are reported as relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Animal model and implantation procedure

Just after colonization by hMSC, scaffolds were subcutaneously implanted in the back of immunodeficient mice. Eight (7 weeks-old) SCID mice purchased from Charles River laboratories (Chatillon, France) were used in this experiment in accordance with French law on animal experimentation. Isoflurane was used for anesthesia. Six subcutaneous dorsal pockets (0.5 cm incisions) were prepared per mouse. Two different conditions in triplicate were tested per mice. Five conditions were evaluated : TCP35 alone as negative control (TCP35free), TCP colonized with hMSC and then cultivated under osteogenic medium supplemented with 50 mM L-ascorbic acid-2-phosphate and 10 mM β-glycerophosphate (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) during 7 days before implantation, as positive control (T+), TCP35 coated with PTN at 10 pg/cm² without cells (TCP35/PTN), TCP35 colonized with hMSC (TCP35/hMSC) or TCP35 coated with PTN at 10 pg/cm² and colonized with hMSC (TCP35/PTN/hMSC). Tests were performed with hMSC from 2 different patients. In each pocket, one TCP35 coated or not with PTN containing or not containing MSC was implanted just after colonization was done and then skin was closed by suture. After 7 weeks, animals were euthanized with an overdose of pentobarbital and specimens were excised and immediately fixed in 70% ethanol for further histological studies.

Just after functionalization with PTN and washing steps, scaffolds were implanted in a bone defect in rat. Twelve (9 weeks old) Wistar rats purchased from Janvier (France) were used in this experiment in accordance with French law on animal experimentation. Rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, Virbac Santé Animale, France) and xylocaine (10 mg/kg, Bayer, Germany). Bone defects were created in both femoral condyles of each rat. Then defects were filled with TCP35 coated with PTN (TCP35/PTN) or not coated (TCP35free), 3 animals per group, 2 scaffolds per animal. After 2 weeks or 2 months, rats were euthanized with an overdose of pentobarbital and condyles were excised and immediately fixed in 10% paraformaldehyde.

Histology

Specimens were decalcified for 3 h (for mice specimens) or for 5 days (for rat condyles) in 6.8% nitric acid (VWR) and then rinsed in tap water before being embedded in paraffin. Sections (3 μ m) were stained with Masson's trichrome and visualized using standard light microscopy.

Statistical analysis

Results were expressed as mean of values \pm standard error mean (SEM) from six independent patients with at least 2 to 3 values per condition and per patient. Statistical analyses were performed using a one way anova Kruskal-Wallis test (GraphPad Software). Differences between groups with a p-value of ≤ 0.05 were considered to be significant.

Results

PTN induces migration and proliferation of mesenchymal stromal cells

We evaluated the chemoattractive and proliferation properties of PTN on hMSC (Figure 1). PTN at concentrations as low as 50 pg/ml and 500 pg/ml significantly potentiates hMSC migration by 2 fold (Figure 1A). PTN potentiates hMSC proliferation in a dose dependant manner with significant effect at concentration from 100 pg/ml to 10 ng/ml (Figure 1B). These results suggest that PTN in bone regeneration is able to recruit progenitors from surrounding tissues and then induce their proliferation for efficient repair. Then PTN association to scaffolds may be of great interest in bone regeneration.

PTN can be efficiently associated to biphasic scaffolds

We evaluated the efficiency of PTN coating on TCP35. Scaffolds were incubated with increasing quantities of PTN overnight (0, 5, 50 and 500 ng/ml) and represented as pg of PTN incubated per cm² of TCP35. After washing steps, remaining coated PTN was quantified by adapted ELISA protocol compared to standard curve. Coated PTN amount was reported as pg of PTN coated per scaffold surface in cm². Figure 2A indicates that PTN is coated in a dose dependent manner on TCP35 scaffolds. When TCP35 are incubated with 40 pg/cm² dose (50 ng/ml solution), 10% of PTN (4 pg/cm²) were coated on the scaffold. When TCP35 are incubated with 400 pg/cm² dose (50 ng/ml), 2% of PTN (10 pg/cm²) were coated on the scaffold. These coating efficiency percentages indicate a rapid saturation of binding sites. PTN stability on scaffolds was further analyzed during one week in α MEM 0.5% ciprofloxacin. PTN amount dosed at day 0 is stable for 3 days and began to decrease thereafter (Figure 2B).

PTN potentiates hMSC colonization and migration on TCP35 scaffolds.

A challenge for successful tissue repair is to increase the number of cells in the implants to ensure survival of sufficient cell amount. This can be achieved through better cell colonization strategies of the implants *in vitro* before implantation or by increasing the recruitment of progenitor cells *in vivo* by the scaffold. We evaluated the ability of hMSC to migrate through Boyden chambers by putting scaffold, coated or not with 2 different doses of PTN, placed in bottom chambers. We observed that the 4 pg/cm² and the 10 pg/cm² doses of coated PTN were able to significantly induce a 1.5 fold increase of hMSC migration (Figure 3A). These results indicate that PTN is able to potentiate hMSC migration suggesting that PTN is able to induce cell recruitment. We then determined the ability of hMSC to colonize scaffolds functionalized or not with 2 different doses of PTN. In the absence of PTN, cells colonization is not optimum since only 33% of seeded cells are localized in the scaffold. Coating of scaffolds with either 4 pg/cm² or 10 pg/cm² of PTN induces a clear increase of colonization efficiency to 83% and 77% respectively (Figure 3B). Then, PTN significant effect on scaffold colonization by hMSC could be due, not only to its effect on hMSC migration, but also to an additive effect on adhesion.

TCP35 scaffolds modulate genes expression by hMSC during in-vitro culture.

To obtain an efficient bone formation, cells implanted with scaffolds have to remain able to differentiate toward osteoblasts or chondrocytes, to allowing either intramembraneous or endochondral bone formation respectively. So we analyzed expression profiles of osteoblastic, chondrogenic and angiogenic genes by hMSC, during 7 days of culture, on TCP35 (Figure 4). We observed significant increases of osteogenic markers expression such as osteopontin (OP: 1000 fold), bone morphogenic protein-2 (BMP-2: 500 fold), osteocalcin (OC: 40 fold) and bone sialoprotein (BSP: 20 fold) at day 7 as compared to day 0, whereas osteonectin (ON) is not modified (Figure 4A). In these culture conditions on TCP35, expression of collagen 2, a chondrogenic marker was increased by 25 fold, whereas aggrecan (ACAN) expression was not modified between days 0 and 7 (Figure 4B). Finally a 4-fold increase of angiopoietin 1 and VEGF expressions were also observed (Figure 4 C).

PTN coated on scaffold potentiated chondrogenic gene expressions by hMSC.

We therefore evaluated the effect of PTN coating on the phenotype of MSCs cultivated on scaffolds during 7 days. At day 7, the dose of PTN used for coating seems to modulate osteoblastic genes expression. Indeed, when PTN was coated at 4 pg/cm², BSP and OC expressions were increased by 7-fold and 4 fold respectively, whereas 10 pg/cm² coating did not modulate BSP expression and induced OC expression by 3.5 fold (Figure 5A).

Concerning chondrogenic genes, whereas 4 pg/cm² dose did not have a significant effect, 10 pg/cm² dose potentiated ACAN (2 folds) and collagen 2 (7 folds) expressions (Figure 5B). Finally PTN coating did not affect the expression of angiogenic factors (Figure 5C).

These data indicate that PTN coating on osteoinductive scaffolds such as TCP35 is able to potentiate chondrogenic differentiation of hMSCs at 10 pg/cm².

PTN associated to scaffolds and hMSCs do not potentiate osteoformation on ectopic site in immunodeficient mouse.

We assessed PTN potential to modulate ectopic bone formation *in vivo*. Five groups of engineered scaffolds were analyzed and compared, for ectopic bone formation, 8 weeks after subcutaneous implantation into nude mice: (1) TCP35free as negative control; (2) TCP35/PTN; (3) TCP35/hMSC (4) TCP35/PTN/hMSC and (5) T+, consisting of TCP35/hMSC cultured under osteoinductive medium during 7 days as positive control. Masson's trichrome staining was used to reveal collagenic matrix organization and bone nodule formation characterized by dense collagenic fibers (Figure 6A). In parallel, semi quantitative evaluation of bone formation was performed (Figure 6B) according to index scale between 0 and 5. Free scaffolds used as negative control present no histological elements of bone formation (0 value for bone formation index). In contrast, numerous dense collagenic deposition characteristic of bone formation were clearly observed in the positive control (3.5 value for bone formation index). When scaffolds were functionalized with PTN alone, results were similar to free scaffolds, suggesting that PTN does not have any effect on endogenous bone formation on ectopic site. When scaffolds were colonized with non induced hMSC a fewer number of bone nodules than positive control were observed (1.5 value for bone formation index). This could be due to intrinsic osteogenic properties of hMSC and/or TCP35 osteoinductive effect on hMSC that we initially showed on gene expression *in vitro* (Figure 4). We did not observe any inflammatory reactions in this animal model.

PTN modulates bone repair on orthotopic site in rat.

We assessed PTN potential to modulate orthotopic bone repair in a model of femoral bone defect in rats. Two groups of engineered scaffolds: (1) TCP35free; (2) TCP35/PTN were analyzed for bone regeneration after 2 weeks and 2 months of implantation into the femoral condyle. Masson's trichrome staining was used to reveal collagenic matrix organization (Figure 7). After 2 weeks of implantation, a slight invasion of inflammatory cells is observed between the scaffold and cancellous bone (Figure 7 a,b). TCP35free scaffolds did not show remodeling processes whereas an unidentified tissue inside the scaffold was observed in TCP35/PTN constructs (Figure 7c). Two months after implantation, TCP35free were invaded by a fibrous matrix without specific organization or collagen condensation (Figure 7 d). After 2 months, a newly-formed cartilage tissue appeared in TCP35/PTN constructs, with an organization different to those classically observed in growth plates or in articular cartilage, suggesting an endochondral bone formation process (Figure 7 e,f). Moreover, the presence of new bone formation was visible inside the cartilaginous structure (Figure 7 f). Altogether these data demonstrate that PTN is able to induce endochondral bone formation during regenerative process *in vivo*.

Discussion

Bone tissue engineering is an alternative to autologous bone graft which is associated to a high risk of morbidity and side effects [1]. In this aim, bone substitutes had been developed to fill large bone

defects. However, these scaffolds lack the matrix and cellular components required for efficient bone regeneration. Strategies using BMPs had been tested and are now used in clinical surgery [36]. Despite progresses in prognosis for patients, these applications are restricted to few applications and are still associated with side effects such as osteolysis [37-39], indicating the need of new molecules for bone tissue engineering. Then, the remaining challenge in bone engineering is to generate more physiological repair process. Endochondral bone formation seems to be the more efficient way to attain this purpose according to the different cellular components involved in this process. Indeed, endochondral bone formation goes along with vascular invasion and matrix remodeling [4]. We previously proved that PTN is able to induce hypertrophy in chondroinduced hMSC [26]. We suggest that effects of PTN on hMSC chondrogenic properties could be useful to allow endochondral bone repair *in vivo*. We then decided to evaluate the association of PTN to bone substitutes on bone formation and regeneration.

We demonstrated for the first time that our scaffolds based on hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate are able to adsorb PTN and to maintain this interaction for up to three days. Hydroxyapatite was described for its properties to bind proteins [40]. Coating efficiency of growth factors to bone substitute depends on scaffolds composition. Altogether these data suggest that interactions between PTN and TCP35 are ionic. Even if this stability is short, gene expression analysis suggest that it is sufficient to modulate chondrogenic genes expression of hMSC after 7 days of culture.

Association of osteoprogenitor cells to scaffolds prior to *in vivo* implantation is a critical step to ensure fast and efficient repair [3]. Some studies indicate that association of hMSC to TCP- β based scaffolds allows efficient posterior spinal fusion [41]. Similar results were obtained by associating pure hydroxyapatite based scaffolds with hMSC in therapeutic protocols of large diaphysis defects [2]. Our results indicate that PTN/TCP35 allows an optimization of scaffolds colonization by hMSC *in vitro*. Moreover our data indicated that PTN coated on scaffolds still possesses chemoattractive properties on hMSC. This is of great interest as it could permit to mobilize local endogenous progenitors in addition to the use of exogenous transplanted therapeutic cells.

Numerous studies are performed on the ability of bone substitutes to recruit resident cells and then commit them toward osteoblast or chondroblast phenotype to ensure an efficient bone formation. Our results indicate that TCP35/HA65 biphasic ceramic are able to induce osteogenic, chondrogenic and angiogenic gene expression. These data suggest that TCP35 scaffolds could strengthen bone formation *in vivo* through their ability to potentiate osteogenic differentiation of hMSC. Moreover, their ability to increase angiogenic factors expression by hMSC could improve the survival of implanted cells by facilitating vascular invasion of the implant.

Interestingly, PTN coating to the colonized scaffold clearly induced chondrogenic gene expressions, such as Aggrecan (2 fold) and Collagen 2 (7 fold), but also BSP (2 fold) and OC (3 fold). BSP and OC are principally associated to osteoblast. However, some studies indicate that these proteins are also very late markers of hypertrophy [42, 43]. These results confirm our previous *in vitro* results which

demonstrated that soluble PTN treatment of hMSC is associated to a chondrogenic differentiation of these cells toward a hypertrophic state [26]. We then hypothesized that PTN could optimize bone repair through an endochondral bone formation.

We first tested this hypothesis in an ectopic subcutaneous model in immunodeficient mice. We validated that association of hMSC to TCP35 allows bone formation, probably through osteogenic effects of TCP35 on hMSC and then intramembraneous osteoformation. Addition of PTN to these constructs surprisingly did not potentiate bone formation. These results are in agreement with our *in vitro* data showing no significant effect of PTN on osteoblastic gene expression. Previous data showed that PTN association to PLGA polymers and osteoinduced hMSC were able to induce ectopic bone formation [25]. These discrepancies with our results could be due to the pre-differentiation status of osteoblasts added that are more sensitive to PTN osteogenic effects. Moreover, we show that an osteoinducer treatment of TCP35/hMSC constructs led to bone formation. Altogether these data indicate that osteoinduction of hMSC is necessary to induce bone formation in an ectopic site. Inversely, in our case we used non preinduced hMSC on which treatment with PTN induce primarily chondrogenic differentiation instead of osteoblastic one. This chondrogenic effect of PTN could have induced beginning of endochondral bone formation in our scaffolds. This bone formation type requires osteoblasts recruitment from surrounding tissues [4]. As our scaffolds were grafted between skin and muscle, tissues that do not contain osteoblasts, we hypothesize that such endochondral bone formation process couldn't have gone up to the end in these conditions.

To comfort our hypothesis, our results obtained in rat bone defect model clearly demonstrate for the first time that PTN associated to biphasic substitute is able to stimulate endochondral bone formation, without addition of exogenous therapeutic cells such as hMSC. During endochondral bone formation, the final differentiation step of hypertrophic chondrocytes is characterized by the synthesis of a matrix specific of the hypertrophic zone, just before apoptosis. This matrix is then submitted to vascular invasion followed by chondroclasts mobilization. Finally, these events are followed by the recruitment of osteoblasts from surrounding tissues that will initiate bone formation [4]. In our experiment we clearly validated that PTN induces a formation of a new cartilaginous matrix deposition by chondrocytes inside PTN coated scaffolds. We suggest that PTN chemoattractant properties (our data and [24, 25]) have enabled the recruitment of resident chondroblastic progenitor on orthotopic site. Moreover, PTN may have induced their commitment toward a hypertrophic state as we previously demonstrate that PTN induces hypertrophic commitment of hMSC during chondrogenesis [26].

Whereas numerous data validated that the association of hMSC to biomaterials accelerate bone repair in a sheep model as well as in human diaphysis defect [2, 3], our data clearly indicate that association of PTN alone to calcium phosphate scaffold had similar effect on bone regenerative process. Therefore, it is therefore necessary to assess the capacity of bone repair strategy combining scaffolds, hMSC and PTN on orthotopic site, in order to further improve the bone regenerative properties of our constructs.

Conclusion

In the case of bone defects resistant to conventional treatments, new treatments involve BMP2 associated transplants which allow efficient bone formation. However in some cases, osteolysis of the repaired area was observed [37-39]. Therefore it seems necessary to induce a more physiological process for bone repair to obtain a regenerated bone with the functional characteristics of the pre-existing bone. In this purpose, new strategies involving endochondral bone formation provide an essential parameter, taking into account the presence of hypertrophic chondrocytes which will regulate the repair process. In line with these requirements, and given our original *in vitro* and *in vivo* results, highlighting PTN properties on endochondral bone formation, its association to hMSC and biomaterials could be a very promising and innovative strategy.

Aknowledgement

Authors are gratefull to Pr. Laure Garrigue-Antar and Fabien Chevalier for their critical reading. Boudierlique Thibault doctoral fellowship was supported by the French Ministere de l'Enseignement et de la Recherche.

References

1. Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007 Mar;38 Suppl 1:S33-37.
2. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007 May;13(5):947-955.
3. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000 Sep;18(9):959-963.
4. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
5. Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CX, Woodruff MA, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009 May;30(13):2479-2488.
6. Tazaki J, Murata M, Akazawa T, Yamamoto M, Ito K, Arisue M, et al. BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater Eng* 2009;19(2-3):141-146.
7. Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 2009 Feb;31(6):1242-1250.
8. Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 2009 May;30(14):2816-2825.
9. Courty J, Dauchel MC, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Oct 15;180(1):145-151.
10. Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* 1990 Oct 5;265(28):16721-16724.

11. Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T. Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 November 30, 1990;173(1):246-251.
12. Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* 1995 Jan;121(1):37-51.
13. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol (Berl)* 1992 Sep;186(4):387-406.
14. Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 2002 Sep 27;277(39):35990-35998.
15. Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* 1996 Aug 30;271(35):21446-21452.
16. Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem* 1994 Apr 29;269(17):12999-13004.
17. Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 1989 Oct;8(10):2933-2941.
18. Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008 May;15(3):210-214.
19. Christman KL, Fang Q, Kim AJ, Sievers RE, Fok HH, Candia AF, et al. Pleiotrophin induces formation of functional neovasculature in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jul 15;332(4):1146-1152.
20. Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, Raulais D, Vigny M. HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg. *Int J Dev Biol* 1998 Mar;42(2):189-198.
21. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol* 1998 Nov 16;143(4):1113-1128.
22. Petersen W, Raffi M. Immunolocalization of the angiogenetic factor pleiotrophin (PTN) in the growth plate of mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001 Jul;121(7):414-416.
23. Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, Raulais D, Vigny M. HB-GAM/pleiotrophin but not RIHB/midkine enhances chondrogenesis in micromass culture. *Exp Cell Res* 1998 May 25;241(1):171-180.
24. Tare RS, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI. Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res* 2002 Nov;17(11):2009-2020.
25. Yang X, Tare RS, Partridge KA, Roach HI, Clarke NM, Howdle SM, et al. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res* 2003 Jan;18(1):47-57.
26. Boudierlique T, Henault E, Lebouvier A, Rouard H, Courty J, Albanese P, et al. Pleiotrophin commits human mesenchymal stromal cells toward hypertrophy during chondrogenesis. *Biomaterials*;under review.
27. Tare RS, Oreffo RO, Sato K, Rauvala H, Clarke NM, Roach HI. Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Nov 1;298(3):324-332.
28. Lehmann W, Schinke T, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Gebauer M, Pogoda P, et al. Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone* 2004 Dec;35(6):1247-1255.

29. Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Buki K, Matsusue Y, et al. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone* 2009 May;44(5):785-794.
30. Petersen W, Wildemann B, Pufe T, Raschke M, Schmidmaier G. The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004 Nov;124(9):603-607.
31. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009 Jul;129(7):989-997.
32. Seddon AP, Hulmes JD, Decker MM, Kovessi I, Fairhurst JL, Backer J, et al. Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor. *Protein Expr Purif* 1994 Feb;5(1):14-21.
33. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* 2009 Jan;31(2):270-278.
34. Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J, Albanese P. Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 2011 Mar;8(2):180-192.
35. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-386.
36. Obert L, Couesmes, A. , Lepage, D. , Pauchot, J. , Garbuio, P., Tropet Y. Consolidation osseuse et pseudarthrose des os longs : l'apport des BMP. e-memoires de l'Académie Nationale de Chirurgie 2007;6(2):24-30.
37. Balseiro S, Nottmeier EW. Vertebral osteolysis originating from subchondral cyst end plate defects in transforaminal lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Report of two cases. *Spine J* 2010 Jul;10(7):e6-e10.
38. Lewandrowski KU, Nanson C, Calderon R. Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases. *Spine J* 2007 Sep-Oct;7(5):609-614.
39. Owens K, Glassman SD, Howard JM, Djurasovic M, Witten JL, Carreon LY. Perioperative complications with rhBMP-2 in transforaminal lumbar interbody fusion. *Eur Spine J* 2011 Apr;20(4):612-617.
40. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001 Nov;57(2):258-267.
41. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 2008 Oct;29(29):3973-3982.
42. Barnes GL, Della Torre T, Sommer B, Young MF, Gerstenfeld LC. Transcriptional regulation restricting bone sialoprotein gene expression to both hypertrophic chondrocytes and osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002;87(4):458-469.
43. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int* 2000 Sep;67(3):230-240.

Gene	Primers sequence	Accession number	Product size
Housekeeping gene			
GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (GAPDH)	forward 5'-TGC CTG ATG AGA CAG AGG TG-3' reverse 5'-TCC ACC TGG ACA GGA TTA GC-3'	NM_002046.3	97
Osteoblastic markers			
Bone SialoProtein (BSP)	forward 5'-AAA ACG AAG AAA GCG AAG CA-3' reverse 5'-TTT CTG CCT CTG TGC TGT TG-3'	NM_004967.3	84
Bone MorphoGenetic Protein 2 (BMP2)	forward 5'-TGT GTC CCG ACA GAA CTC AG-3' reverse 5'-ACA ACC CTC CAC AAC CAT GT-3'	NM_001200.2	99
OsteoCalcin (OC)	forward 5'-GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT-3' reverse 5'-TCC CAG CCA TTG ATA CAG GT-3'	NM_199173.4	95
OsteoNectin (ON)	forward 5'-TGC CTG ATG AGA CAG AGG TG-3' reverse 5'-TCC ACC TGG ACA GGA TTA GC-3'	NM_003118.2	82
OsteoPontin (OP)	forward 5'-CGC AGA CCT GAC ATC CAG TA-3' reverse 5'-ATG GCC TTG TAT GCA CCA TT-3'	NM_001040058.1	92
Chondroblastic markers			
Collagen 2A1 (col2)	forward 5'-TGG AAA ACC TGG AAA AGC TG-3' reverse 5'-TGT GAC CTT TGA CAC CAG GA-3'	NM_001844.4	98
Aggrecan (ACAN)	forward 5'-AGG AGT CCC TGA CCT GGT TT-3' reverse 5'-TTC AAC CAA ACT GGT GTC CA-3'	NM_001135.3	85
Angiogenic growth factors			
Angiopoietin 1 (Ang1)	forward 5'-GGA CAG CAG GAA AAC AGA GC-3' reverse 5'-GGG CAC ATT TGC ACA TAC AG-3'	NM_001199859.1	93
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	forward 5'-AGG CCA GCA CAT AGG AGA GA-3' reverse 5'-CCT CGG CTT GTC ACA TTT TT-3'	NM_001171628.1	100

Table1. Primer sequences

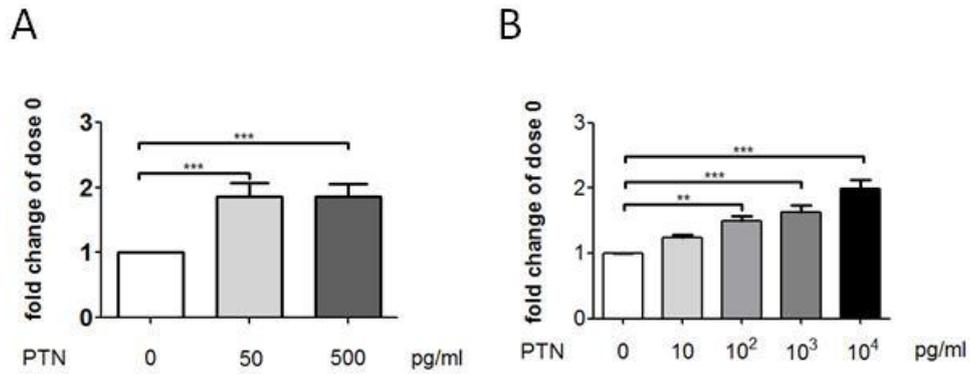


Figure 1. Effect of PTN on migration and proliferation of hMSC. (A): After a 24h starvation hMSC were trypsinized and seeded at $2 \cdot 10^5$ c/insert in the presence of different doses of PTN (0 pg/ml white boxes, 50 pg/ml: grey boxes, 500 pg/ml: black boxes) in the lower chamber. After 12 hours of incubation, migrating cells were quantified by a MTS test. (B): hMSC were seeded at 1000c/cm² and treated with the indicated concentration of PTN in 10% FCS supplemented medium. After 5 days, cell number was determined by count after trypsination. Proliferation rates of each condition is expressed as fold change of the control condition. Each test was performed in triplicate on hMSC from 6 patients. Values were normalized with the 0 dose for each patient and analyzed by a One way anova Kruskal Wallis test (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

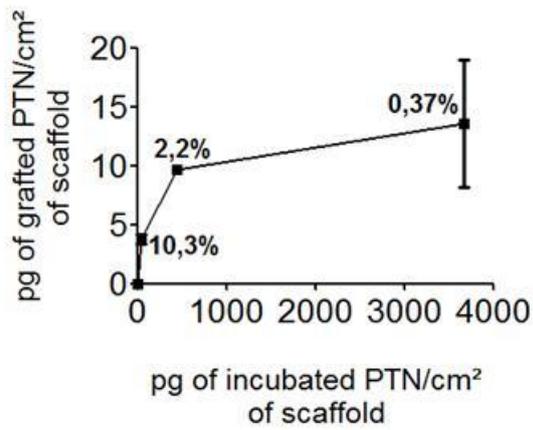
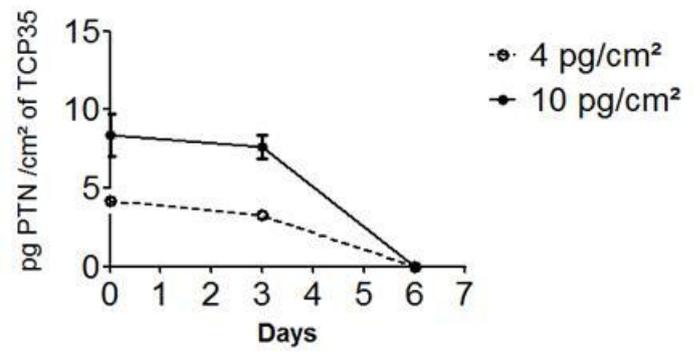
A**B**

Figure 2. PTN dosage on TCP35. TCP35 were incubated with increasing doses of PTN (pg of incubated PTN/cm²) during 12 hours at 37°C. Coated PTN (pg of coated PTN/cm²) was dosed by an ELISA test directly on scaffold. **(A)** Dosage of PTN at day 0, percentages represent efficiency of coating for each dose. **(B)** Stability of PTN on TCP35 was evaluated at day 0, 3 and 6. Each test was performed 5 times.

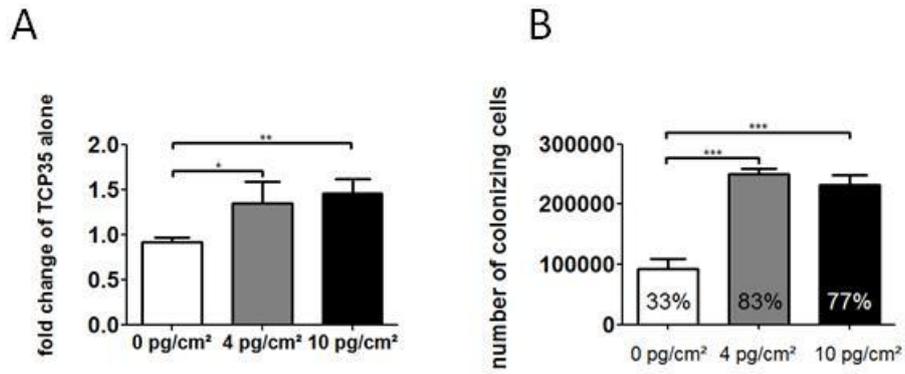


Figure 3. Effect of PTN coated TCP35 on hMSC migration and colonization properties. **(A)** $2,5 \cdot 10^5$ cells were seeded on the upper side of a boyden chamber. Coated TCP35 (0 pg/cm²: white boxes; 4 pg/cm²: grey boxes; 10 pg/cm²: black boxes) were put in the bottom of the chamber. After 12 hours of incubation, migrating cells were quantified by a MTS test. Values are normalized with the dose 0 for each patient. **(B)** $3 \cdot 10^5$ cells were seeded on PTN coated scaffolds (0 pg/cm²: white boxes; 4 pg/cm²: grey boxes; 10 pg/cm²: black boxes) after an incubation of 3 hours, remaining cells were quantified by a picogreen test allowing extrapolation of the colonizing cells, numbers represent the percentage of colonizing cells. Each test was performed in triplicate on hMSC from 6 patients. Values were analyzed by a One way anova Kruskal-Wallis test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0.001$).

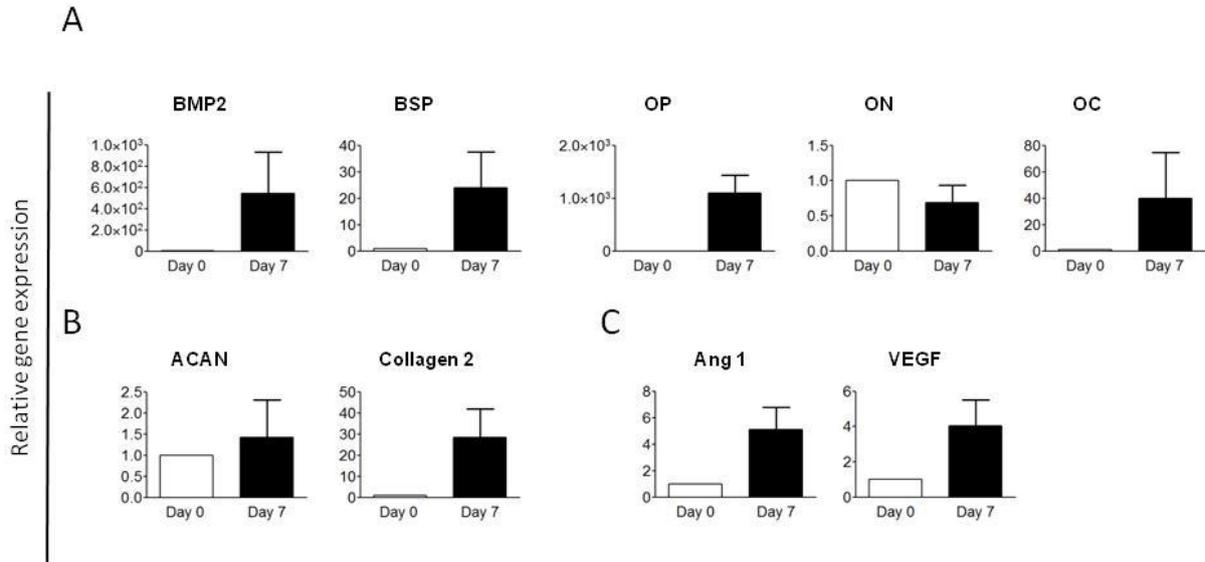


Figure 4. Effect of TCP35 on hMSC gene expression profile. Scaffolds were seeded with 3.10^5 cells. After 7 days culture RNA were purified, and analyzed for **(A)** osteoblastic differentiation markers: BMP2 (bone morphogenetic protein 2), BSP (bone sialoprotein), OP (osteopontin), ON (osteonectin), OC (osteocalcin), **(B)** chondrogenic differentiation markers: ACAN (aggrecan) and collagen 2 and **(C)** angiogenic gene : Ang1 (angiopoietin 1), VEGF (vascular endothelial growth factor) expressions. Tests were performed on hMSC from 6 patients. Expression levels are reported to GAPDH, and normalized with the day 0 value.

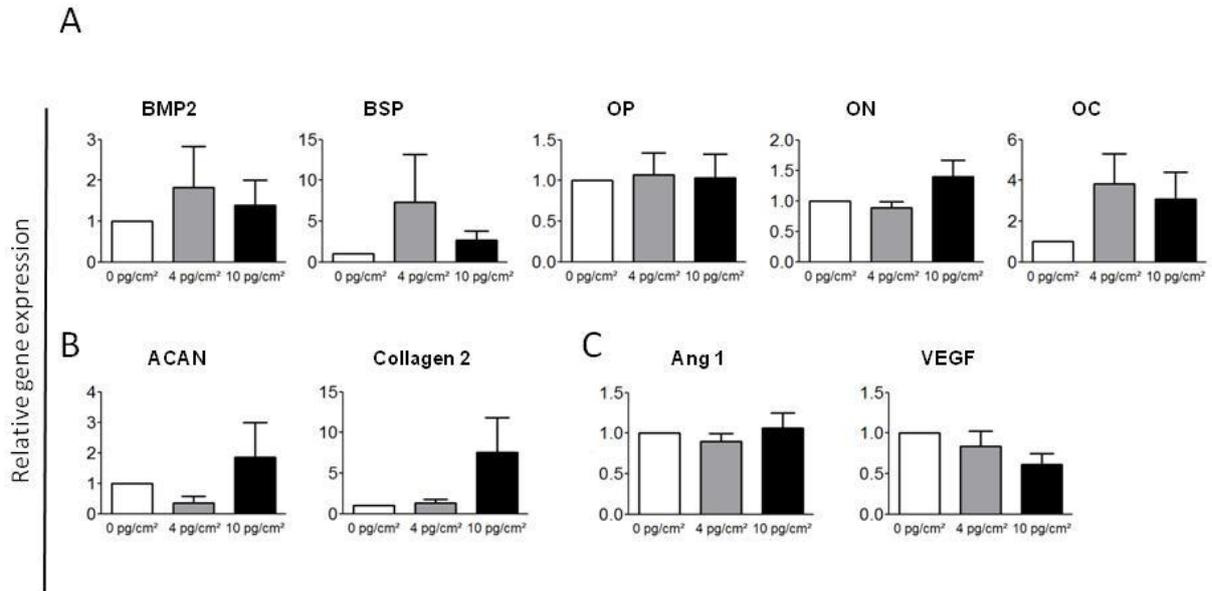
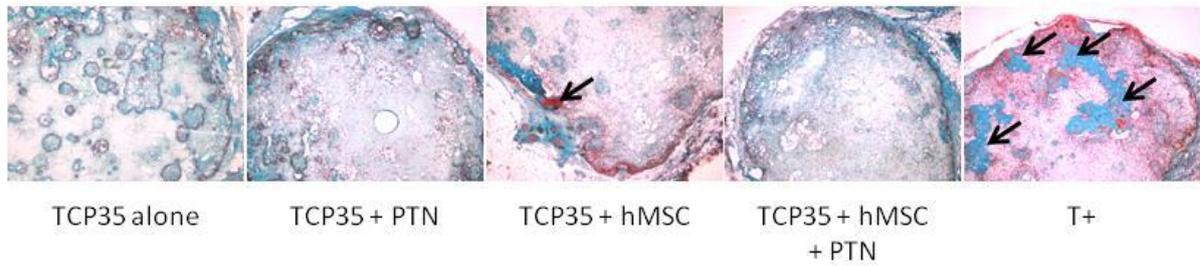


Figure 5. Effect of PTN coated TCP35 on hMSC gene expression profile. Coated scaffolds (0 pg/cm²: white box; 4 pg/cm²: grey box; 10 pg/cm²: black box) were seeded with 3.10⁵ cells. After 7 days culture RNA were purified and analyzed for **(A)** osteoblastic differentiation markers: BMP2 (bone morphogenetic protein 2), BSP (bone sialoprotein), OP (osteopontin), ON (osteonectin), OC (osteocalcin), **(B)** chondrogenic differentiation markers: ACAN (aggrecan) and collagen 2 and **(C)** angiogenic gene : Ang1 (angiopoietin 1), VEGF (vascular endothelial growth factor) expressions. Test were performed on hMSC from 6 patients. Expression levels are reported to GAPDH, and normalized with the dose 0 value.

A



B

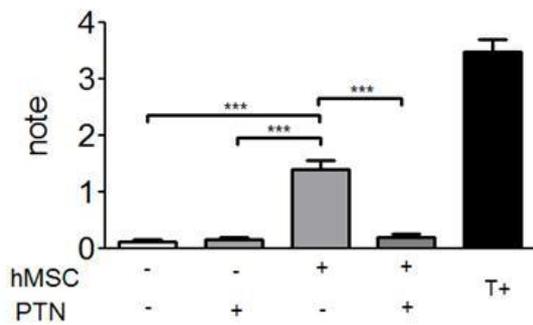


Figure 6. Ectopic osteoformation in vivo. TCP35 functionalized or not with PTN; cellularized or not with hMSC were ectopically implanted in the back of immunodeficient mice. Positive control consist of a colonized TCP35 cultured for 7 days under osteoinductive medium before implantation (6 scaffolds per condition). After 8 weeks of implantation, scaffolds were retrieved and analyzed by histology. **(A)** Masson's trichrome staining of scaffolds slices. Arrows indicate new bone formation. Each photography is representative of its condition. **(B)** Semi-quantitative evaluation of bone formation in scaffolds. A maximum note of 5 is assigned to positive control. For each condition, 80 slices on a total depth of 800µm in the scaffold were blindly analyzed by 3 experimenters. Values were analyzed by a One way anova Kruskal-Wallis test (***:p<0.001).

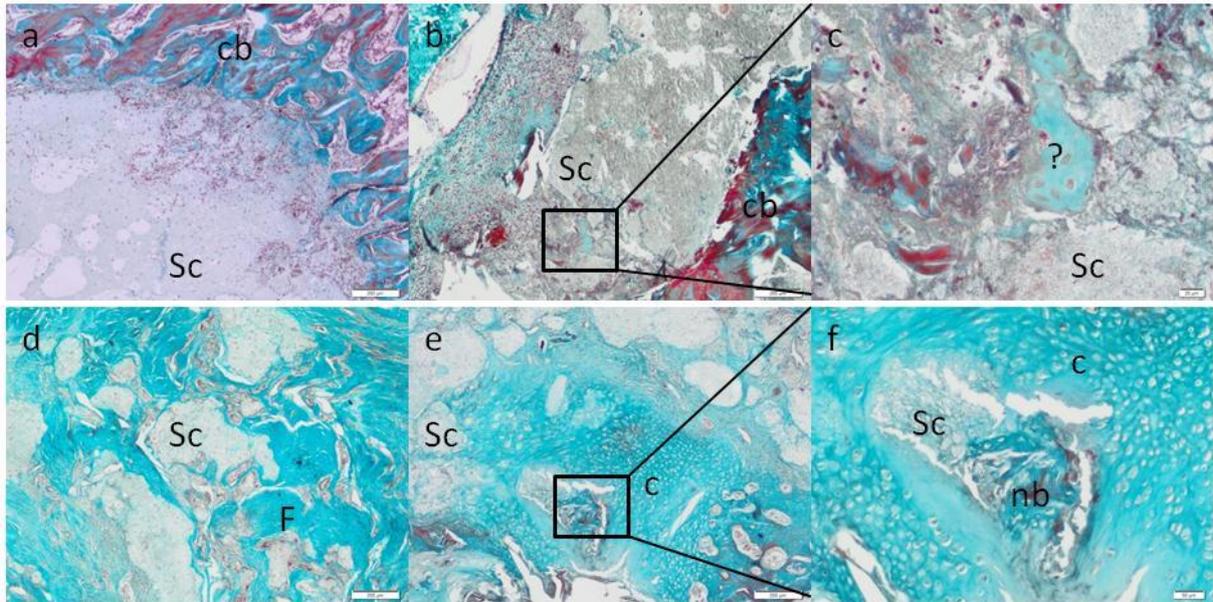


Figure 7. Orthotopic bone regeneration. TCP35 alone (a,d) or functionalized with PTN at 10 pg/cm² (b,c,e,f) were implanted in a condyle femoral defect of a rat (6 scaffolds per condition, 3 rat per condition). Scaffolds were harvested 2 weeks (a, b, c) or 2 months (d, e, ,f) after implantation. c: enlargement of the box in b. f: enlargement of the box in e. Sc: scaffold, cb: cancellous bone, F: fibrous tissue, C: cartilage, nb: new bone, ?: undefined tissue. Bars represent 200 μm (a, b, d, e) or 50 μm (c and f).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 3

Modulation de l'expression des protéoglycannes durant les différenciations CSMh

- **Article 3**

“Proteoglycans expression is modulated during long term culture and trilineage differentiation of human mesenchymal stromal cells”

Thibault Boudierlique, Helene Rouard, José Courty, Nathalie Chevallier and Patricia Albanese

• **CHAPITRE 3 : Modulation de l'expression des protéoglycannes durant les différenciations des CSM humaines**

1 Introduction

Les protéoglycannes sont des protéines sur lesquelles des chaînes de GAG sont fixées de façon covalente sur des résidus sérine via un sucre de type xylose. Elles peuvent être libres dans la matrice extracellulaire ou liées à la membrane cellulaire. Ces protéoglycannes jouent 2 rôles majeurs au sein du microenvironnement cellulaire : (1) Ils constituent des éléments architecturaux importants, au travers de leur capacité à interagir avec le cytosquelette de la cellule ; (2) ils séquestrent, protègent et modulent les interactions des facteurs de croissances avec leurs récepteurs et donc leurs activités. Il a été montré que chaque organe possédait un panel d'expression de PG spécifique (pour revue (Perrimon and Bernfield, 2000)). C'est également le cas de certains types cellulaires et de leurs microenvironnements. Par exemple, l'expression de l'aggrécane est principalement restreinte à la matrice cartilagineuse (Knudson and Knudson, 2001), tandis que le SDC4 est plus ubiquitaire (Wilcox-Adelman et al., 2002). On observe également des différences d'expression des PG en fonction du statut de différenciation d'un même tissu, en effet, le SDC3 n'est pas exprimé dans les ébauches cartilagineuses des membres chez le rat lors du développement embryonnaire, cependant, lorsque la zone hypertrophique des plaque de croissance se constitue, on observe une expression spécifique du SDC3 dans la zone de cartilage minéralisée et pas dans la zone de cartilage en prolifération ni dans la zone d'os nouvellement formé (Imai et al., 1998). Une seule étude a été réalisée sur l'expression de quelques protéoglycannes par les CSMh en culture in vitro (Schofield, Gallagher, and David, 1999), montrant que les PG GPC1, SDC4, SDC3 et SDC2 sont présent à la surface des CSM et PRCAN est retrouvé dans la MEC de ces cellules. Mais ce répertoire reste pauvre et il ne s'intéresse pas à la modulation du panel d'expression des PG durant la culture à long terme et les différenciations des CSMh. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression d'un panel plus large de PG matriciels et membranaires durant la culture à long terme et les trois différenciations mésenchymateuses des CSMh. Nous avons étudié l'expression de PG connus, entre autre, pour moduler la signalisation cellulaire (SDCs, GPCs), mais intervenant également dans la régulation de la mise en place de la MEC notamment grâce à leurs interactions avec les fibrilles de collagène (SLRPs, PRCAN, VCAN, AGRIN). Sur la base de l'importance architecturale et fonctionnelle de ces composés matriciels, nous émettons l'hypothèse qu'une telle étude permettrait de définir de nouveaux régulateurs potentiels (1) du microenvironnement médullaire et de ces interactions avec les CSM (2) de l'homéostasie de la moelle osseuse et de ses niches, (3) des processus pathologiques ou de réparation de l'os. Cette étude fait l'objet d'un article en cours de rédaction.

2 Résultats

2.1 Protéoglycannes membranaires

2.1.1 Famille des syndécans

Les SDC sont une famille de 4 HSPG membranaires. Les SDC peuvent également porter des CS. Chaque SDC possède un domaine intracellulaire, un domaine intramembranaire et un domaine extracellulaire qui est la région la moins conservée. Cet ectodomaine présente des séquences consensus de type Ser-Gly sur lesquelles se greffent de 3 à 5 chaînes de GAG. Les SDC coopèrent avec différents récepteurs dans la signalisation intracellulaire des protéines Wnt, Hedgehog, FGFs et TGF β . Ils peuvent aussi interférer dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Whiteford et al., 2007). Leur interaction avec le cytosquelette d'actine via une interaction avec le système Src/cortactin leur permet également de participer à la conformation cellulaire (Kinnunen et al., 1998).

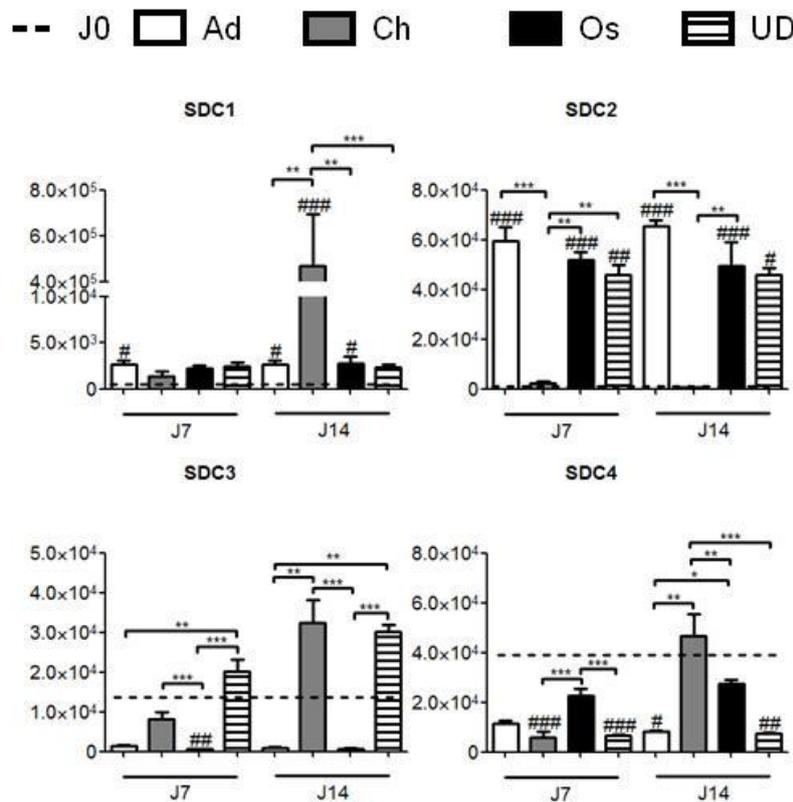


Figure 25 Expression des Syndécans durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh

Après 7 et 14 jours de culture de CSMh en milieu adipoinducteur (blanc), chondroinducteur (gris), ostéoinducteur (noir) ou en milieu basal (rayé blanc et noir), une analyse de l'expression du syndécan 1 (SDC1), du syndécan 2 (SDC2), du syndécan 3 (SDC3) et du syndécan 4 (SDC4) est effectuée par RT-qPCR sur les ARN totaux. Le jour avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-(\text{gène}-\text{GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions par rapport au jour 0 (J0) (#: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) et entre les différentes conditions (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Au jour 0, les CSMh présentent une expression de SDC1 et SDC2 relativement faible tandis que l'expression des SDC3 et SDC4 est forte. A cours de la culture à long terme l'expression du SDC2 est induite et celle du SDC4 diminuée, tandis qu'on n'observe aucune modulation significative de l'expression des SDC1 et SDC3. Les différenciations ostéoblastiques et adipogéniques sont associées à une induction du SDC1 (x20) et du SDC2 (x4000) et à une inhibition du SDC3. La différenciation adipogénique est également associée à une baisse significative de l'expression du SDC4. La différenciation chondrogénique est associée à une inhibition du SDC4 au J7 puis à l'induction de son expression et de celle du SDC1 (x3500) au J14. Le SDC2 et SDC3 ne présentent pas de modulation significative de leurs expressions par rapport au J0 (Figure 25).

Bien que les SDC soient parmi les PG les plus ubiquitaires (pour revue (Carey, 1997)), on peut cependant observer un panel d'expression différent pour chacune des différenciations étudiées des CSMh.

2.1.2 Famille des glypicans

Les glypicans (GPC) sont une famille de 6 protéines membranaires reliées à la membrane cellulaire par une ancre de type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI). Les GPC sont principalement des HSPG (Figure 22). Le fait qu'ils ne soient pas reliés au cytosquelette ni à des kinases intracellulaires permet de penser qu'ils ont un rôle de récepteur de basse affinité pour de nombreux morphogènes (Tumova, Woods, and Couchman, 2000).

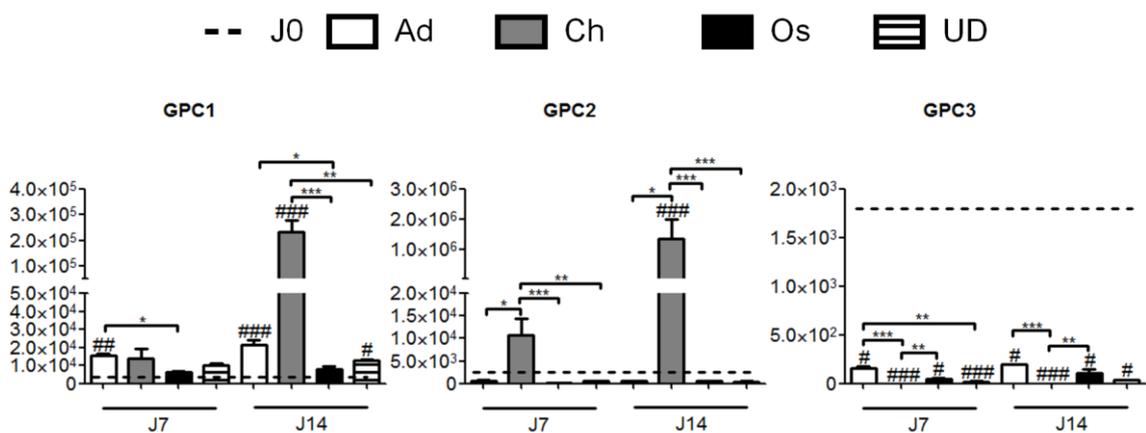


Figure 26 Expression des glypicans durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh

Après 7 et 14 jours de culture de CSMh en milieu adipoinducteur (Ad, blanc), chondroinducteur (Ch, gris), ostéoinducteur (Os, noir) ou en milieu basal (UD, rayé blanc et noir), une analyse de l'expression du glypican 1 (GPC1), du glypican 2 (GPC2) et du glypican 3 (GPC3) est effectuée par RT-qPCR sur les ARN totaux. Le jour avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-(\text{gène}-\text{GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions par rapport au jour 0 (J0) (#: p<0.05; ##: p<0.01; ###: p<0.001) et entre les différentes conditions (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Les CSMh à sous-confluence expriment les GPC1, GPC2 et GPC3 à des niveaux similaires. L'expression du GPC1 est augmentée significativement dans toutes les conditions par rapport au J0, excepté pour la différenciation ostéoblastique. Les CSMh chondroinduites présentent la plus forte induction du GPC1 (x100 au J14), ce PG est d'ailleurs significativement plus fortement exprimé durant la chondroinduction que pendant les autres différenciations. Le GPC2 est inhibé dans toutes les conditions sauf dans la différenciation chondrocytaire qui présente une induction significative par rapport aux autres conditions (500 fois par rapport au J0). Le GPC3 est lui significativement inhibé dans toutes les conditions (Figure 26).

A notre connaissance, il n'y a pas de données sur l'expression de GPC spécifique au cartilage. En revanche, le GPC3 est indispensable à la différenciation ostéoblastique des cellules de lignées ostéoblastique murine MC3T3-E1. En effet, l'extinction de son expression par des SiRNA inhibe l'expression de RUNX2 au début de la différenciation. GPC3 semble donc important dans les phases précoces de la différenciation (Haupt et al., 2009). GPC3 semble également impliqué dans l'internalisation du glucose par les cellules adipeuses via une interaction avec le récepteur au glucose GLUT4 (Taguchi et al., 2008).

2.2 Protéoglycannes matriciels

2.2.1 La famille des "Small leucin repeats proteoglycan"

Les "Small leucin repeats proteoglycan" (SLRP) sont une famille de PG matriciels dont le core protéique comprend de 6 à 10 résidus leucine adjacents (Hocking, Shinomura, and McQuillan, 1998; Iozzo, 1999). Cette famille comprend, entre autre, la décorine (DCN), le biglycane (BGC), la fibromoduline (FMOD) et le lumican (LUM). La DCN et le BGC peuvent lier le TGF β 1, modulant ainsi son activité (pour revue (Knudson and Knudson, 2001)). Les SLRP interviennent principalement dans la mise en place et le maintien de la MEC grâce à leurs interactions avec les collagènes. Ces interactions leur permettent de protéger les collagènes des protéases (Geng, McQuillan, and Roughley, 2006), mais également d'organiser et de réguler la taille des fibres de collagène (pour revue: (Kalamajski and Oldberg, 2010)).

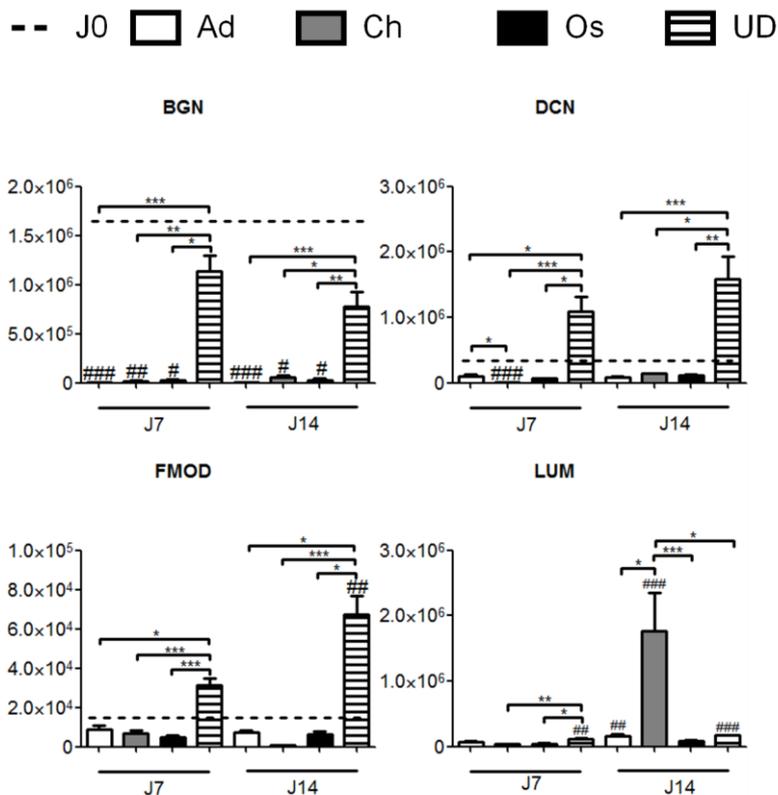


Figure 27 Expression des SLRP durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh

Après 7 et 14 jours de culture de CSMh de trois patients en milieu adipogène (blanc), chondrogène (gris), ostéogène (noir) ou en milieu basal (rayé blanc et noir), une analyse de l'expression du biglycane (BGC), de la décorine (DCN), de la fibromoduline (FMOD) et du lumican (LUM) est effectuée par RT-qPCR sur les ARN totaux. Le jour avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-(\text{gène}-\text{GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions par rapport au jour 0 (J0) (#: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$) et entre les différentes conditions (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Les CSMh à sous-confluence présentent une forte expression des 4 SLRP testés ici, les CSMh non différenciés à confluence montrent une induction significative de l'expression de FMOD et LUM alors que BGN et DCN ne sont pas modifiées significativement. Les 3 différenciations sont associées à une forte diminution de l'expression de DCN, BGN et FMOD. En revanche, LUM est significativement induit lors de la différenciation chondrocytaire (x300) et adipocytaire (x25) à J14. Aucune modification significative de l'expression de LUM n'est associée à la différenciation ostéoblastique (Figure 27).

Ces données suggèrent une implication importante de DCN, BGC et FMOD dans les fonctions des CSMh, mais également l'importance de LUM dans le processus de différenciation chondrocytaire et adipocytaire.

2.2.2 Agrin, Perlecanne et Versicanne

L'agrin, un HSPG, a été principalement décrite comme régulateur de la synapse neuromusculaire (Kim et al., 2008). Son rôle a été cependant élargi au maintien des propriétés des CSH dans la moelle osseuse (Mazzon et al., 2012). Le PRCAN est lui un HSPG principalement retrouvé dans la membrane basale. PRCAN serait impliqué dans la mise en place et la régulation de la taille et de l'organisation des fibres de collagène (Knudson and Knudson, 2001). Le VCAN est un CSPG appartenant à la famille des lecticans. Cette famille comporte les PG ayant le plus de chaînes de GAG attachées à leur core protéique (jusqu'à 100). VCAN intervient dans les mécanismes de différenciation adipocytaire (Zizola et al., 2007) et chondrocytaire (Choocheep et al., 2010).

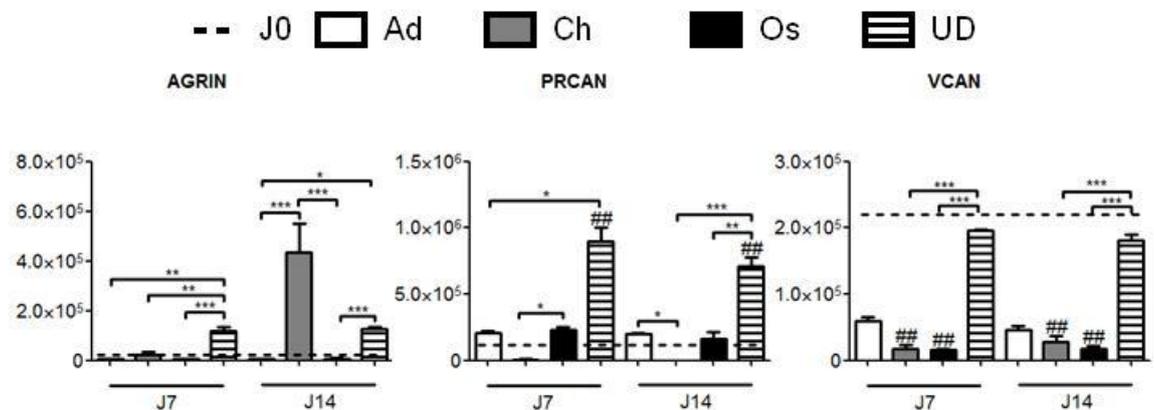


Figure 28 Expression de l'Aggrin, du PRCAN et du VCAN durant la culture à long terme et la différenciation des CSMh

Après 7 et 14 jours de culture de CSMh de trois patients en milieu adipogène (blanc), chondrogène (gris), ostéogène (noir) ou en milieu basal (rayé blanc et noir), une analyse de l'expression de l'agrifin (AGRIN), du Perlecanne (PRCAN) et du versicanne (VCAN) est effectuée par RT-qPCR sur les ARN totaux. Le jour avant induction (J0) est représenté par des pointillés. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 expériences réalisées sur 3 patients indépendants. Les taux d'expression des gènes étudiés sont rapportés à un gène de ménage (GAPDH) selon la formule: $2^{-(\text{gène}-\text{GAPDH})}$. Les valeurs sont analysées par un test statistique Kruskal-Wallis ONE WAY ANOVA entre les conditions par rapport au jour 0 (J0) (##: $p < 0.01$) et entre les différentes conditions (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Les CSMh cultivées à sous-confluence expriment fortement l'AGRIN, le PRCAN et le VCAN. La condition UD est associée à une augmentation de l'expression de l'AGRIN et de PRCAN alors qu'aucune modification de l'expression de VCAN n'est observée dans cette condition. La différenciation adipocytaire est associée à une absence de modulation significative de l'AGRIN, du PRCAN et à une inhibition du VCAN. L'ostéoinduction induit une diminution significative de l'expression de VCAN, tandis que l'expression de l'AGRIN et de PRCAN n'est pas modifiée significativement. En revanche, la chondroinduction est associée à une induction de l'AGRIN (x20), mais à une inhibition de PRCAN et VCAN.

3 Discussion

Les propriétés des PG sont déterminées d'une part par les fonctions de leur core protéique et d'autre part par les caractéristiques des chaînes de GAG qui y sont covalamment attachés. Les PG sont exprimés dans tous les tissus à des niveaux différents. Ainsi, chaque cellule possède son propre panel de PG (Perrimon and Bernfield, 2000; Schaefer et al., 2000). Déterminer ce panel d'expression durant la culture et la différenciation des CSMh pourrait permettre de définir de nouvelles cibles d'étude sur : (1) leurs rôle dans le maintien de la niche hématopoïétique, (2) leurs fonctions dans la moelle osseuse et dans les processus de réparation osseuses dans lesquels elles sont impliquées.

3.1 Les protéoglycannes et la niche hématopoïétique

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse chez les mammifères adultes. Ceci implique que les CSH soient dans un environnement qui leur permette de maintenir leurs propriétés souches ou de s'engager vers une voie de différenciation cellulaire particulière. Ainsi, le concept de « niche » a été introduit dans le domaine de l'hématopoïèse (pour revue: (Bianco, 2011)). La niche hématopoïétique est constituée de nombreux types cellulaires, tels que les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les CSM. Il devient cependant de plus en plus évident que les adipocytes sont également impliqués. Cependant, au contraire des CSM, il semblerait que les adipocytes aient un effet inhibiteurs de l'hématopoïèse. En effet, à la naissance, la totalité des os longs possède de la moelle dite « rouge », siège de l'hématopoïèse. Lors du vieillissement, et ce de façon différentielle en fonction des os considérés, la moelle « rouge » subie une modification de son contenu cellulaire conduisant à une augmentation de la part des adipocytes, laissant ainsi place à la moelle « jaune ». Ces modifications sont associées à un arrêt de l'hématopoïèse, ce phénomène peut cependant être inversé dans des conditions qui ne sont pas encore connues. Ces données suggèrent que les adipocytes maintiendraient les CSH dans un état indifférencié, que ce soit par un blocage de l'approvisionnement sanguin (par collapsus des vaisseaux) ou par une modification de la régulation des facteurs de croissance par les PG présents à la surface des adipocytes ou relargués dans le microenvironnement (pour revue: (Bianco, 2011)). La capacité des PG à moduler les effets des facteurs de croissances suggère que les PG produits par les CSMh et les adipocytes pourraient intervenir dans le maintien de la niche hématopoïétique.

Ainsi, une étude différentielle des PG exprimés par les CSM et les adipocytes pourrait permettre d'identifier les PG impliqués dans le maintien de la quiescence des CSH et ceux impliqués dans la différenciation des CSH.

La présence de DCN et de BGN dans la MEC est importante pour la survie des CSM. En effet, les CSM inactivées pour l'expression de ces 2 PG ont un taux d'apoptose plus élevé que les CSM

sauvages. Ce phénotype est du à un manque de séquestration de TGF β 1 dans la MEC (Bi et al., 2005), hors, nos résultats indiquent que les CSMh non différenciées expriment les ARN de ces 2 PG. Ainsi les CSMh produiraient les facteurs nécessaires à leur survie. Nous montrons également que l'expression de ces 2 PG et de FMOD est fortement inhibée pendant la différenciation adipocytaire. Suggérant leurs rôles dans le maintien de l'hématopoïèse. L'étude de l'influence de ces 3 SLRP sur les propriétés des CSH pourrait permettre d'élucider un nouveau mécanisme de régulation des interactions des CSM vis-à-vis des CSH.

Nos résultats montrent que les CSMh expriment le PRCAN alors que les CSM adipoinduites montrent une forte baisse de son expression. Ce PG est connu pour ses propriétés angiogéniques. En effet, le PRCAN peut se lier au VEGFR1 porté par les cellules endothéliales, permettant ainsi son activation (Ishijima et al., 2012). La régulation de VCAN durant la culture à long terme et la différenciation adipocytaire des CSM est similaire à celle de BGN et DCN. L'expression de PRCAN et de VCAN par les CSMh pourrait expliquer leurs propriétés proangiogénique, mais également suggérer l'implication de PRCAN et de VCAN dans l'hématopoïèse.

L'AGRIN a été précédemment montrée comme étant exprimée par les CSMh et nécessaire à la survie et à l'expansion des CSH les plus immatures ((Mazzon et al., 2012)). Nos résultats confirment que les CSM expriment AGRIN, et que son expression est fortement inhibée lors de la différenciation adipocytaire. Cette absence d'expression de l'AGRIN par les adipocytes pourrait en partie expliquer leur inaptitude à soutenir l'hématopoïèse.

Inversement, l'expression de GPC1 est induite durant la différenciation adipocytaire par rapport aux CSM non différenciées. Ceci suggère que GPC1 pourraient être impliqués dans la quiescence des CSH observée dans la moelle « jaune ».

Les PG les plus fortement exprimés par les CSM sont des CSPG (SLRPs, VCAN), alors que ceux exprimés par les adipocytes sont principalement des HSPG (SDC2, GPCs). Ceci suggère que le maintien de l'hématopoïèse est régulé par les CS et que le maintien de la quiescence des CSH serait plutôt régulé par les HS.

3.2 Les protéoglycannes et la régénération osseuse

La régénération osseuse des os longs passe par le recrutement de progéniteurs mésenchymateux sur le site de lésion. Les progéniteurs se différencient ensuite en chondrocytes pour former une ébauche cartilagineuse. Enfin, après l'apoptose des chondrocytes, le callus est envahi par les ostéoblastes qui formeront la matrice osseuse. Ces phénomènes sont superposés dans le temps dans le callus.

Les CSM participent à la régénération osseuse en procurant d'une part les facteurs de croissance et de différenciation nécessaires à la réparation, mais également comme source cellulaire

pour la formation des tissus cartilagineux et osseux retrouvé dans ce processus (pour revue (Bielby, Jones, and McGonagle, 2007)). Une étude de Song et al. a montré que l'expression des PG était finement régulée dans le callus après une fracture induite chez le rat, avec une augmentation précoce de l'expression de PRCAN et SDC1 lors de la régénération osseuse (Song et al., 2006).

Nos résultats montrent que les CSMh expriment le PRCAN à un niveau élevé ainsi que le SDC1 lors de la différenciation chondrogénique. PRCAN possède des propriétés angiogéniques ((Ishijima et al., 2012)). Les CSMh pourraient donc induire l'invasion vasculaire du callus par l'intermédiaire du dépôt de PRCAN dans la MEC du callus. Durant la formation du callus, l'expression de GPC3 diminue et celle de GPC1 augmente aux débuts du processus de régénération (Song et al., 2006). Nos résultats indiquent que l'expression de GPC1 est fortement induite durant la chondroinduction tandis que le GPC3 est exprimé par les CSM non différenciées et diminue lors de la différenciation. La modulation de l'expression de ces PG lors de la régénération osseuse observée par Song et al. pourrait être due au recrutement de progéniteurs mésenchymateux et à leur différenciation chondrocytaire.

Nos résultats montrent que GPC2 est induit durant la différenciation chondrogénique, il serait intéressant d'étudier le rôle de ce PG dans la différenciation chondrocytaire, mais également dans la réparation osseuse.

Nous montrons que le traitement chondroinducteur potentialise l'expression de l'AGRIN par les CSMh. Il a été précédemment démontré que l'AGRIN était localisée au niveau de la zone de prolifération et préhypertrophique des plaques de croissance. La déplétion de l'AGRIN dans des souris conduit à une diminution de la taille des plaques de croissance et de la taille des os de l'animal. De plus, le cartilage des plaques de croissance de ces animaux présente un marquage des GAG sulfatés au bleu alcian ou à la safranin O moins fort que les animaux sauvages (Hausser et al., 2007). Ces données indiquent que l'AGRIN est importante pour le dépôt de GAG dans la matrice, et donc son implication dans la différenciation chondrocytaire.

Le rôle des CSM dans la formation du callus et la réparation osseuse n'est pour l'instant que peu documenté. Les propriétés de régulations des facteurs de croissance par les PG en font de bonnes cibles d'étude dans le cadre de la réparation tissulaire. Ainsi, l'étude des propriétés différenciatrices et régulatrices de l'inflammation des PG produits par les CSM lors de leurs différenciations pourrait permettre de mieux comprendre leur rôle durant la réparation osseuse.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 4

Potentialisation des propriétés des CSM de rat par les mimétiques des GAG.

Application dans un modèle murin d'ostéoformation ectopique, associant biomatériaux, mimétiques et CSM humaines

- **Article 4**

“Glycosaminoglycans mimetics potentiate the proliferation, differentiation and migration properties of rat mesenchymal stem cells in vitro independently of FGF-2 treatment.”

Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J, Albanese P

- **Article 5**

“Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell based scaffolds modulates osteoblastic/osteoclastic balance and angiogenesis in vivo”

Frescaline G, Boudierlique T, Mansoor L, Carpentier G, Baroukh B, Sineriz F, Trouillas M, Saffar JL, Courty J, Lataillade JJ, Papy-Garcia D, Albanese P

CHAPITRE 4 : Potentialisation des propriétés des CSM de rat par les mimétiques des GAG. Application dans un modèle murin d'ostéoformation ectopique, associant biomatériaux, mimétiques et CSM humaines

1 Introduction

Le travail présenté dans ce chapitre fait partie de la thèse de Guilhem Frescaline, doctorant de l'ED 402 Sciences de la Vie et de la Santé sous la direction de Patricia Albanese. Ma participation active à ce travail me permet de signer en 2nd auteur deux des articles de Guilhem. Le résultat de ce travail ouvre également d'importantes perspectives quant aux applications thérapeutiques de HARP via son association aux GAG mimétiques qui seront discutées à la fin de ce manuscrit.

L'ostéogénèse est un processus soigneusement orchestré dans le temps et par plusieurs facteurs de régulation de la prolifération et de la différenciation ostéogénique dont le FGF-2 et les GAG (Bramono et al., 2012; Manton et al., 2007; Moore et al., 2002; Quarto and Longaker, 2006).

Le FGF-2 stocké dans la MEC osseuse stimule la prolifération des cellules stromales et des ostéoblastes (Jackson, Nurcombe, and Cool, 2006). Des études *in vivo* ont démontré son effet inducteur sur la formation osseuse (Montero et al., 2000). Toutefois les données obtenues *in vitro* sont contradictoires. En effet, l'ajout de FGF-2 exogène peut avoir un effet potentialisateur ou inhibiteur de la différenciation ostéoblastique, en fonction de la dose et de la durée du traitement (Dombrowski et al., 2009; Hanada, Dennis, and Caplan, 1997; Ling et al., 2006; Moore et al., 2002; Pitaru et al., 1993; Quarto and Longaker, 2006).

Différentes familles de GAG sont successivement exprimées au cours de l'ostéogénèse et participent activement à sa régulation (Nurcombe et al., 2007). Parmi les GAG, les rôles des HS sont prépondérants, car ils potentialisent l'activité de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la différenciation ostéogénique tels que le FGF-2, les BMPs ou le TGF- β 1. L'utilisation de HS a montré un effet inhibiteur sur l'ostéogénèse par inhibition de l'activité du FGF-2 (Dombrowski et al., 2009). Bien que les GAG puissent moduler la différenciation ostéogénique, de nombreuses questions restent en suspens quant à leurs effets individuels spécifiques ainsi que sur les mécanismes déclenchés en aval.

L'utilisation d'analogues des GAG dont on maîtrise la structure permet l'étude des relations entre la signature chimique d'un GAG naturel et sa fonction biologique. La société OTR3 développe de tels mimétiques structuraux appelés RGTA pour « Regenerating Agent » (Barrault and Caruelle, 2006). Les deux molécules leader sont appelées OTR₄₁₂₀ et OTR₄₁₃₁. Elles présentent des taux de substitution en groupement sulfates et carboxyméthyles similaires à ceux des HS. Cependant, la molécule OTR₄₁₃₁ est acétylée au contraire de l'OTR₄₁₂₀. Cette famille de molécules présente un fort

potentiel thérapeutique, expliqué en partie par le fait que ces molécules sont résistantes au clivage des glycanases relarguées dans la MEC lors des lésions tissulaires. Cela leur permet de restructurer ce microenvironnement particulièrement dégradé dans ces situations pathologiques et de fournir une architecture matricielle adoc pour le nichage des cellules impliquées dans le processus de réparation. Enfin, leur effet thérapeutique s'explique également par leur capacité à stabiliser et protéger les HBGF des dégradations enzymatiques *in vitro*. Les GAG mimétiques augmentent donc la demi-vie des HBGF et potentialisent leurs activités biologiques, contrairement aux GAG endogènes dégradés dans le microenvironnement lésé (Alexakis et al., 2004). Leur efficacité pro-régénérative a été démontrée dans de nombreux modèles animaux de lésions, telle que l'ulcère nécrotique de la peau, l'ischémie des muscles squelettiques et cardiaques, et la réparation de défaut osseux (Escartin et al., 2003; Garcia-Filipe et al., 2007; Lafont et al., 2004).

De précédent travaux ont montré que l'utilisation de mimétique de GAG permet la régénération d'une craniotomie chez le rat en comblant le défaut par un tissu osseux, mais également en reconstituant la suture sagittale (Lafont et al., 2004). Notre hypothèse est que l'effet régénératif de ces mimétiques pourrait être dû à leur capacité à moduler les propriétés de cellules souches, résidentes sur le site de la lésion ou mobilisées à partir de la périphérie. Pour étayer cette hypothèse, nous avons voulu étudier si les effets régénératifs des GAG mimétiques, observés dans un modèle de réparation osseuse de la calvaria de rat, pouvaient être dus à un recrutement de CSM immatures et à leur orientation vers un phénotype ostéogénique plus mature. En effet, des données de la littérature soutiennent cette hypothèse.

(1) L'étude histologique de Lafont et al. a montré que l'application topique de ces RGTA avait recréé un microenvironnement favorable à la suture de blessures crâniennes et suggère que cela pouvait être dû à la migration d'ostéoprogéniteurs à partir de la dure-mère (Lafont et al., 2004).

(2) Un composé de cette famille, utilisé *in vitro* seul ou associé à du FGF-2, n'a pas modifié la prolifération de cellules ostéoblastiques murines mais a stimulé l'expression des marqueurs ostéoblastiques comme l'ALP (Blanquaert, Barritault, and Caruelle, 1999).

(3) Des résultats obtenus par Albanese et al. ont montré que l'injection périphérique de GAG mimétiques de structures différentes induit la mobilisation des CSH et de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse vers le sang périphérique, via la création d'un gradient de « stromal derived factor 1 » (Albanese et al., 2009).

Pour conforter notre hypothèse, nous avons étudié si les mimétiques OTR₄₁₂₀ et OTR₄₁₃₁ étaient capables de moduler différentes propriétés de CSM de rat amplifiées en présence ou non de FGF-2 (populations rCSM(+) et rCSM(-)). Nous avons tout d'abord évalué l'influence des mimétiques sur la clonogénicité des rCSM. Nous avons ensuite détaillé les effets individuels de l'exposition continue au FGF-2, de l'ajout exogène de mimétiques ainsi que la combinaison des deux traitements

sur la prolifération, la migration et les processus de différenciation adipogénique et ostéoblastique. Nous avons également évalué l'influence du FGF-2 sur les effets des mimétiques en analysant les propriétés de prolifération et de migration des rCSM dans les mêmes conditions que précédemment en présence ou non de SU5402, un inhibiteur du FGFR-1. Ces résultats font l'objet de l'article 4 publié à "Stem Cell Research" (Frescaline et al. Stem Cell Res 8(2), 180-92.) et sont présentés ci-après.

Dans un second temps, l'objectif majeur de ces études étant de démontrer que ces molécules peuvent être associées à des CSM dans le cadre des thérapies de régénération osseuse. Nous avons donc également évalué leur aptitude à potentialiser la formation osseuse dans un modèle d'ostéof ormation *in vivo*.

Les résultats de l'article 4 montrant pour la première fois les effets potentialisateurs des mimétiques sur les propriétés de prolifération, migration et différenciation des rCSM, nous avons considéré OTR₄₁₂₀ comme molécule leader dans le cadre de la différenciation ostéoblastique. Nous avons donc envisagé de l'associer à des substituts osseux poreux en céramique, déjà commercialisés, fournis par la société CERAVER. Notre hypothèse est que la présence d'une matrice dérivée d'un polymère de dextrane sulfaté à la surface des biomatériaux optimiserait leur colonisation *in vitro* par les CSM ainsi que leurs fonctionnalités *in vivo*.

Dans un but d'application humaine, nous avons tout d'abord validé que les effets de l'OTR₄₁₂₀, initialement démontrés sur les rCSM, étaient également effectifs sur les CSMh. Nous avons ensuite mis au point les protocoles de greffage covalent du mimétique sur les biomatériaux et réalisé des tests fonctionnels *in vitro* sur les propriétés des CSMh. Ces tests ont déterminé que OTR₄₁₂₀ optimise la différenciation ostéoblastique des CSMh ainsi que la colonisation des substituts par celles-ci. Enfin, nous avons évalué l'efficacité des associations mimétiques/CSMh/biomatériaux sur l'ostéof ormation *in vivo*. Pour cela, nous avons réalisé des greffes de ces implants dans des poches sous-cutanées de souris immunodéficientes et analysé la néof ormation osseuse et le remodelage de l'implant 2 mois après l'implantation. Ces résultats font l'objet de l'article 5 actuellement en révision à "Tissue engineering" et sont présentés à la suite de l'article 4.

Ces travaux montrent que les GAG mimétiques et plus particulièrement OTR₄₁₂₀ ont des propriétés chemoattractives et prolifératives sur les CSM humaines et de rat. De plus, OTR₄₁₂₀ induit la différenciation ostéoblastique de ces cellules, indiquant son fort potentiel dans le cadre des thérapies ostéoréparatrices. L'implantation *in vivo* de constructions OTR₄₁₂₀/CSMh/biomatériaux en site ectopique chez la souris immunodéficientes montre que les mimétiques permettent un recrutement efficace de progéniteurs ostéoclastiques mais également une invasion vasculaire importante.



REGULAR ARTICLE

Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells

Guilhem Frescaline, Thibault Boudierlique, Minh Bao Huynh, Dulce Papy-Garcia, José Courty, Patricia Albanese*

Université Paris Est Créteil, Faculté des Sciences et Technologie, F-94010, Créteil, France
CNRS, CRRET Laboratory EAC 7149, F-94010, Créteil, France

Received 1 February 2011; received in revised form 2 August 2011; accepted 27 September 2011

Abstract Successful use of stem cell-based therapeutic products is conditioned by transplantation of optimized cells in permissive microenvironment. Mesenchymal stem cell (MSC) fates are tightly regulated by humoral factors, cellular interactions and extracellular matrix (ECM) components, such as glycosaminoglycans (GAG), which are complex polysaccharides with structural heterogeneity. During osteogenesis, a temporally controlled expression of particular GAG species is required to interact with specific growth promoting and differentiating factors to regulate their biological activities. As a comparative tool to study natural GAG, we used structurally and functionally related synthetic GAG mimetics. One of these compounds [OTR₄₁₂₀] was previously shown to stimulate bone repair in rat models. Here, we demonstrate that structurally distinct GAG mimetics stimulate differentially clonogenicity, proliferation, migration and osteogenic phenotype of MSC *in vitro*, according to their specific chemical signature, underlying the role of sulfate and acetyl groups in specific interactions with heparin binding factors (HBF). These effects are dependent on FGF-2 interactions since they are inhibited by a FGF receptor 1 signaling pathway blocker. These data suggest that the *in vivo* [OTR₄₁₂₀] bone regenerative effect could be due to its ability to induce MSC migration and osteogenic differentiation. To conclude, we provide evidences showing that GAG mimetics may have great interest for bone regeneration therapy and represent an alternative to exogenous growth factor treatments to optimize potential therapeutic properties of MSC.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: GAG, glycosaminoglycan; rMSC, rat mesenchymal stem cells; ECM, extracellular matrix; HBP, heparin binding protein; HS, heparan sulfate; CS, chondroitin sulfate; BMSC, bone marrow mononuclear cells; CFE, colony forming efficiency; CFU-F, colony forming unit-fibroblastic; FCS, fetal calf serum

* Corresponding author at: Université Paris Est Créteil, Faculté des Sciences et Technologie, CRRET Laboratory, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France. Fax: +33 1 45 17 18 16.

E-mail address: albanese@u-pec.fr (P. Albanese).

1873-5061/\$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.scr.2011.09.005

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) have a number of potential therapeutic applications for tissue regeneration, due to their ability to differentiate into various lineages. Studies of their mechanism of action have suggested that MSC transplants are short-lived *in vivo* and that their therapeutic properties are largely related to paracrine interactions with endogenous tissue and host immune cells, through the release of soluble mediators that elicit the biological response. The osteogenic potential of MSC is currently largely exploited in bone regeneration applications, since their immunomodulatory capacities were thought to be profitable in therapy against graft-versus-host disease. However, such therapeutic applications of MSC products have demonstrated their limited efficacy in bone formation. Thus new tissue engineering strategies are currently being developed based on the association of humoral growth factors and scaffolds, able to mimic proper extracellular matrix (ECM) microenvironment, in which therapeutic MSC are expected to survive, proliferate and differentiate more efficiently.

Sulfated glycosaminoglycans (GAG) are major ECM components. GAG have not only structural but also functional roles since they participate in the regulation of biological processes such as cell growth, migration and differentiation. The structure of GAG is highly complex because of the great heterogeneity in the degree of substitution and the variable positioning of their sulfate and acetyl groups. Such variability affects the intra-molecular repartition of ionic charges and hydrophobic/hydrophilic regions and also their interactions with surrounding molecules. Heparan sulfates (HS) are the GAG family members with the highest structural complexity. The presence of spatially discrete sulfated domains in HS structures is a unique feature conferring specific physicochemical and biological properties to these sugars. It is now accepted that particular structural characteristics may allow GAG to modulate the activities of numerous regulatory factors like heparin binding proteins' (HBP), which include growth factors, chemokines, cytokines and enzymes, (for review, Gallagher, 2006). GAG thus provide matrix-bound or cell surface-bound reservoirs for HBP, protecting them from proteolytic degradation and increasing their half-life. Because of their ability to stabilize growth factors, GAG act as modulators of their bioavailability (for review, Handel et al., 2005) and thus as initiators of HBP signaling (Friedl et al., 1997).

Osteogenesis is a carefully orchestrated series of events that requires a timely regulated expression of growth promoting and osteogenic differentiation factors, but also of GAG. The basic fibroblast growth factor (FGF-2) is a HBP produced by osteoblasts and stored in the bone ECM, from where it can modulate bone marrow stromal cells and osteoblast proliferation through autocrine/paracrine mechanisms (Jackson et al., 2006). *In vivo* studies have demonstrated the significant effect of FGF-2 on bone formation (Montero et al., 2000), whereas the complexity of its mitogenic activity has been pointed out in *in vitro* studies: FGF-2 has stimulatory (Ling et al., 2006; Pitaru et al., 1993) or inhibitory (Hanada et al., 1997; Dombrowski et al., 2009) effects on osteogenic differentiation of mesenchymal cells depending on dose and duration of treatments. Since it is well known that distinct functional GAG are produced along the osteoblast differentiation process (Nurcombe et al., 2007), it is

hypothesized that GAG structural changes could then be implicated on differential FGF-2 regulations. Accordingly, increased levels of key enzymes involved in GAG biosynthesis were correlated with ECM mineralization during osteogenic differentiation of MSC (Muller et al., 2008), whereas inhibition of GAG synthesis blocked the mitogenic effect of FGF-2 on osteoblasts (Molteni et al., 1999). FGF-2 activity on cell growth and differentiation were positively or negatively regulated by specific heparin saccharides (Ostrovsky et al., 2002; Goodger et al., 2008) and particular HS saccharides have shown an inhibitory effect on osteogenesis through inhibition of FGF-2 activity (Guimond and Turnbull, 1999). The effects of both FGF-2 and HS on rat MSC proliferation and differentiation are mediated through FGF receptor 1 (FGFR1) (Dombrowski et al., 2009). Moreover, structural signatures of HS have also been implicated in the regulation of the biological activity of other osteogenic factors such as bone morphogenic protein (BMP) (Manton et al., 2007).

Since GAG effects are potentially related to their abilities to modulate osteogenic factor activities, more information on their chemical structure is still required for a better understanding of these complex processes. A family of sulfated polysaccharides, structural and functional analogs of natural GAG, has been developed as a new approach to integrate the relevance of the chemical signatures of GAG to their biological function. The interest of such GAG mimetics is that their structures can be modulated by chemical synthesis, allowing availability of well-characterized products with high therapeutic potential (Papy-Garcia et al., 2005). These compounds, also named RGTA (for ReGeneraTing Agents), improved both the efficiency and quality of wound healing after local treatment in numerous animal models of injury, such as skin (Garcia-Filipe et al., 2007), muscle (Meddahi et al., 2002) and bone repair (Escartin et al., 2003; Lafont et al., 2004). Their regenerative properties could be partly explained by their interactions with HBP (Meddahi et al., 1996; Desgranges et al., 1997). Some studies on this family of compounds have shown that they are more stable than natural GAG because they resist glycanase activities (Meddahi et al., 2002). This property enhances their ability to stabilize and protect HBP from enzymatic degradations *in vitro*, increasing their half-life and improving their biological effects, as compared to endogenous GAG (Rouet et al., 2005; Garcia-Filipe et al., 2007). In particular, a GAG mimetic induced closure and repair in a model of trephine skull defect in rats in which no spontaneous healing occurred (Lafont et al., 1998). This molecule also accelerated the spontaneous healing process observed in rat craniotomy defects (Colombier et al., 1999). *In vitro* investigations demonstrated that the mimetic, used alone or associated with FGF-2, stimulated the expression of osteoblast markers such as alkaline phosphatase without modifying the proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells derived from mouse calvarias (Blanchaert et al., 1999). Moreover a kinetic study of the early regenerative effects of the mimetic during skull suture indicated that the treatment could have elicited a favorable microenvironment promoting the commitment of dura mater cells which are the primary source of osteoprogenitors (Lafont et al., 2004).

To explain this effect of GAG mimetics on bone regeneration, we hypothesize that it is partly due to their capacity to modulate endogenous MSC properties *in vivo*. Therefore, to validate this hypothesis we investigated in this study whether

some particular mimetics are able to potentiate effectively the properties of rat MSC (rMSC) *in vitro*. Two different mimetics with specific structural signatures, [OTR₄₁₂₀] and [OTR₄₁₃₁], were compared to natural GAG on their ability to modulate clonogenicity, growth, migration and osteogenic differentiation of rMSC. Each GAG mimetic was used in rMSC culture, alone or in combination with a long term treatment with FGF-2, to assess the advantages of a GAG mimetic conditioning prior to therapeutic treatment of bone defect by MSC.

Results

Effects of GAG and FGF-2 on colony forming efficiency of rat MSC

Colony forming efficiency (CFE) of rMSC was evaluated from bone marrow mononucleated cells (BMMC) cultured in medium supplemented or not with GAG mimetics, [OTR₄₁₃₁] or [OTR₄₁₂₀], or heparin or FGF-2 for 10 days (Fig. 1). Exposure of cells to GAG mimetics or to heparin induced an increase of the CFE as compared to untreated cells (CT). Although some inter-individual variability in the intensity was observed, this effect was significant for the mimetic [OTR₄₁₂₀], with a 3 fold increase ($p < 0.05$). Surprisingly, exposure to FGF-2 decreased by half the CFE of BMMC ($p < 0.05$). For further experiments, rMSC expanded in the absence or presence of FGF-2 were respectively named rMSC(-) and rMSC(+) and used for testing GAG mimetic effects on MSC properties.

In order to characterize rMSC populations obtained in these culture conditions, cell surface antigen expressions were analyzed by flow cytometry from the initial BMMC whole fraction to the amplification steps, during passage 1 and 2 (P1 and P2)

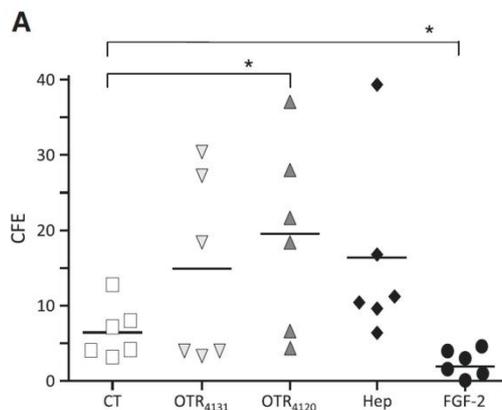


Figure 1 Effect of GAG mimetic, Heparin and FGF-2 treatment on rMSC clonogenicity. Colony Forming Efficiency (CFE) of rat MSC were evaluated as the number of CFU-F at day 10 per 10^6 BMMC seeded, without (CT) or with GAG mimetics [OTR₄₁₃₁] and [OTR₄₁₂₀] (100 ng/ml), Heparin (100 ng/ml) and FGF-2 (5 ng/ml). Each CFE is the mean of the value obtained for at least 3 wells of 6-well plates per condition and per rat sample. Experiments were performed on $N=6$ independent animals.

(Table 1). In the absence of FGF-2, mesenchymal marker expressions, including CD44, CD54, CD73 and CD90, increased during the subculture and were highly expressed (90% to 99%) at P2. During this rMSC(-) subculture, the percentage of cells expressing hematopoietic markers, such as leukocyte CD45 and macrophage CD11b, decreased progressively, from 59% and 55% of the BMMC at day 0 respectively to 7% and 10% at P2, corresponding to elimination of non adherent hematopoietic cells from the culture. In the presence of FGF-2, CD44 and CD54 expressions were always highly expressed (98% and 95% respectively), while lower percentage of cells expressed CD73 and CD90 (72% and 62% respectively) at P2, and percentages of positive cells for the two hematopoietic markers still high (35% and 28% respectively). CD31 expression was initially low on BMMC at day 0 and decreased with subculturing independently of FGF-2, suggesting that endothelial cells disappeared gradually from the culture. These data indicate that subcultures of rat BMMC performed in the absence of FGF-2 resulted in a cell population enriched in mesenchymal progenitor cells. In the presence of FGF-2 the CFE was decreased and contaminating cells are present, despite homogeneous morphology and clear expression of mesenchymal markers.

Effects of GAG and FGF-2 on rMSC growth

Effects of mimetics or natural GAG on the growth of the rMSC (-) and rMSC(+) populations were tested in 2% FCS (Fetal Calf Serum) medium for 72 h (Fig. 2). In the absence of FGF-2 long term treatment (Fig. 2A), HS and heparin had significant effects on the growth of rMSC(-) with maximal increases of 1.5-fold and 1.6-fold respectively for the 100 ng/mL dose. Similar growth effect on rMSC(-) was only observed with addition of the acetylated and sulfated GAG mimetic [OTR₄₁₃₁] (1.25-fold increase with 100 ng/mL dose) whereas no significant effect was observed with the sulfated analog [OTR₄₁₂₀] (non acetylated compound). As a positive control, a 2 fold increase of rMSC(-) growth was obtained in the presence of FGF-2. Since HS is a co-receptor for the FGF/FGFR complex and because FGFR1 is a high affinity receptor for FGF-2 binding, the same experiments were performed in the presence of SU5402, the chemical inhibitor of FGF-R1 signaling. Addition of this blocker was effective since we noted an inhibition of cell growth induced not only by FGF-2 but also by natural GAG and by the mimetic [OTR₄₁₃₁] as well. These results indicate that the effect of active GAG are partly mediated through the FGF-2/FGFR1 pathway and could be due to interaction with endogenous FGF-2, present in FCS or secreted by rMSC.

When rMSC were amplified with FGF-2 long term treatment (Fig. 2B), we observed that the growth rate of CT rMSC(+) (dotted line) decreased by about 25% as compared to CT rMSC(-) (solid line, Fig. 2A). In the presence of FGF-2, HS (100 ng/mL) and heparin (10 ng/mL) potentiated rMSC(+) growth by 1.3 fold and 1.7 fold increases, respectively. Addition of acetylated GAG mimetic [OTR₄₁₃₁] showed a higher effect than that observed on rMSC(-), with a 1.5 fold increase at 100 ng/mL. As observed with rMSC(-) the non acetylated GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] had no significant effect. Finally, addition of SU5402 decreased the proliferative effects of the natural GAG, the mimetic [OTR₄₁₃₁], and the FGF-2 on rMSC(+).

Table 1 Phenotypic analysis of surface markers expressed by mesenchymal progenitor cells amplified without or with FGF-2.

Antigen	D0 (BMMC)	FGF2	P0 (CFU-F)	P1	P2
CD31	8% +/- 2	-	1.9% +/- 0.2	0.8% +/- 0.2	0% +/- 0
		+	2.2% +/- 0.2	0.7% +/- 0.2	0.3% +/- 0.1
CD45	59% +/- 8	-	18% +/- 2	22% +/- 2	7% +/- 3
		+	33% +/- 3	38% +/- 3	35% +/- 4
CD11b	55% +/- 4	-	23% +/- 3	18% +/- 3	10% +/- 2
		+	19% +/- 3	30% +/- 3	28% +/- 5
CD44	57% +/- 13	-	99% +/- 1	96% +/- 2	99% +/- 1
		+	98% +/- 1	98% +/- 1	98% +/- 1
CD54	18% +/- 2	-	99% +/- 1	99% +/- 1	99% +/- 1
		+	92% +/- 2	95% +/- 2	95% +/- 2
CD73	10% +/- 1	-	86% +/- 2	86% +/- 2	90% +/- 2
		+	69% +/- 2	65% +/- 2	72% +/- 2
CD90	34% +/- 4	-	81% +/- 2	81% +/- 2	94% +/- 2
		+	58% +/- 2	51% +/- 2	62% +/- 2

Flow cytometry analysis were performed on endothelial (CD31), hematopoietic (CD45, CD11b) and mesenchymal (CD44, CD54, CD73 and CD90) markers expressed on BMMC at day 0 (D0) and all along amplification step (passages P0, P1 and P2) of rMSC treated (+) or not (-) with FGF-2. Results were expressed as percentage of positive cells from populations, and correspond to the mean and SEM from N=4 independent experiments.

These results suggest that, whereas the sulfated compound [OTR₄₁₂₀] had no effect, the addition of acetyl groups to its counterpart [OTR₄₁₃₁] was able to significantly modify its ability to potentiate the growth of rMSC to a similar extent than HS or heparin. This effect may occur through interactions with HBP, including FGF-2, present at low concentration (in 2% FCS) or endogenously expressed by rMSC.

Effects of FGF-2 and GAG on rMSC migration

Chemoattractant potential of the two GAG mimetics was tested on rMSC(-) (Fig. 3A) and rMSC(+) (Fig. 3B) in an *in vitro* Boyden chambers migration model.

Basal migration levels of cells in control conditions (CT) were first analyzed in the absence of serum (FCS-0%) showing that rMSC(-) were less able to migrate as compared to rMSC(+). This suggests that FGF-2 long term treatment potentiate migration properties of rMSC. In the presence of FCS-2%, basal migration levels of cells (CT) were increased as compared to FCS-0%, and were roughly the same for rMSC(-) and rMSC(+), indicating that in the presence of serum, FGF-2 effect on rMSC migration is negligible. This was confirmed by the addition of SU5402 that induced only a slight decrease of migration in these CT conditions.

The effects of GAG mimetics were then analyzed in serum-free condition (FCS-0%). While acetylated [OTR₄₁₃₁] had low significant effects on the migration of rMSC(-) (Fig. 3A) and rMSC(+) (Fig. 3B), the sulfated compound [OTR₄₁₂₀] improved rMSC(-) migration by 3.6 fold at 100 ng/mL as compared to CT cells (Fig. 3A). This promoting effect was not significantly reduced by the addition of SU5402, suggesting that it could be due to interactions with HBP secreted by rMSC(-), other than FGF-2. Moreover this stimulatory effect of [OTR₄₁₂₀] on FGF-2 treated rMSC(+) was enhanced by 2.8 fold at 100 ng/mL as compared to CT cells (Fig. 3B) and partially inhibited by the addition of SU5402, indicating that [OTR₄₁₂₀] is able to interact at least with FGF-2, in addition to other HBP, to induce cell migration.

Then, migrations were analyzed in FCS-2% condition. Both GAG mimetics significantly induced rMSC(-) migration by 1.3

folds at 100 ng/mL compared to CT FCS-2% (Fig. 3A), whereas HS or heparin were less efficient at the same dose. The addition of GAG mimetics allowed to reach 45% of the migration level obtained with positive control performed in FCS-20%. This suggests that GAG mimetics interact with HBP, secreted by cells or present in FCS-2%, to chemoattract rMSC(-). The most significant migratory effect of the two GAG mimetics was revealed on rMSC(+) (Fig. 3B, 2- and 2.4-fold increases of cells/field). Under these conditions, GAG mimetics triggered cell migration to a similar extent than HS and heparin, corresponding to 75% of the migratory efficacy obtained with FCS-20%. These data indicate that FGF-2 long term treatment of rMSC(+) potentiates the stimulatory effect of GAG mimetics. Such result is relevant since SU5402 addition abrogates these migratory effects. This could be due to a direct interaction of the GAG mimetic with FGF-2/FGFR1 pathway or to the ability of the FGF-2 treatment to modify the profile of chemoattracting HBP secreted by rMSC(+).

Finally, we observed that the migratory effect of the acetylated compound [OTR₄₁₃₁] is only revealed in the presence of FCS-2%, independently of FGF-2 long term treatment. This suggests that acetyl groups in the sulfated compound are able to drive some specificity against particular chemokine(s) present in FCS.

In addition, double labeled Annexine+ / PI + apoptotic cells were analyzed by flow cytometry on each condition, and were less than 5% of total population (data not shown), suggesting that rMSC were not subjected to apoptosis in the migration medium even at low FCS concentrations. Moreover, this level of apoptotic cells remained the same regardless of the concentration of GAG mimetics used, highlighting that the migratory effects of GAG mimetics were not due to protective effects against apoptosis.

Effects of FGF-2 and GAG on rMSC differentiation

The potential of rMSC(-) and rMSC(+) to undergo differentiation was assessed by culturing cells in adipogenic and osteogenic induction media for 14 days. Adipogenic differentiation was evaluated by Oil Red O specific staining of cytoplasmic

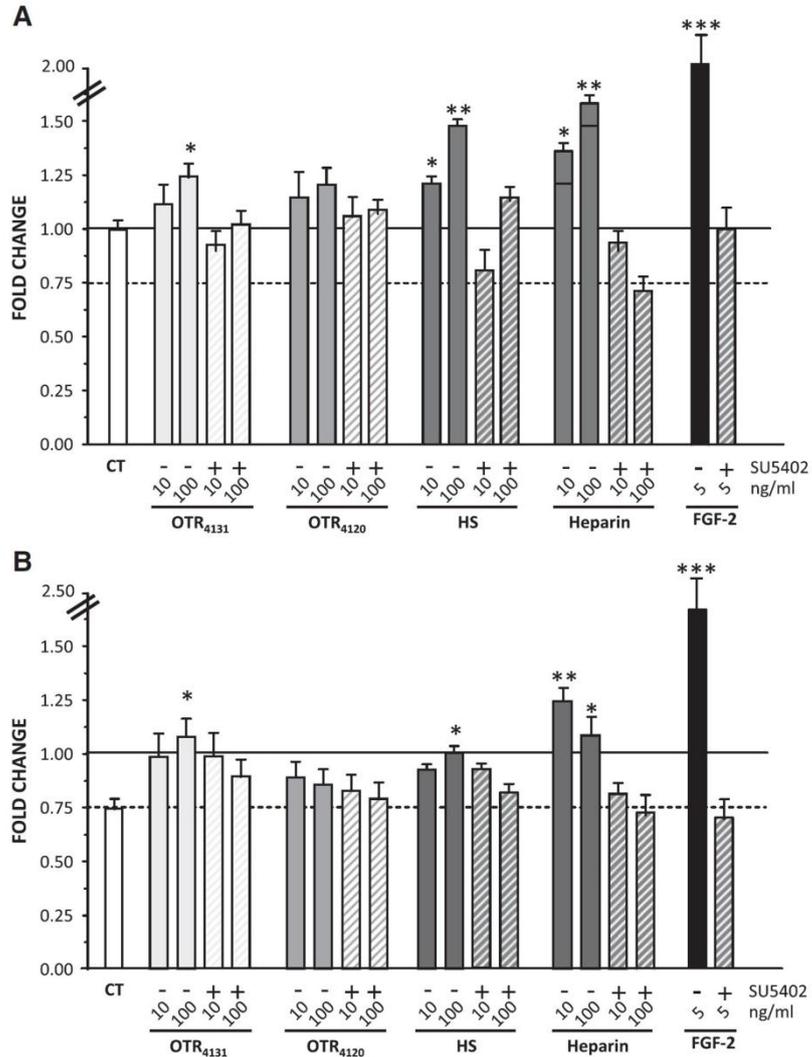


Figure 2 Effect of GAG, natural and mimetics, on rMSC proliferation. P2 rMSC, amplified without (rMSC(-) panel A) or with 5 ng/mL of FGF-2 (rMSC(+) panel B), were seeded at low density and treated with the indicated concentration of GAG mimetics [OTR₄₁₃₁], [OTR₄₁₂₀], HS, Heparin or FGF-2 in FCS-2% supplemented media, in the presence of chemical inhibitor SU5402 (10 μ M, hatched bar) for 3 days. Cell numeration was performed by MTT assay. The proliferation rates of each condition were expressed as fold changes as compared to control conditions (CT) from rMSC(-) (full line). Values are the mean and SEM calculated from triplicates in 3 independent experiments, ($n=9$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

lipidic droplets (Fig. 4A) and intracellular triglyceride accumulation quantification (Fig. 4B). Oil Red O staining were negative in control (CT) conditions in rMSC(-) and rMSC(+) (Arbitrary Unit (AU)=0), showing that FGF-2 treatment did not induce lipid droplet accumulation. Addition of GAG mimetics to CT conditions did not induce droplet accumulation either (data not shown). When rMSC were induced to differentiate in adipocytic medium (AD), staining intensities were significantly increased. This effect was amplified for rMSC(+) (AU=0.5) as compared to rMSC(-) (AU=0.2), suggesting that FGF-2 treatment of rMSC potentiated their adipogenic differentiation.

Furthermore, addition of GAG mimetics slightly decreased lipid triglyceride accumulation in rMSC induced to differentiate (Fig. 4A). However these decreases, measured by Oil Red O relative quantification, were not statistically significant (Fig. 4B). This suggests that sulfated GAG mimetics do not have significant effect on adipocytic differentiation of rMSC.

The effect of FGF-2 and/or GAG mimetics on osteogenic phenotype of rMSC(-) and rMSC(+) was then evaluated in a control medium (CT) and in osteogenic induction medium (OS) after 14 days of culture. Von Kossa staining was performed to visualize calcium deposit (Fig. 5A) and transcript levels of

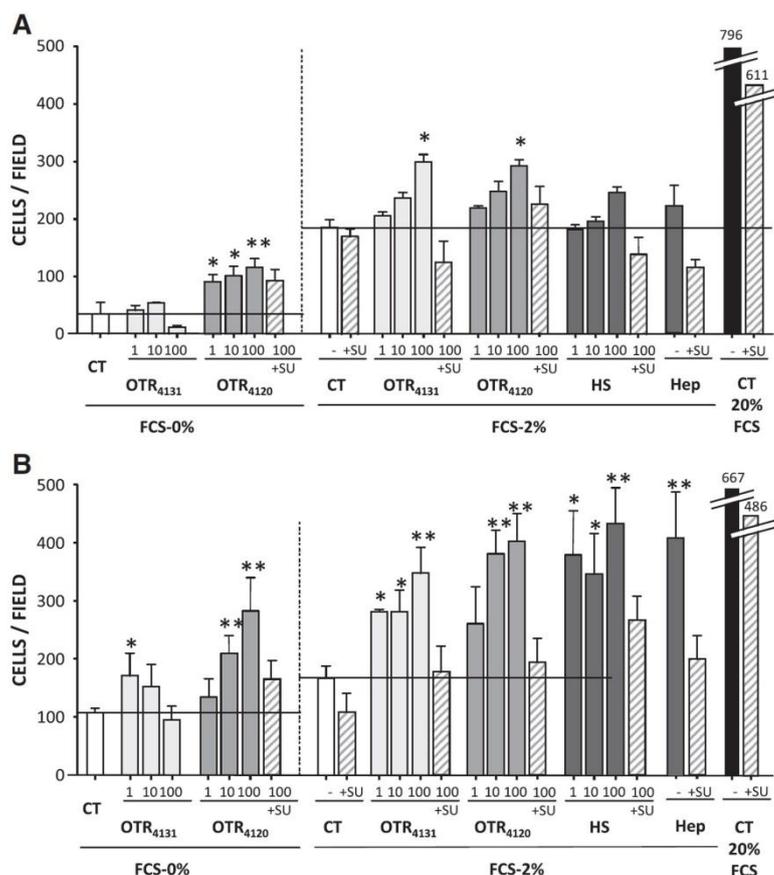


Figure 3 Effect of GAG, natural and mimetics, on rMSC migration capacity. After an overnight stimulation in migration medium (MM) with FCS-0% or FCS-2%, P2 rMSC(-) (panel A) and rMSC(+) (panel B), were seeded in upper Boyden chambers and exposed to indicated concentrations of GAG mimetics or HS, Heparin (100 ng/ml) or FCS-20%, in the presence of chemical inhibitor SU5402 (10 μ M, hatched bar), into lower chambers. Migrations were performed through transwell for 6 h and the migrated cells were MGG-stained and counted. Data represent the mean and SEM from 3 independent experiments with each condition in duplicate. In each MM, 0% or 2% FCS, effect of GAG was statistically compared to internal control (CT). ($n=6$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

the osteogenic genes, alkaline phosphatase ALP and RUNX2 transcription factor, were evaluated by qRT-PCR (Fig. 5B). First we analyzed the effect of FGF-2 long term treatment on the osteogenic phenotype: Von Kossa staining was stronger for rMSC(-) than for rMSC(+) in OS medium (Fig. 5A). This cytological observation was confirmed by gene expression analysis, since in CT condition, basal level of ALP and RUNX2 expression were clearly down-regulated in rMSC(+) as compared to rMSC(-). ALP and RUNX2 gene expression were induced significantly for rMSC(-) and rMSC(+) in OS conditions as compared to CT (Fig. 5B). These results suggest that FGF-2 treatment of rMSC inhibits basal levels of osteogenic gene expression in CT condition and subsequent matrix mineralization but does not inhibit transcriptional activation of osteoblastic genes. Next, we analyzed the effect of GAG mimetics on osteogenic differentiation of rMSC. We did not observe any modification of Von Kossa staining when the molecules were added to OS medium (data not shown). However their addition to CT medium induced a

positive Von Kossa staining of rMSC(-) and rMSC(+) (Fig. 5A). These observations were confirmed by induction of osteogenic gene expression levels (Fig. 5B): in CT condition, addition of [OTR₄₁₂₀] significantly induced expression of ALP (1.7 fold for rMSC(-), 1.6 fold for rMSC(+)) and RUNX2 (1.5 fold for rMSC(-), 1.9 fold for rMSC(+)). These data suggest that in the absence of osteoinductive factors, GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] was able to induce mineralization and to initiate the osteogenic transcription program of rMSC. In OS condition, addition of the mimetics did not induce significant changes in ALP and RUNX2 levels of expression in rMSC(-) and rMSC(+) cells, probably because these OS conditions overload the GAG mimetics effects. Finally, even if [OTR₄₁₃₁] also seems to potentiate mineralization and osteoblastic gene expression, this is only significant for RUNX2 on rMSC(+), suggesting that, as observed for migration properties, the modulatory effects of this acetylated GAG mimetic are more restricted to specific HBP present in the media. These results indicate that FGF-2 long term

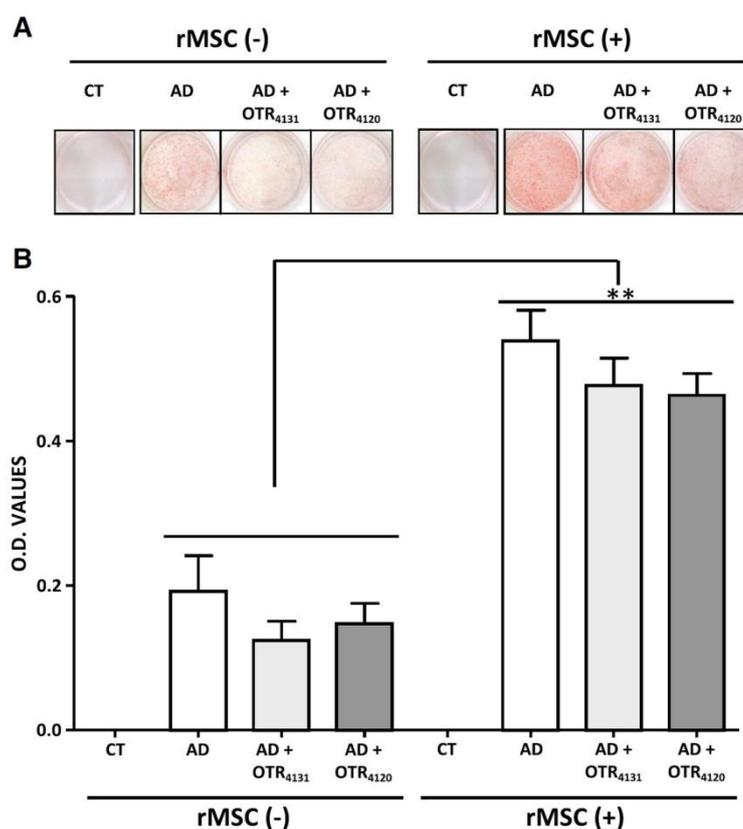


Figure 4 Effect of GAG mimetics on rMSC adipogenic differentiation. P2 rMSC(-) and rMSC(+) were differentiated in adipocytic induction medium (AD) and compared to control medium (CT), without or with the mimetics [OTR₄₁₂₀] and [OTR₄₁₃₁] (100 ng/mL) for 14 days. (A) Cytological Oil Red O staining of lipid vesicles was performed at Day 14. (B) Intracellular triglyceride contents were quantified after direct extraction by DMSO, relatively to absorbances at 510 nm. Backgrounds from CT samples were deduced. Values expressed in arbitrary units (AU) are the mean and SEM calculated from 3 independent experiments with each condition tested in triplicates ($n=9$, $**p<0.01$).

treatment is inhibitory for osteogenic phenotype of rMSC whereas GAG mimetics can differently potentiate this phenotype according to specific structural features.

Discussion

Bone marrow MSC are currently exploited in clinical trials as a promising cell therapeutic tool to repair damaged tissues. During regenerative processes, the properties of MSC are regulated through complex interactions between HBP and GAG harboring fine specific chemical structures (Cool and Nurcombe, 2005; Jackson et al., 2006). In the past few years, structural and functional analogs of GAG were developed and demonstrated to display regenerative properties as illustrated in animal model of bone repair (Lafont et al., 2004). Here, we studied the effect of two structurally different GAG mimetics, equally sulfated and bearing or not acetyl groups, on the properties of MSC. We hypothesize that GAG mimetics can represent potential therapeutic alternatives to treatments with exogenous growth factors, since they can modulate endogenous growth factor activities. The *in*

vitro effects of these GAG mimetics, with or without continuous treatment with FGF-2, were studied on rMSC obtained after purification, amplification and functional characterization.

Effects of FGF-2 treatment on MSC clonogenicity and differentiations

In vitro studies have demonstrated the complexity of FGF-2 effects on osteoblastic cells in culture, since exogenous treatments modulate positively or negatively both growth and differentiation through separate pathways, each of which requiring spatially and temporally controlled concentrations (Noff et al., 1989; Raucci et al., 2008; Quarto and Longaker, 2008).

We demonstrate for the first time that the presence of FGF-2 (5 ng/mL) at day 0 on rat MSC cultures from BMMC decreases the CFE of these cells. Phenotypic characterization of the rMSC(-) and rMSC(+) populations suggest that in the presence of FGF-2, some hematopoietic contaminating cells remained despite homogeneous morphology and clear expression of mesenchymal markers. In previous works, FGF-2

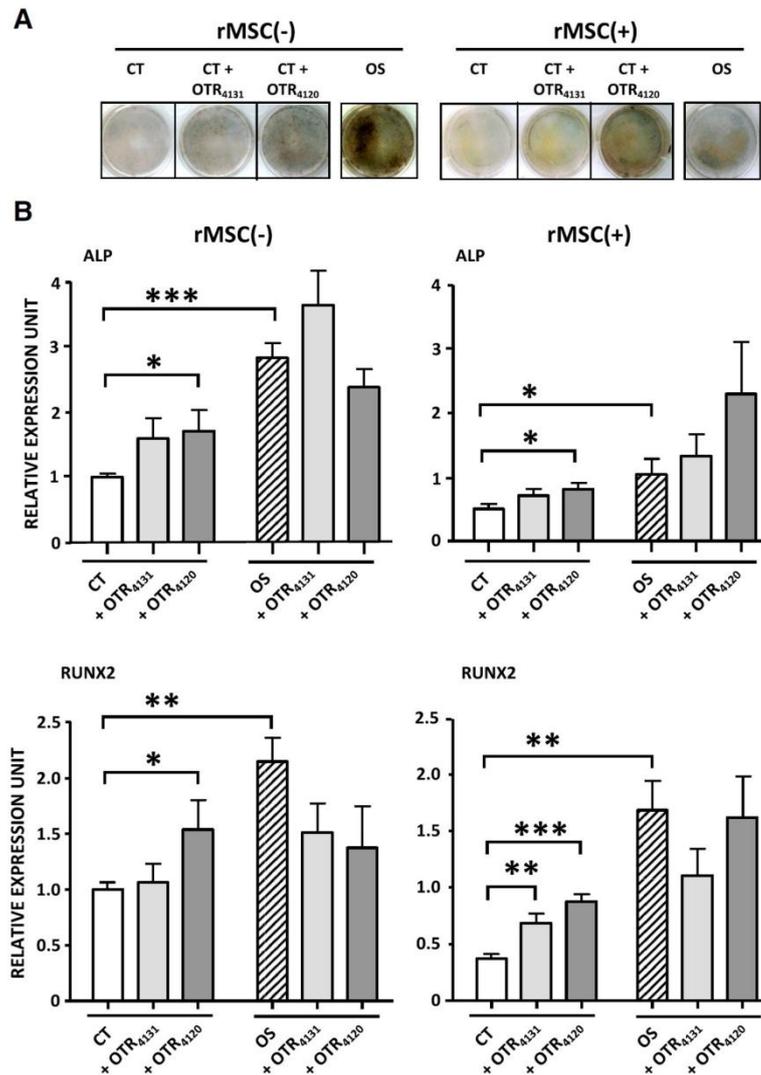


Figure 5 Effect of GAG mimetics on rMSC osteogenic differentiation. P2 rMSC(-) and rMSC(+) were differentiated in osteogenic induction medium (OS) and compared to control basal medium (CT), without or with the mimetics [OTR₄₁₂₀] and [OTR₄₁₃₁] (100 ng/mL). (A) Cytological Von Kossa staining of calcium deposits was performed at Day 14. (B) Phosphatase alkaline (ALP) and transcription factor (RUNX2) expression levels were analyzed by quantitative PCR. Values are the mean and SEM calculated from 3 independent experiments with each condition tested in triplicates ($n=9$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

effect was tested on clonogenicity in a specific culture medium, to stimulate rapidly the capacity of the cells to produce mineralized bone like tissue. However, no effect of FGF-2 was observed, may be because the culture medium used allowed the rapid selection of mesenchymal osteoprogenitor cells, limiting the possibility of hematopoietic cell amplification (Kotev-Emeth et al., 2000; Pitaru et al., 1993). Our present result clearly indicates that, even if FGF-2 mitogenic activity is of interest for MSC expansion, it must not be added from the beginning of cultures in basal media, to avoid limited efficiency of MSC colony formation and presence of contaminating cells.

Moreover, our results show that long term treatment with FGF-2 inhibits not only MSC clonogenicity but also calcium deposition and osteogenic marker expression. Previous works have described that FGF-2 regulatory activity on proliferation and osteoblastic differentiation are tightly linked. In these studies, exogenous FGF-2 up to 3 ng/mL, applied during rat calvaria osteoblast or MSC growth phase only, was shown to improve their growth and subsequent mineralization (Pitaru et al., 1993; Hanada et al., 1997; Ling et al., 2006). However these processes were inhibited at 10 ng/mL of FGF-2 (Noff et al., 1989). Short term exposure of MSC to FGF-2, followed by

treatment with BMP-2, improved their osteogenic differentiation (Hanada et al., 1997; Martin et al., 1997), whereas long term exposure clearly inhibited maturity and mineralization, (Chaudhary et al., 2004; Dombrowski et al., 2009). In accordance with these reports, we confirm that a long term treatment at dose 5 ng/mL is deleterious for proliferation of rat MSC and mineralization during osteogenic differentiation.

Osteoblasts and adipocytes are both derived from mesenchymal marrow progenitors, according to lineage specific differentiation, tightly controlled by intracellular signals and extracellular factors. Among these, FGF-2 effect on adipocytic differentiation is controversial. Indeed *in vitro* studies have suggested both pro- or anti-adipogenic effects of FGF-2 after treatment of different cells lines or MSC cultures (Neubauer et al., 2004; Navre and Ringold, 1989). However, recent *in vivo* data obtained on *fgf-2* null mice clearly support an anti-adipogenic effect of FGF-2 in bone, since these mice present an increase of bone marrow fat as well as induction of adipogenic differentiation pathway associated to inhibition of osteoformation (Xiao et al., 2010). On the contrary, our *in vitro* results indicate that sustained treatment with FGF-2 is necessary to optimize vesicle droplets formation whereas it inhibits mineralization. This apparent discrepancy points out differences classically observed between *in vitro* data from exogenous treatment as compared to *in vivo* endogenous growth factor roles analysis. Such discrepancy could be explained by availability of ECM compounds such as GAG, which regulate growth factors *in vivo*. Moreover, these data underline that, as previously described for osteogenic differentiation, kinetics and doses of FGF-2 are also important for adipogenic differentiation. Modulation of FGF-2 signaling by matrix components such as GAG, may be a key element in determining the choice of MSC to proliferate or to differentiate through adipogenic or osteogenic pathway.

Chemically different GAG mimetics have distinct effects on clonogenicity and growth properties of rMSC

Although ubiquitous, GAG are characterized by their extensive structural diversity based on the number and location of sulfated groups (Merry and Gallagher, 2002; Handel et al., 2005). The biological relevance of such sulfation patterns of HS was demonstrated for their specific binding of hematopoietic growth factor in the stromal bone marrow niche (Gordon et al., 1987). These variable sulfation patterns are crucial during bone development and regeneration because of their abilities to interact with growth factors and morphogens, such as FGF-2 and BMP, and then to modulate cell proliferation and differentiation (Ling et al., 2006; Habuchi et al., 2004). To date, other structural features of GAG, such as the presence of partially acetylated regions, have been considered of less biological relevance. However, we recently demonstrated that whereas the two equally sulfated GAG mimetics [OTR₄₁₃₁] and [OTR₄₁₂₀] are able to mobilize hematopoietic progenitors *in vivo*, only the acetylated one [OTR₄₁₃₁], is able to mobilize a specific more immature population of hematopoietic stem cells (HSC) (Albanese et al., 2009). Given the relevance of the chemical structure of GAG on their biological activities on stem cells, we tested the effect of [OTR₄₁₃₁] and [OTR₄₁₂₀], on MSC.

Our first results indicate that the treatment of BMMC with GAG mimetics during the first step of rMSC cultures can induce an increase of CFE, which is of interest for optimizing the preparation of stem cell based therapeutic products. However, this effect is variable according to biological samples, suggesting that adhesive mechanisms in which mimetics are involved in this clonogenic effect need to be clarified. Moreover the participation of some contaminating cells in these cultures should be addressed.

Concerning growth properties, we observed that only the acetylated product [OTR₄₁₃₁] significantly potentiates the growth of rMSC through FGF-2/FGFR1 pathway. Our data points out the importance of the hydrophobic regions on the modulation of HBP proliferative activities. This is a new information since the most extensively studied aspect of GAG structures and activities mainly focuses on the content and positions of their sulfate moieties, as illustrated by the involvement of HS 6-O- sulfation for the binding to FGF-2 and its FGF-R dimerization (Turnbull et al., 1992; Pye et al., 1998). Our results suggest that the acetyl group involvement in the HS/FGF/FGFR complex formation and its mitogenic signaling effect should be studied in greater detail.

Chemically different GAG mimetics have distinct effects on migration properties of rMSC

The acetyl groups are characteristic of chondroitin sulfates (CS) and of poorly sulfated HS sequences (NA/NS sequences). It was demonstrated that during the latter phases of osteogenesis, bone ECM undergoes change in its predominant proteoglycan species from HS proteoglycan (HSPG) to CS proteoglycan (CSPG). The latter are primarily secreted to create stable tissue forms as they bind calcium, mineralize and maintain tissue hydration. The growth-promoting effects of the HSPG thus give way to the increasing need for the structural integrity of adult bone tissue that is supported by the CSPG (Cool and Nurcombe, 2005; Nurcombe et al., 2007). We hypothesize that participation of such kinds of CS in the medullar niche has been underestimated as they could also be involved in progenitors and stem cell recruitment during homeostasis and regenerative process.

Here, we validate the relevance of acetyl groups on migration properties under specific conditions. We demonstrate for the first time that both sulfated GAG mimetics are able to potentiate the migration capacity of MSC, probably through their ability to modulate chemo-attractant molecules, such as FGF-2, expressed by rMSC or present in serum, with different specificity according to the presence or not of acetyl groups. In Contrast to hematopoietic stem cells, the chemo-attraction process of MSC does not rely on a specific couple of chemokines/receptor such as SDF-1/CXCR-4 but rather on a wide range of poorly understood signals (Ponte et al., 2007; Stich et al., 2008). Few studies have currently identified specific chemokines involved in MSC migration and no data are available demonstrating synergistic migratory effects of natural GAG. Such migratory properties were hypothesized for GAG mimetics to explain regenerative properties of RGTA11 (without acetyl groups) during cranial calvaria suture closure, through osteoblastic progenitors recruitment from dura mater (Lafont et al., 2004). In addition, we previously demonstrated that GAG mimetics induced

mobilization of hematopoietic progenitors involved interactions with SDF-1 (Albanese et al., 2009). Moreover, it was demonstrated that while HS sulfation is a foremost requirement, acetylation of saccharides of constant charge density increases the binding of chemokines (Schenauer et al., 2007). This supports our hypothesis asserting that, because of its acetyl groups [OTR₄₁₃₁] has more affinity than [OTR₄₁₂₀] for chemo-attractant factors that remain to be identified. Altogether, our results suggest that regenerative effect of GAG mimetics could also be explained by their ability to induce migration of circulating or resident stem cells on the injury site.

Sulfated [OTR₄₁₂₀] GAG mimetic is able to potentiate osteogenic differentiation of rMSC

In a previous study, we have demonstrated that a GAG mimetic, named RGTA11, was able to potentiate proliferation of osteoblastic cells *in vitro*, and to accelerate bone regenerative closure in a rat model of calvaria defect (Blanquaert et al., 1995). It was hypothesized that such molecules would have been able to create a matrix microenvironment suitable to induce migration of osteoblastic progenitor cells from dura mater proximal region. In this work, our results strengthen this hypothesis since we show that sulfated [OTR₄₁₂₀] GAG mimetic supports both chemo-attraction and osteogenic differentiation. Interestingly, this molecule does not have significant proliferative activity. [OTR₄₁₂₀] was able to initiate osteogenic transcription program of rMSC, in the absence of osteoinductive factors, and to induce mineralization despite the inhibitory effect of FGF-2. The signal effectors responsible for this mimetic induced differentiating effect need to be identified, as was done for natural HS. HS potentiated proliferation and osteogenic differentiation of rMSC, such as bone nodule formation and mineralization, through their ability to enhance endogenous FGF-2/FGFR1 signaling and to promote the expression of FGFR1 (Dombrowski et al., 2009). HS are also required for BMP signaling supporting the idea that HS orchestrate the transition between proliferation and differentiation (Khan et al., 2008). However, HS saccharides can also have an inhibitory effect on the activity of osteoinductive factors. Indeed, enzymatic depletion of HS and CS from MSC cell surface liberated and increased the biological activity of BMP2, bone nodule formation, calcium accumulation and osteoblast marker expressions (Manton et al., 2007). HS may be able to induce such a shift between proliferation and differentiation by increasing RUNX2, which supports previous findings showing the importance of stage-specific HS patterns in controlling cell phenotype (Jackson et al., 2007). It would be then of interest to analyze the ability of GAG mimetics to enhance osteogenic factor activity, through osteoblast-specific transcription factors such as RUNX2.

In summary, a growing number of studies suggest that during their growth phase, MSC establish an appropriate microenvironment, in which GAG contribute to the optimization of the subsequent differentiation process through their specific interactions with HBP (Bi et al., 2006; Nurcombe et al., 2007). Our results suggest that GAG mimetics modulate clonogenicity, proliferation, migration and/or osteogenic differentiation properties of MSC, with structural implications of sulfate and acetyl groups. We propose that

a synthetic GAG library with distinct lengths, charges and conformations would allow the screening of optimal GAG structures, with unique regulating activity according to a specific partner. Application of this chemical design strategy in regenerative medicine is in accordance with innovative tissue engineering approaches, which focus on the *in situ* recruitment of stem and progenitor cells to the defective sites and their subsequent use for guided tissue repair. Therefore, GAG mimetics would be of great interest as an alternative to exogenous growth factor treatments: in addition to constitute matrix scaffolds for a proper cell environment, GAG mimetics are able to potentiate promising therapeutic product based on adult stem cells.

Materials and methods

Materials

The GAG mimetics [OTR₄₁₂₀] and [OTR₄₁₃₁] were obtained from OTR3 Inc. (Paris, France). These sulfated polysaccharide derivatives of dextran T40 are composed of about 2500 glucosidic units linked by α 1-6 bonds (Papy-Garcia et al., 2005). They present the same degrees of substitution for carboxymethyl and sulfate residues as heparan sulfate (HS), and differ only by the presence of acetyl groups in the [OTR₄₁₃₁] derivative. Heparin and HS used as natural GAG control were cell culture grade. Heparin was extracted from porcine intestinal mucosa (Sigma-Aldrich, H9399 lot 125K1400). HS was extracted from bovine kidney (Sigma-Aldrich, H7640 lot 068K7002). Recombinant human FGF-2 was prepared as described (Courty et al., 1991). The chemical inhibitor SU5402 was purchased from Calbiochem, used at 10 μ M final concentration, and its vehicle DMSO was diluted 1:1000 for the control.

Rat mesenchymal stem cell isolation, clonogenicity and culture

rMSC were prepared from both femora and tibiae of male Wistar rats (7 weeks old, avg weight 220 g, Janvier, France) as previously described (Rochefort et al., 2006). Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC) were seeded at the density of 5×10^5 cells/cm², in complete medium (CM) comprising α MEM, (Invitrogen), 20% fetal calf serum (FCS) (PAA Laboratories, Austria), 1% antibiotic/antimycotic (ATB/ATM) solution (PAA) at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified chamber. After 2 days, cultures were washed with PBS to remove non-adherent hematopoietic cells and the medium changed. Cells were fed every 2–3 days until day 10, when colonies formed of more than 50 fibroblastic adherent cells, characteristic of Colony Forming Unit-Fibroblastic (CFU-F), were scored after May-Grünwald Giemsa (MGG) staining. The Colony Forming Efficiency (CFE) was calculated as the number of CFU-F per 10⁶ BMMC seeded (Passage 0). Then amplification steps were performed until sub-confluency, from CFU-F obtained in CM supplemented or not with FGF-2 (5 ng/mL): cells named rMSC(+) or rMSC(-) respectively were trypsinized, seeded at 10⁴ cells/cm² density and passaged in CM(+) or CM(-). Media were changed twice a week.

Flow cytometry analysis

Cells were trypsinized, washed in PBS 1x, blocked in PBS 1x with 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and stained with mouse anti rat monoclonal antibodies (Ab) directed against CD31, CD44 CD45, CD54, CD90 (Abd Serotec, Düsseldorf, Germany) and CD73 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), as described [28]. Secondary labeling was performed with a FluoProbes 488 donkey anti mouse IgG (Interchim, France). Cells stained with irrelevant isotype Ab (Abd Serotec) were analyzed in parallel as negative controls. Cell labeling was analyzed on 10 000 events at least with a MACS Quant cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Proliferation assay

Passage 2 rMSC(-) and rMSC(+) cells were seeded in 24-well culture plates at the density of 10^3 cells/well and allowed to adhere overnight. Cells were then washed and treated with varying concentration of GAG or FGF-2 or chemical inhibitor in medium containing 2% FCS (CT). After 72 h, the total number of viable cells was estimated with the colorimetric MTT cell viability assay, as compared to a standard curve, according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich).

Cellular migration in Boyden's chamber assay

Migration assays were performed in 24-well micro-chemotaxis chambers (Corning Costar, USA) using polycarbonate membranes with 8- μ m pores as described previously (Ponte et al., 2007; Rochefort et al., 2006). Briefly, 250×10^3 P2 rMSC(+) and rMSC(-) cells were harvested in 0.1 mL of migration medium (MM) composed of RPMI 1640 (Invitrogen), 0.25% BSA (Fraction V, Sigma-Aldrich), FCS 0% or FCS 2%, then seeded in the top chamber. The bottom chamber unit contained 0.6 mL of MM supplemented or not with varying concentrations of GAGs. MM without any factor or supplemented with 20% FCS were used as negative or positive controls respectively. The plates were incubated for 6 h at 37 °C. Then, all membranes were MGG-stained, mounted and photographed. Quantitation of migrated cells through filter was estimated on 3 separate areas.

In vitro adipogenic and osteogenic differentiation assays

Adipogenic and osteoblastic differentiations were initiated in 6-well culture on P2 rMSC(-) and rMSC(+) populations respectively at 90% and 60% confluency. Adipogenic medium was α MEM supplemented with 10% FCS, 100 μ M isobutyl methylxanthine, 60 μ M indomethacin, 1 μ g/mL insulin and 0.5 μ M hydrocortisone. Osteogenic medium was α MEM supplemented with 20% FCS, 0.1 μ M dexamethasone, 2 mM β -glycerophosphate and 150 μ M ascorbic acid. All reagents were supplied by Sigma-Aldrich. Corresponding control of rMSC(-) and rMSC(+) were cultured with CM. All media, supplemented or not with GAG mimetics, were changed twice a week for 2 weeks. Oil Red-O staining was performed to reveal the intracellular triglyceride accumulation, which were extracted by DMSO treatment (250 μ L per well).

Thereafter absorbance was measured at 510 nm and OD values were used as arbitrary units (AU) to perform relative quantification of differentiation level as compared to CT cells. Von Kossa staining was performed to reveal calcium deposit with silver nitrate solution 2% (w/v) (Sigma-Aldrich) under a 60 watt light bulb for 1 h. The unreacted silver salt was removed with sodium thiosulfate 2.5% (w/v) (Sigma-Aldrich).

RNA extraction, reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction

RNA was extracted with TRIzol® reagent (Invitrogen, France), DNase treatment was performed with a DNA-free Kit (Applied Biosystems/Ambion, USA) and cDNA were synthesized by Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Primers were designed by Primer3output software (Rozen and Skaletsky, 2000), and obtained by Eurofins MWG (Germany). The following specific oligonucleotide primers were used: GlycerAldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH, NM_017008, forward 5'-TGC CAC TCA GAA GAC TGT GG-3', reverse 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3'), Tubulin alpha 1A (Tub1A, NM_022298.1, forward 5'-GCA CTC TGA TTG TGC CTT CA-3', reverse 5'-GAG GGA AGC AGT GAT GGA AG-3'), runt-related transcription factor 2 (RUNX2, NM_053470, forward 5'-GCC GGG AAT GAT GAG AAC TA-3', reverse 5'-GGA CCG TCC ACT GTC ACT TT-3'), and alkaline phosphatase (ALP, NM_013059, forward 5'-GAC AAG AAG CCC TTC ACA GC-3', reverse 5'-CTG GGC CTG GTA GTT GTT GT-3'). For the real-time PCR, the amplifications were performed on the LightCycler (Software version 3.5;) LightCycler FastSart DNA Master SYBR Green I (Roche, Switzerland) following the manufacturer's procedure. All samples were amplified simultaneously in one assay run. Cycling conditions included one cycle of 8 min at 94 °C followed by 48 cycles consisting of denaturation for 15 s at 94 °C, annealing for 25 s at respective T_m (65 °C for GAPDH, Tub1A and RUNX2; 68 °C for ALP) and elongation for 30 s at 72 °C, in 2 mM MgCl₂. After the final cycle the melting curve was started for 10 s at 95 °C, 30 s at 65 °C and then temperature was raised to 95 °C (0.1 °C/s). Relative quantification of gene expression was performed using the comparative CT method, also referred to as the $\Delta\Delta C_T$ method. Two reference genes, GAPDH and Tub1A were used as an endogenous control. The normalization of these genes was accomplished with the geNorm program (Vandesompele et al., 2002).

Statistical analysis

Results were expressed as mean of values \pm standard error mean (SEM) from at least three independent experiments with triplicate values per condition. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test (unpaired two-tailed).

Acknowledgments

This work was supported by Region Ile-de-France doctoral fellowship for Dr. G. Frescaline. We thank Dr. F. Siñeriz and Pr. D. Barritault from OTR3 Inc. (Paris, France) for kindly providing GAG mimetic molecules. We thank Pr. L. Garriguet-Antar and Pr. I. Martelly for helpful readings of the manuscript.

References

- Albanese, P., Caruelle, D., Frescaline, G., Delbe, J., Petit-Cocault, L., Huet, E., Charnaux, N., Uzan, G., Papy-Garcia, D., Courty, J., 2009. Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights. *Exp. Hematol.* 37, 1072–1083.
- Bi, Y., Nielsen, K.L., Kilts, T.M., Yoon, A., A.K. M., Wimer, H.F., Greenfield, E.M., Heegaard, A.M., Young, M.F., 2006. Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* 38, 778–786.
- Blanquaert, F., Saffar, J.L., Colombier, M.L., Carpentier, G., Barritault, D., Caruelle, J.P., 1995. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 17, 499–506.
- Blanquaert, F., Barritault, D., Caruelle, J.P., 1999. Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 63–72.
- Chaudhary, L.R., Hofmeister, A.M., Hruska, K.A., 2004. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 34, 402–411.
- Colombier, M.L., Lafont, J., Blanquaert, F., Caruelle, J.P., Barritault, D., Saffar, J.L., 1999. A single low dose of RGTA, a new healing agent, hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cells Tissues Organs* 164, 131–140.
- Cool, S.M., Nurcombe, V., 2005. The osteoblast-heparan sulfate axis: control of the bone cell lineage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1739–1745.
- Courty, J., Dauchel, M.C., Caruelle, D., Perderiset, M., Barritault, D., 1991. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 145–151.
- Desgranges, P., Barritault, D., Caruelle, J.P., Tardieu, M., 1997. Transmural endothelialization of vascular prostheses is regulated in vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and heparan-like molecule. *Int. J. Artif. Organs* 20, 589–598.
- Dombrowski, C., Song, S.J., Chuan, P., Lim, X., Susanto, E., Sawyer, A.A., Woodruff, M.A., Huttmacher, D.W., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2009. Heparan sulfate mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 18, 661–670.
- Escartin, Q., Lallam-Laroye, C., Baroukh, B., Morvan, F.O., Caruelle, J.P., Godeau, G., Barritault, D., Saffar, J.L., 2003. A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J.* 17, 644–651.
- Friedl, A., Chang, Z., Tierney, A., Rapraeger, A.C., 1997. Differential binding of fibroblast growth factor-2 and -7 to basement membrane heparan sulfate: comparison of normal and abnormal human tissues. *Am. J. Pathol.* 150, 1443–1455.
- Gallagher, J.T., 2006. Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 438–441.
- Garcia-Filipe, S., Barbier-Chassefiere, V., Alexakis, C., Huet, E., Ledoux, D., Kerros, M.E., Petit, E., Barritault, D., Caruelle, J.P., Kern, P., 2007. RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, is a possible long-term active agent to heal burned skin. *J. Biomed. Mater. Res.* 80, 75–84.
- Goodger, S.J., Robinson, C.J., Murphy, K.J., Gasiunas, N., Harmer, N.J., Blundell, T.L., Pye, D.A., Gallagher, J.T., 2008. Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 283, 13001–13008.
- Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M., Greaves, M.F., 1987. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326, 403–405.
- Guimond, S.E., Turnbull, J.E., 1999. Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. *Curr. Biol.* 9, 1343–1346.
- Habuchi, H., Habuchi, O., Kimata, K., 2004. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj. J.* 21, 47–52.
- Hanada, K., Dennis, J.E., Caplan, A.I., 1997. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1606–1614.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Proudfoot, A.E., 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 385–410.
- Jackson, R.A., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2006. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of osteogenesis. *Gene* 379, 79–91.
- Jackson, R.A., Murali, S., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2007. Heparan sulfate regulates the anabolic activity of MC3T3-E1 preosteoblast cells by induction of Runx2. *J. Cell. Physiol.* 210, 38–50.
- Khan, S.A., Nelson, M.S., Pan, C., Gaffney, P.M., Gupta, P., 2008. Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity. *Am. J. Physiol.* 294, C1387–C1397.
- Kotev-Emeth, S., Savion, N., Pri-chen, S., Pitaru, S., 2000. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. *Bone* 27, 777–783.
- Lafont, J., Baroukh, B., Berdal, A., Colombier, M.L., Barritault, D., Caruelle, J.P., Saffar, J.L., 1998. RGTA11, a new healing agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats. *Growth Factors* 16, 23–38.
- Lafont, J., Blanquaert, F., Colombier, M.L., Barritault, D., Caruelle, J.P., Saffar, J.L., 2004. Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif. Tissue Int.* 75, 517–525.
- Ling, L., Murali, S., Dombrowski, C., Haupt, L.M., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2006. Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 209, 811–825.
- Manton, K.J., Leong, D.F., Cool, S.M., Nurcombe, V., 2007. Disruption of heparan and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathways. *Stem Cells* 25, 2845–2854.
- Martin, I., Muraglia, A., Campanile, G., Cancedda, R., Quarto, R., 1997. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 138, 4456–4462.
- Meddahi, A., Lemdjabar, H., Caruelle, J.P., Barritault, D., Homebeck, W., 1996. FGF protection and inhibition of human neutrophil elastase by carboxymethyl benzylamide sulfonate dextran derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 141–145.
- Meddahi, A., Bree, F., Papy-Garcia, D., Gautron, J., Barritault, D., Caruelle, J.P., 2002. Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 525–531.
- Merry, C.L., Gallagher, J.T., 2002. New insights into heparan sulphate biosynthesis from the study of mutant mice. *Biochem. Soc. Symp.* 47–57.
- Molteni, A., Modrowski, D., Hott, M., Marie, P.J., 1999. Alterations of matrix- and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. *Cell Tissue Res.* 295, 523–536.
- Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J.D., Hurley, M.M., 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.* 105, 1085–1093.
- Muller, B., Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Gotting, C., 2008. Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.* 27, 139–149.
- Navre, M., Ringold, G.M., 1989. Differential effects of fibroblast growth factor and tumor promoters on the initiation and maintenance of adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 109, 1857–1863.

- Neubauer, M., Fischbach, C., Bauer-Kreisel, P., Lieb, E., Hacker, M., Tessmar, J., Schulz, M.B., Goepferich, A., Blunk, T., 2004. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 577, 277–283.
- Noff, D., Pitaru, S., Savion, N., 1989. Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bone-like nodules in vitro. *FEBS Lett.* 250, 619–621.
- Nurcombe, V., Goh, F.J., Haupt, L.M., Murali, S., Cool, S.M., 2007. Temporal and functional changes in glycosaminoglycan expression during osteogenesis. *J. Mol. Histol.* 38, 469–481.
- Ostrovsky, O., Berman, B., Gallagher, J., Mulloy, B., Fernig, D.G., Delehedde, M., Ron, D., 2002. Differential effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 2444–2453.
- Papy-Garcia, D., Barbier-Chassefiere, V., Rouet, V., Kerros, M., Klochendler, C., Tournaire, M., Barritault, D., Caruelle, J., Petit, E., 2005. Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. *Macromolecules* 38, 4647–4654.
- Pitaru, S., Kotev-Emeth, S., Noff, D., Kaffuler, S., Savion, N., 1993. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J. Bone Miner. Res.* 8, 919–929.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., Domenech, J., 2007. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737–1745.
- Pye, D.A., Vives, R.R., Turnbull, J.E., Hyde, P., Gallagher, J.T., 1998. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 273, 22936–22942.
- Quarto, N., Longaker, M.T., 2008. Differential expression of specific FGF ligands and receptor isoforms during osteogenic differentiation of mouse Adipose-derived Stem Cells (mASCs) recapitulates the in vivo osteogenic pattern. *Gene* 424, 130–140.
- Raucci, A., Bellosta, P., Grassi, R., Basilico, C., Mansukhani, A., 2008. Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 215, 442–451.
- Rocheffort, G.Y., Delorme, B., Lopez, A., Herault, O., Bonnet, P., Charbord, P., Eder, V., Domenech, J., 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24, 2202–2208.
- Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Caruelle, J.P., Courty, J., 2005. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 32792–32800.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Schenauer, M.R., Yu, Y., Sweeney, M.D., Leary, J.A., 2007. CCR2 chemokines bind selectively to acetylated heparan sulfate octasaccharides. *J. Biol. Chem.* 282, 25182–25188.
- Stich, S., Loch, A., Leinase, I., Neumann, K., Kaps, C., Sittlinger, M., Ringe, J., 2008. Human periosteum-derived progenitor cells express distinct chemokine receptors and migrate upon stimulation with CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, and CXCL13. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 365–376.
- Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Ke, Y., Wilkinson, M.C., Gallagher, J.T., 1992. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 267, 10337–10341.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (RESEARCH0034).
- Xiao, L., Sobue, T., Eslinger, A., Kronenberg, M.S., Coffin, J.D., Doetschman, T., Hurley, M.M., 2010. Disruption of the *Fgf2* gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. *Bone* 47, 360–370.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell based scaffolds modulate osteoblastic/osteoclastic balance and angiogenesis in vivo.

Guilhem Frescaline ^{a,b}, Thibault Boudierlique ^{a,b}, Leyya Mansoor ^{a,b}, Gilles Carpentier ^{a,b}, Brigitte Baroukh ^c, Fernando Sineriz ^d, Marina Trouillas ^e, Jean Louis Saffar ^c, José Courty ^{a,b}, Jean-Jacques Lataillade ^e, Dulce Papy-Garcia ^{a,b}, Patricia Albanese ^{a,b,*}

^a Faculté des Sciences et Technologie, Université Paris Est Créteil, 94010, Créteil, France

^b Laboratoire CRRET, EAC CNRS 7149, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France

^c Laboratoire Pathologies et Biothérapies de l'Organe Dentaire, EA2496, Université Paris Descartes, 92210, Montrouge, France

^d OTR3 SAS, 75001 Paris, France

^e Centre de thérapie des brûlures graves, Hôpital d'instruction des armées Percy, 92141, Clamart, France

* **Corresponding author:** Patricia Albanese, Laboratoire CRRET, EAC CNRS 7149, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France. Tel: +33 1 45 17 14 05; fax: +33 1 45 17 18 16.

E-mail address: albanese@u-pec.fr

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Tissue engineering approaches to stimulate bone regeneration currently combines bioactive scaffolds with osteocompetent human mesenchymal stem cells (hMSC). Moreover, osteogenic and angiogenic factors are required to promote differentiation and survival of hMSC through improved vascularization in the damaged extracellular matrix (ECM). Glycosaminoglycans (GAG) are ECM compounds which act as modulators of Heparin Binding Proteins (HBP) activities during bone development and regenerative processes. GAG mimetics have been proposed as ECM stabilizers and were previously described for their positive effects on bone formation and angiogenesis after local treatment. Here, we investigated a strategy associating the GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] with bone substitutes to optimize stem cell-based therapeutic products. We showed that [OTR₄₁₂₀] was able to potentiate proliferation, migration and osteogenic differentiation of hMSC *in vitro*. Its link to Tricalcic/Hydroxyapatite (TCP/HA) scaffolds improve their colonization by hMSC. When these combinations were tested in an ectopic model of bone formation in immunodeficient mice, the GAG mimetic promoted an osteoclastic activity and modulated the inflammatory response. Finally the peri-implant vascularization was more developed. Together, these finding underlined the ability of GAG mimetics to organize the ECM that will permit to potentiate vascularization and amplify the host response toward the implanted biomaterial.

Introduction

Standard protocols for treatments of bone deficiencies such as cortical autografts, are often associated with complication risks and morbidity. To regenerate damaged bone, tissue engineering is currently investigating the feasibility to associate biomaterials to stem cells therapeutic products, such as human mesenchymal stem cells (hMSC) committed to an osteogenic phenotype [1, 2]. One rational challenge in this area is to create scaffolds that could provide an appropriate extracellular matrix (ECM) for efficient adhesion, survey, proliferation and differentiation of therapeutic cellular products in the injured tissue. However, perfect mimicry is difficult to achieve considering the complex molecular, cellular and mechanical processes that need to be timely coordinated for tissue repair. Synthetic bone substitutes such as tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP/HA) ceramics, have been developed because of their bioactive and osteoconductive properties [3] and bone marrow MSC loaded on such porous ceramics have shown efficacy in some clinical trials [4, 5]. However, these products still need to be improved, for example on hMSC scaffolds colonization efficiency *in vitro*, to overcome specific pitfalls for implementation on large scale clinical applications. Finally, angiogenesis is crucial for the formation of a functional microvasculature network which supplies nutrients to the device, allowing survival of the injected cells in the damaged matrix [6, 7]. Thus, tissue engineering strategies aim to recreate complexes “niches” optimized to stabilize endogenous or therapeutic growth factors and to preserve or potentiate therapeutic cells properties.

Among the major components of ECM, sulfated glycosaminoglycans (GAG) including heparan sulfates (HS) and chondroitin sulfates (CS) species, assure structural scaffold functions and relevant biological effects on cell growth, migration and differentiation [10]. These regulatory roles are related to their ability to interact with “heparin binding proteins” (HBP) and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

to protect them from proteolytic degradation increasing their half-life [10]. During osteogenesis, HS provide matrix-bound or cell surface-bound reservoirs for specific HBP including growth factors, such as fibroblast growth factor (FGF-2) [12] and bone morphogenic proteins (BMP) [13], chemokines, cytokines and enzymes also (for review [11]). The structural complexity of HS, characterized by spatially discrete sulfated domains, confers to these GAG particular physical and chemical properties associated to their ability to interact specifically with different HBP [15]. In injured tissues, enhanced glycanase activity is supposed to limit the capacity of these endogenous GAG to protect HBP and so to alter their regulatory effects [14].

As a new approach to associate the relevance of the chemical signatures of GAG to their biological functions, a family of glycanase resistant GAG mimetics, called 'heparan mimetics' (HM), has been developed as structural and functional analogs of natural GAG. Structural mimicry is related to the presence of sulfate and carboxylate moieties along their polysaccharidic chains [16]. These compounds have improved both the efficiency and quality of healing after local treatment in numerous animal models [17, 18] and are currently used as medical devices for the treatment of skin and eye ulcers [19]. From a functional point of view GAG mimetics are thought to replace natural GAG destroyed by matrix endoglycosidases in injured tissues in where they stand as scaffolds that support the activity of HBP [20]. Thus HM were able to accelerate the spontaneous bone healing process observed in partial full-thickness calvarial defects [21] and to induce the repair of trephine skull defects in rats, in which no spontaneous healing occurs [22]. HM were also able to enhance endothelization of prothesis [23] and neovascularization after skeletal muscular ischemia [24]. These effects were partly explained by interactions with HBP such as FGF-2 [23] or vascular endothelial growth factor (VEGF) [26]. Recently, we demonstrated that GAG mimetics modulate stem cells properties since two different HM were able to mobilize hematopoietic stem cells *in-vivo* and to enhance rat MSC clonogenicity,

1
2
3 proliferation, migration and osteogenic differentiation *in-vitro*, according to their specific
4 structural signatures [27] [28].
5
6

7
8 In this work, we propose to engineer a new therapeutic product by combining bone substitutes
9 and hMSC with the sulfated HM [OTR₄₁₂₀], chosen because of its bone regenerative effect after
10 local treatment and its angiogenic properties [26]. First, we studied the [OTR₄₁₂₀] effect on the
11 capacity of hMSC to proliferate, migrate and differentiate into an osteogenic phenotype *in vitro*.
12 Then, we developed TCP/HA ceramics engrafted with [OTR₄₁₂₀] and evaluated hMSC
13 colonization efficiency on them *in vitro*. Finally we evaluated the interest of [OTR₄₁₂₀]
14 association to substitutes on bone formation induced by hMSC in an ectopic model in
15 immunodeficient mice. Our data indicate that GAG mimetic associated to the bone substitutes
16 modulate inflammatory response, osteoblastic/osteoclastic balance and vascularization *in vivo*.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **Materials and Methods**

35 ***GAG mimetic, heparin, heparan sulfate and growth factors***

36
37 [OTR₄₁₂₀] was obtained from OTR3 Inc. (Paris, France). This derivative of dextran T40
38 (Sigma, France) contains the same degree of substitution in carboxylate and sulfate residues than
39 heparin [16]. The fluorescein-labeled derivative [OTR₄₁₂₀]^{FITC} was prepared from dextran-FITC
40 (Sigma) as previously described [29]. Heparin from porcine intestinal mucosa (Sigma) and HS
41 from bovine kidney (Sigma) were used as natural GAG controls and were cell culture grade.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52 Recombinant human FGF-2 was prepared as previously described [30].
53
54

55 ***Human mesenchymal stem cell culture***

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hMSC were separated from bone marrow nucleated cells obtained from patients undergoing routine total hip replacement surgery (Percy Military Hospital Clamart, France) after informed consent. Primary cells were isolated from supernatant of spongy bone fragments and expanded in culture media (CM) based on α -MEM (Invitrogen, France) plus 10% fetal calf serum (FCS) as previously described [31]. Media were routinely changed twice a week. All experiments were performed with hMSC at passage 2.

hMSC proliferation assay

hMSC were seeded at 1×10^3 cells/cm² in 24-wells plates. The day after, CM was changed and supplemented or not with increasing concentrations of [OTR₄₁₂₀]. T40, HS and Heparin were used as controls. Five days after, cell growth rate was measured by the colorimetric MTT cell assay according to manufacturer's protocol (Sigma) using a standard curve of hMSC.

hMSC migration assay

Migration assays were performed in micro-chemotaxis Boyden's chambers (Corning Costar, MA, USA) as previously described [32]. Briefly, hMSC were harvested after 24 h culture in migration medium (MM) composed of RPMI 1640 medium (Invitrogen) and 0.25% of bovine serum albumin (BSA Fraction V, Sigma). Then 5×10^5 cells were loaded into the top chamber. The bottom chamber unit containing the MM was supplemented or not with increasing concentration of [OTR₄₁₂₀] and with FGF-2 or FCS as controls. Plates were incubated for 12 h at 37°C. Then, membranes were stained with May-Grünwald and Giemsa solutions, mounted and photographed. Quantification of migrated cells was performed on 3 separate areas per filter.

In vitro osteogenic differentiation assay

1
2
3 hMSC were seeded at 3×10^3 cells/cm² in 6-well plates. The day after, media was replaced by
4
5 CM or osteogenic induction medium (OS) composed of α MEM plus 20% FCS (v/v), 0.1 μ M
6
7 dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate and 0.05 mM ascorbic acid (all from Sigma). Media
8
9 were supplemented or not with [OTR₄₁₂₀] and changed twice a week. After 3 weeks, cells were
10
11 fixed in absolute ethanol and stained with 2% alizarin red solution. Alkaline phosphatase (ALP)
12
13 membrane expression was analyzed by flow cytometry using phycoerythrin (PE)-conjugated
14
15 monoclonal anti-human ALP antibody (R&D Systems Europe, England). PE-conjugated isotypic
16
17 antibody was used as negative control. Cell labeling was analyzed with a MACS Quant cytometer
18
19 (Miltenyi Biotec, France).
20
21
22
23
24

25 ***Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)***

26
27
28 Total mRNA was extracted with TRIzol® reagent (Invitrogen). DNase treatment was
29
30 performed with a DNA-free kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) and cDNA
31
32 were synthesized by Superscript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to
33
34 manufacturer's instructions. Primers were designed by Primer3output software and obtained by
35
36 Eurofins MWG (Germany). The following specific oligonucleotides were used as reaction
37
38 primers: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), NM_002046.3, forward 5'-TGC
39
40 CTGATGAGACAGAGGTG-3', reverse 5'-TCCACCTGGACAGGATTAGC-3'; bone
41
42 morphogenetic protein 2 (BMP2), NM_001200.2, forward 5'-TGTGTCCCGACAGAACTCAG-
43
44 3', reverse 5'-ACAACCCTCCACAACCATGT-3'; osteocalcin (OC), NM_199173.4, forward 5'-
45
46 GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3', reverse 5'-TCCCAGCCATTGATACAGGT-3';
47
48 osteopontin (OP), NM_001040058.1, forward 5'-CGCAGACCTGACATCCAGTA-3', reverse
49
50 5'-ATGGCCTTGTATGCACCATT-3'. cDNA real-time amplification was performed with
51
52 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Switzerland) by following
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 manufacturer's procedures and monitored with the ABI Prism 7900 Sequence Detection System
4 (PerkinElmer/Applied Biosystem, Switzerland). All samples were amplified simultaneously in
5 one assay run set with classical cycling and melting conditions. Amounts of cDNA were
6 normalized to GAPDH ($\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{\text{GAPDH}}$). Results are reported as relative gene
7 expression ($2^{-\Delta CT}$).
8
9

10 11 12 13 14 15 ***Biomaterials functionalization and colonization***

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Cube-shaped ($4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$) bone substitutes (Ceraver, France) were made of β tricalcium phosphate hydroxyapatite (65%) and hydroxyapatite (35%) (TCP/HA) with a mean pore size of 500 μm . To covalently immobilize GAG mimetic on surfaces [33], the biomaterials were incubated 36h at 50°C with [OTR₄₁₂₀] solutions at 10 or 50 mg/mL in PBS1x or with PBS1x alone (GAG-free control). Functionalized scaffolds were washed twice with NaCl 1 M to eliminate electrostatics interactions between the bone substitutes and the mimetic. To colonize the biomaterials, 5×10^5 hMSC were incubated with the scaffolds in 100 μl for 3 h at 37 °C. Cell-free scaffolds were incubated under similar conditions. Cell colonization was performed one day before in vivo implantation.

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 ***Biomaterial cell-loading measurement***

Cell-loaded biomaterials were washed with PBS 1x and incubated with a lysis solution containing Tris-EDTA buffer 1x, 0.1% triton X-100, 0.2 mg/mL proteinase K (Roche Applied Science, France) at 50 °C 12 h. Samples were then treated with 3 freeze/thaw cycles under strong shaking and sonication. A fixed volume of each sample was incubated with the PicoGreen® dye from the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA kit (Invitrogen). Optical densities (OD) associated to DNA amount were analyzed with a Fluoroscan II (Labsystems, Thermo Fisher Scientific, France)

1
2
3 at 480 nm and 520 nm, for exciting and emission wave lengths respectively. OD was then
4 reported to total number of hMSC, as compared to a standard curve of DNA amount prepared
5 with increasing number of hMSC according to the same Picogreen protocol.
6
7
8
9

10 ***GAG mimetic quantification***

11
12
13
14
15 GAG mimetic quantifications were performed in the coated biomaterials before their *in vivo*
16 implantation (day 0) and at their recovery from animals 30 days after the implantation procedure.
17 Surrounding connective tissues were eliminated by 0.2 mg/mL proteinase K (Sigma) and 0.1 %
18 triton X-100 treatments, during 24 h at 56 °C. Natural GAG were eliminated with 4 mU
19 chondroitinase ABC (Sigma) and nitrous acid treatments successively [34]. Selective
20 quantification of GAG mimetic linked to bone substitutes were performed by the dimethyl
21 methylene blue (DMMB) assay [34].
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 ***In vivo ectopic implantation***

32
33
34
35
36 Four experimental groups of bone substitutes, functionalized or not and colonized or not, were
37 subcutaneously implanted into 7 weeks old female immunodeficient nude mice (Rj:NMRI-nu,
38 Janvier, France): (1) TCP/HA alone; (2) TCP/HA/OTR₄₁₂₀; (3) TCP/HA/hMSC and (4)
39 TCP/HA/OTR₄₁₂₀/hMSC. Three independent experiments were performed with 4 biomaterials
40 per condition: 2 biomaterials per mice were implanted on 2 mice per group. Mice were
41 anesthetized with 100 mg/kg ketamine (Virbac Santé Animale, France) and 10 mg/kg xylazine
42 (Bayer, Germany). Biomaterials were implanted along the dorsal axis of the back skin in
43 subcutaneous pockets created by 7 mm incisions. 8 weeks after implantation, mice were
44 sacrificed, the back skin was incised and the connective tissues separated to expose the bone
45 substitutes and the surrounding vascularization network. Panoramic digital views were obtained
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 with a numerical color camera (PowerShot A650 IS, Canon). A binocular loupe associated to a
4 camera (E8400, Nikon) was used to take 4 pictures for numerical segmentation analysis of the
5 vessel tree. All biomaterials were recovered and fixed in 70% ethanol for histological analysis.
6
7
8
9

10 11 *Histological analysis of bone substitutes sections*

12
13
14
15 Biomaterials were dehydrated by gradient ethanol, cleared by xylene and embedded in methyl
16 methacrylate resin (Merck, Germany). Sections with thickness of 5 μm were obtained using a
17 Polycut E microtome (Leica, Germany) and then deplastified in 2-methoxyethyl acetate solution
18 (Carlo Erba, Italy), dehydrated in graded ethanol solutions and cleared in water. Sections were
19 stained with toluidine blue (pH 3.8) and visualized using standard light microscopy. Alkaline
20 phosphatase (ALP) activity was detected using naphthol AS-TR phosphate and fast blue RR salt
21 (Sigma) in Tris 0.1 M (pH 9), MgCl_2 , dimethylformamide (Merck, Germany) [21]. Enzymatic
22 activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was detected using naphthol AS-TR
23 phosphate, sodium tartrate, and fast red TR salt (all from Sigma) dissolved in acetate buffer 0.1
24 M (pH 5.2) with dimethylformamide [35]. Masson's trichrome staining was performed according
25 to standard procedures.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 *Batch images statistical analysis procedure of vessel tree segmentation*

43
44
45 Pictures of the capillar network were analyzed using an ImageJ software program developed
46 to quantify elements associated to the vascularization tree. Images were pretreated to improve
47 tree image detection. Briefly, background signal, lightning shadings and reflections were
48 removed. Then, the channel exhibiting the maximum of absorbance at the vessels locations was
49 segmented [36]. The resulting binary images, once skeletonized, were analyzed as a sum of
50 segments, branches and nodes. A "segment" was classically delimited by two nodes. A "branch"
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 was defined by one node and one extremity. Each detected segment and branch was characterized
4
5 by its length and each image analysis was summarized as object counts and length parameters
6
7 recorded into a batch table [37].
8
9

10 11 *Statistical analysis*

12
13
14 Results were expressed as mean of values \pm standard deviation (sd) of the mean from triplicate
15
16 (in vitro) or quadruplicate (in-vivo) values per condition per experiment, obtained from at least
17
18 three independent *in vitro* and *in vivo* experiments. Statistical analyses were performed using the
19
20 Student's t-test (unpaired two-tailed).
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Results**

30 31 32 *[OTR₄₁₂₀] potentiates proliferation and migration properties of hMSC in vitro*

33
34
35 Addition of [OTR₄₁₂₀] at increasing doses in the culture media of hMSC induced significant
36
37 increase of the cell proliferation rate (Fig. 1A), as illustrated during the first 3 days with a
38
39 maximal 50% increase obtained with the 1000 ng/mL dose. [OTR₄₁₂₀] was as efficient as HS or
40
41 heparin (100 ng/mL) whereas dextran T40 showed no effect. Moreover [OTR₄₁₂₀] induced a 3.5
42
43 fold increase of migrating cells per field with 100 ng/mL dose (Fig. 1B), as compared to control
44
45 cells in FCS-free medium (CT). This increase was similar to that obtained with FGF-2 (3 fold),
46
47 whereas a maximal 5 fold increase was obtained with 20% FCS positive control. These results
48
49 indicate that [OTR₄₁₂₀] is able to induce proliferation and migration properties of hMSC.
50
51
52
53
54

55 *[OTR₄₁₂₀] induces osteogenic differentiation of hMSC in vitro*

1
2
3 We tested the ability of [OTR₄₁₂₀] to stimulate osteogenic phenotype on hMSC cultured in
4 basal control (CM) or osteogenic (OS) media for 21 days, as compared to the same conditions in
5 absence of HM. Alizarin red staining of calcium-rich deposits (Fig. 2A), indicative of functional
6 osteocytes, was low in CM whereas additions of [OTR₄₁₂₀] induced a clear increase of red
7 staining intensity. In OS condition, the staining was strong and addition of [OTR₄₁₂₀] had no
8 effect. Similar effect was observed by flow cytometry analysis of cells expressing ALP marker
9 (Fig. 2B). In CM 40% of cells were positives for ALP expression (ALP⁺) and addition of
10 [OTR₄₁₂₀] (100 ng/mL) induced a 2 fold increase of ALP⁺ cells. In OS condition 96% of cells
11 were ALP⁺ and addition of [OTR₄₁₂₀] had no effect on this high level of expression. Next, the
12 expression of osteogenic genes was analyzed by qRT-PCR at day 7 of culture (Fig. 2C). The
13 treatment by [OTR₄₁₂₀] significantly induced the expression of BMP-2 in CM as well as in OS
14 conditions. This inductive effect was also significant for late markers, such as ostéocalcine (OC)
15 and osteopontin (OP) that were not already induced in cells under the OS condition. Altogether,
16 these results establish that [OTR₄₁₂₀] is able to induce an osteogenic phenotype on hMSC in the
17 absence of osteogenic media.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

[OTR₄₁₂₀] coating on TCP/HA ceramics improve their colonization by hMSC in vitro

43 TCP/HA ceramics were functionalized with 10 mg/mL or 50 mg/mL [OTR₄₁₂₀] solutions (A
44 and B respectively), corresponding to 4 or 20 µg of mimetic incubated per cm² of ceramic surface
45 respectively. DMMB assay performed at day 0 (Fig. 3A) indicated coated [OTR₄₁₂₀]
46 concentrations of 3.6±0.4 ng/cm² (TCP/HA/OTR₄₁₂₀-A) and 6.0±0.7 ng/cm² (TCP/HA/OTR₄₁₂₀-
47 B) on the ceramic surface, corresponding to 0.1% and 0.03% of grafting efficiency respectively.
48 These rate are explained as the linkage reaction occur between the phosphate groups on the
49 ceramic and the polysaccharides bearing a reactive reducing end, only available in 0.1% of the
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 total amount of molecules [16, 33]. Then these TCP/HA/OTR₄₁₂₀ scaffolds were analyzed for
4
5 their ability to modulate hMSC colonization *in vitro* (Fig. 3B). Whereas only 42% of total cells
6
7 (5.10⁵ hMSC) were found on control scaffolds, cell colonization efficiency reached 80% for
8
9 TCP/HA/OTR₄₁₂₀-A and 90% for TCP/HA/OTR₄₁₂₀-B. These results highlight that [OTR₄₁₂₀]
10
11 efficiently improve colonization of hMSC in functionalized scaffolds, which is a critical step for
12
13 further osteoformation *in vivo*.
14
15

16 17 18 **[OTR₄₁₂₀] engraftment on TCP/HA ceramics is stable in vivo**

19
20
21 To make sure the stability of the [OTR₄₁₂₀]-engineered scaffolds as a matrix for extended
22
23 period of time *in vivo*, TCP/HA substitutes functionalized with the [OTR₄₁₂₀]^{FTTC} were
24
25 subcutaneously implanted on immuno-deficient mice and compared to GAG-free substitutes as
26
27 controls. The immobilized [OTR₄₁₂₀]^{FTTC} was quantified by the DMMB assay (Fig. 3A) after
28
29 optimized enzymatic and chemical removal of endogenous GAG 30 days after *in vivo*
30
31 implantation (D30). [OTR₄₁₂₀]^{FTTC} amounts were quantified at 3.2±0.3 ng/cm²
32
33 (TCP/HA/OTR₄₁₂₀-A) and 5.4±0.4 ng/cm² (TCP/HA/OTR₄₁₂₀-B) at D30 (Fig. 3A, white plots),
34
35 which are similar values to those obtained before implantation (D0) (Fig. 3A, black plots).
36
37 Macroscopic observation post DMMB assay confirmed that no more endogenous GAG were
38
39 detected on control scaffolds which were colorless (Fig. 3C), whereas the GAG mimetic were
40
41 still present on the functionalized scaffolds at D30, as revealed by the strong purple staining of
42
43 the DMMB dye (Fig. 3F). Moreover, fluorescent analysis of the scaffold sections showed a
44
45 homogenous distribution of the coated [OTR₄₁₂₀]^{FTTC} (Fig. 3H) colocalized with both macropores
46
47 and micropores (Fig. 3G), whereas no fluorescence was observed on GAG-free scaffold (Fig.
48
49 3E). These results clearly demonstrated the GAG mimetic immobilized on scaffolds are stable for
50
51 at least one month *in vivo* and are resistant to mammalian glycanase digestion.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Effect of [OTR₄₁₂₀] and hMSC associated to scaffolds on osteoformation in vivo

Four groups of scaffolds were analyzed for ectopic bone formation 8 weeks after implantation into nude mice: (1) TCP/HA alone; (2) TCP/HA/OTR₄₁₂₀; (3) TCP/HA/hMSC and (4) TCP/HA/OTR₄₁₂₀/hMSC. Masson's trichrome staining was used to reveal matrix organization and collagenic deposition, with bone formation characterized by green round nodules growing from the margin and connected to the biomaterial (Fig. 4A). ALP activity staining (ALP⁺) was used to reveal osteoblastic precursor cells in purple, known to be responsible for calcification of osteoid matrix, characterized by a fibroblastoid shape and a dense network organization, and classically found around bone nodules in formation (Fig. 4B). In parallel, semi quantitative evaluation of bone nodule formation and ALP⁺ areas were performed (Table 1). An accumulation of collagen depositions was noted around the [OTR₄₁₂₀] coated scaffolds TCP/HA/OTR₄₁₂₀ as compared to TCP/HA alone (Fig. 4A). Similar collagen deposits were observed on the top of bone formation areas in the TCP/HA/hMSC biomaterials and were increased in the TCP/HA/OTR₄₁₂₀/hMSC coated scaffolds (Fig. 4A). TCP/HA and TCP/HA/OTR₄₁₂₀ scaffolds were not associated to bone nodule areas or ALP⁺ cells (Figs. 4A and 4B respectively, and 0/12 values on Table 1). However, most of the TCP/HA/hMSC scaffolds (9/12 Table 1) were characterized by the presence of bone nodules essentially localized on the periphery of the constructs or into the most peripheral pores and interstices (Fig. 4A), and all of them (12/12 Ttable 1) were clearly associated with ALP⁺ cells areas (Fig. 4B). The presence of [OTR₄₁₂₀] in scaffolds (TCP/HA/hMSC/OTR₄₁₂₀) was associated with a decrease of the ALP⁺ areas number per block (2/12 Table 1) plus a decrease of their size and intensity of staining (Fig. 4B). Concomitantly, no bone nodules were observed under this condition (Fig. 4A and 0/12 Table 1).

1
2
3 So the GAG mimetic functionalized ceramics induce collagenic deposition without calcification
4
5 of osteoid matrix formation even in the presence of hMSC in the ectopic implantation site.
6
7

8 9 *Effect of [OTR₄₁₂₀] and hMSC associated to scaffolds on the inflammatory response*

10
11 Toluidine blue staining highlighted a layer of various cells types with cytological features of
12 hematopoietic cells, including macrophages, giant cells or neutrophils, around each type of
13 implanted scaffold (Fig. 4C). These cells were observed in contact with all the TCP/HA surfaces,
14 on which they could initiate a resorption process, creating cavities (Fig. 4C). However, constructs
15 exhibited variations in the thickness and density of macrophages accumulation that we evaluated
16 semi-quantitatively according to a relative inflammation index (II) value at the periphery and in
17 the macropores (Table 1). TCP/HA alone present a dense layer of cells (Fig. 4C) characterized by
18 a 1.91 II value (Table 1). Association of hMSC to scaffold TCP/HA/hMSC increased slightly II
19 value to 2.46 (Table 1, Fig. 4C) and these macrophagic cells were infiltrated between substitute
20 and ALP⁺ areas (Fig. 4B). However, when scaffolds were functionalized with the mimetic,
21 TCP/HA/OTR₄₁₂₀ (Fig. 4C, 1.28 II value) and TCP/HA/hMSC/OTR₄₁₂₀ (Fig. 4C, 1.96 II value),
22 decreased inflammatory responses were observed in comparison with the respective control
23 TCP/HA (Fig 4C, 1.91 II value) and TCP/HA/hMSC (Fig. 4C, 2.46 II value).
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Cytological analysis revealed several multinucleated cells with macrophagic features and
44 closely in contact with the scaffolds surfaces, creating multiple foci, rather than staying alone.
45 Then, histoenzymatic approach with TRAP staining was performed to characterize (Fig. 4D) and
46 semi-quantitatively evaluate (Table 1) a possible active participation of such osteoclastic cell foci
47 to create resorption lacunas in surface of the ceramic scaffold. A TRAP positive (TRAP⁺)
48 staining was confirmed on TCP/HA scaffolds with a homogeneous repartition around the
49 biomaterial (Fig. 4D) and with a mean of 20 TRAP⁺ foci per block (Table 1). This staining was 2
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 fold increased when substitutes were associated with hMSC or with [OTR₄₁₂₀] (Fig. 4D and Table
4
5
6 1). A comparative analysis of serial sections with ALP and TRAP staining indicated that
7
8 osteoclastic TRAP⁺ areas (Fig. 4D) are present in ALP negative regions (Fig. 4C) and inversely,
9
10 On TCP/HA/hMSC/OTR₄₁₂₀ scaffolds, TRAP⁺ areas were clearly increased in intensity (Fig. 4D)
11
12 and number, 4 fold compared to control (Table 1). These results suggest that GAG mimetic
13
14 association to scaffold stimulate osteoclastic cell foci.
15
16

17 18 *Effect of [OTR4120] associated to scaffolds and hMSC on vascularization network*

19
20

21
22 Once scaffolds have been removed, macroscopical differences were observed on the capillary
23
24 bed surrounding the implantation site of scaffolds (Fig. 5A). The vascularization tree around
25
26 TCP/HA was composed of few vessels, which failed to join the bone substitute or to invade its
27
28 faces. The addition of hMSC induced an increase of the skin vasculature network around the
29
30 TCP/HA/hMSC implant. When [OTR₄₁₂₀] was associated to the bone substitute, with or without
31
32 hMSC, vascularization network was more dense. Moreover, in the presence of mimetic, the
33
34 vessel tree ramifications was more orientated towards the functionalized substitutes, as compared
35
36 to TCP/HA/hMSC substitutes. On the light of these observations we developed a software to
37
38 automatically analyze the vascularization tree extent after numerical captures (Fig. 5B and 5C).
39
40 Two categories of objects, segments and branches were defined to proceed to the analysis of the
41
42 number and length of each ramification degree. Angiogenesis associated with hMSC engraftment
43
44 was characterized by an increase in the number of segments and branches (Fig. 5D). However,
45
46 functionalization of the scaffold with [OTR₄₁₂₀] significantly increased the number of terminal
47
48 branches and segments, alone or in association with hMSC, indicating that the GAG mimetic
49
50 increases the ramification level. Same results were obtained on the lengths of each element (data
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 not shown). These results validate the angiogenic potential of the GAG-mimetic which allows
4
5 important vascularization around the functionalized scaffold.
6
7
8
9

10 11 12 **Discussion** 13

14
15 In this study we demonstrate that GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] modulates the proliferation,
16 migration and osteogenic differentiation of hMSC *in vitro*, in accord with our previous results on
17 rat MSC [28]. Such modulating effects on hMSC properties could be due to cooperative or
18 protective effect of GAG mimetics on HBP presents in serum or secreted by MSC, such as FGF-2,
19 and BMP. Accordingly, GAG mimetics derivatives were previously shown to modulate FGF-2,
20 BMP-2 and TGF- β activities on MC3T3-E1 osteoblastic cell line derived from murine calvaria,
21 possibly by regulation of these growth factors interactions with their membrane receptors [39].
22 Identification of associated factors is in progress in order to highlight potential pathways involved
23 in the GAG mimetic promoting effects on primitive bone forming cells such as MSC.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 Since [OTR₄₁₂₀] was able to stimulate human mesenchymal and endothelial cell properties *in*
38 *vitro*, we hypothesized that its association with bone substitutes could be of interest to mimic the
39 matricial environment necessary for effective therapeutic cells recruitment, growth and
40 differentiation during the bone regenerative process. Thus, we developed a methodology to
41 engraft the polysaccharide to biphasic TCP/HA porous ceramics. Functionalized
42 TCP/HA/OTR₄₁₂₀ were prepared with the mimetic distributed inside the pores and the inter-
43 connections of the synthetic substitutes as well as on the outside surface. The biological interest
44 of this strategy was demonstrated by the significant increase of the scaffold colonization by
45 hMSC prior to implantation in mice. The analysis of [OTR₄₁₂₀]^{FITC} functionalized scaffolds
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 recovered from animals after implantation demonstrates the mimetic stability for at least 1 month
4
5 *in vivo*, and its resistance to host's proteases, glycanases and inflammation mediators. Thus, we
6
7 hypothesize that covalently linking of the linear sulfated GAG covalently linked to bone
8
9 substitutes constitutes an anchorage point for cells and a storage site for HBP. Then, as we
10
11 demonstrated a chemoattractant effect of the soluble GAG mimetic on hMSC, we suggest that
12
13 such properties can be conserved by the engrafted GAG mimetic resulting in improved migration
14
15 of hMSC and increased scaffold cell colonization efficiency. Our results demonstrate that GAG
16
17 mimetics can be stably bound to TCP/HA bone substitutes resulting in functionalized medical
18
19 devices with enhanced interactions with cells.
20
21
22

23
24 Ectopic osteoformation was further analyzed after subcutaneous transplantation of TCP/HA
25
26 bone substitutes, functionalized or not with the mimetic [OTR₄₁₂₀,] and in association or not with
27
28 hMSC, in immunodeficient mice. Inflammatory response with macrophage fusion observed on
29
30 the implantation site has already been reported in similar models and could play a role on the
31
32 transition to a chronic inflammatory reaction [38]. Moreover, the cubic shape of scaffolds used
33
34 could have perpetuated traumas and could explain such chronicity. Interestingly,
35
36 TCP/HA/[OTR₄₁₂₀,] scaffolds were associated with a decrease of the inflammatory reaction and
37
38 an increase in collagen thickness, as previously described [41] [42]. The anti-inflammatory effect
39
40 of GAG mimetics has been related to their ability to increase collagen I and reduce collagen III
41
42 accumulation and MMP-2 and MMP-9 proforms inactivation, with consequent reduction of
43
44 fibrosis [43] [21]. Previous works on cross-linking of natural GAG to collagen I matrices indicate
45
46 that GAG protect porous lamellar matrix structures and modulate the host-tissue response
47
48 through inhibition of giant cells and macrophage infiltrations [44]. Moreover, the presence of HS
49
50 in these matrices also promoted angiogenesis. Thus, our data attest that GAG mimetics can
51
52 readily be associated to bone substitutes to create an optimized matrix environment with
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 enhanced biocompatibility, growth factor signalling capacity, and osteogenesis markers
4
5 expression.
6
7

8 This ectopic bone formation model was validated since TCP/HA substitute colonized with
9 hMSC can induce bone nodules formation and ALP⁺ areas in a dense osteoblastic cell network.
10
11 These observations also outline the necessity to provide, *in situ*, osteoblastic progenitor cells to
12 stimulate osteoformation. Moreover it was demonstrated that chemokine and growth factors
13 secreted by MSC enhance wound healing through paracrine pathways inducing the recruitment of
14 macrophages and endothelial cells [45]. In our model, active ceramic resorption occurred also in
15 relatively small lacunae, excavating the smooth granule surface. This step, previously observed
16 during integration of various bone graft or implanted bioceramics substitutes, is thought to
17 gradually prepare the bone surface for further collagen fibrils and calcifiable matrix deposition
18 [46]. Mono or plurinucleated cells responsible for such degradation had the morphological
19 appearance of osteoclastic cells and were positive for TRAP activity. Interestingly, no bone
20 nodules were observed in the TCP/HA (+/- hMSC) scaffolds functionalized with [OTR₄₁₂₀],
21 suggesting inhibition of osteoblastic activity of engrafted hMSC, whereas osteoclastic activity
22 was clearly increased. GAG, and particularly Heparin, have been reported to influence
23 osteoclastogenesis but data remain very controversial, showing inhibitory [47] [48] [49] or
24 stimulatory effects [50] [51], depending on the doses, molecular weight and sulfation patterns of
25 the heparanoids. Accordingly, previous studies have shown that mice deficient in glypican
26 presented a decreased osteoclast differentiation and a delayed endochondral ossification with
27 marked reduction in calcified trabecular bone [52].
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 Whereas our *in vivo* data suggest resorption activity of GAG mimetic in ectopic site, previous
53 studies already validated bone formation activity of GAG mimetics on orthotopic models. Indeed,
54
55 in periodontitis and craniotomy defective models, GAG mimetic local treatments stimulated bone
56
57
58
59
60

1
2
3 formation through enhanced number of osteoblastic progenitor cells and reduced bone resorption
4 associated to a decreased number of TRAP⁺ pre-osteoclasts [43] [21]. These osteoclastic effects
5 (in ectopic model) *vs* osteoblastic effects (in orthotopic ones) could be linked to the
6 physicochemical states of GAG mimetics, depending whether they are free in solution or linked
7 to protein core or scaffolds. We hypothesis that GAG mimetics immobilized on scaffolds could
8 have induced mobilization of hematopoietic progenitors, such as macrophages, and stem cells
9 from the circulation, as previously shown after their intra-peritoneal injection in mice [27]. GAG
10 mimetics could act also as reservoir of tissue specific HBP, produced by therapeutic hMSC or by
11 residents or mobilized endogenous stem cells. The mimetic could additionally allow a
12 progressive release of HBP, inducing gradients interfering with the bone formation or with the
13 resorption processes. Then in orthotopic models, GAG mimetics could be associated to tissue
14 specific distributions and concentrations of pro-osteogenic HBP and could stimulate bone
15 formation, whereas such pro-osteogenic HBP are lower or maybe null in the ectopic model.
16 Finally, GAG mimetics are classically described as tissue homeostasis regulators. Thus, it can be
17 assumed that their capacity to modulate the inflammatory response could be associated to the aim
18 to inhibit bone formation on an ectopic dermal site. Such regulatory effect will pass through
19 foreign body giant cells mobilized from circulating hematopoietic progenitor cells and associated
20 to an increase of osteoclastic activities. It would be of interest to open a new line of investigation
21 on the role of GAG mimetics as regulators of osteoclastic differentiation.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 Whereas the involvement of HS activity on bone development was extensively validated,
49 few studies have already reported successful use of natural HS molecules alone for bone
50 therapeutic applications. To date, the once-off application of bone-derived HS into a mid-
51 diaphyseal femoral fracture increased trabecular bone volume by 20% [53]. However, natural HS
52 associated to a polyprolactone scaffold and to pre-differentiated hMSC in an ectopic model show
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that the survival of the implanted cells was affected by the host response to the implant regardless
4 of the presence of HS [38]. This highlights the discrepancies observed when using HS alone or
5 associated to bone substitutes with therapeutic cells, and the importance of controlling the
6 implantation site of the device to control the host response. Relevance of our *in vitro* data on the
7 ability of [OTR₄₁₂₀] to potentiate hMSC osteogenic properties and scaffold colonization suggests
8 that GAG mimetics are important to create microenvironment suitable to enhance growth factor
9 signaling and encourages testing further the bone substitute/hMSC/GAG mimetic combined
10 biomaterials in orthotopic bone regeneration models.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Another key point for future regenerative devices concerns the local angiogenic response
24 after scaffold implantation. It's noteworthy that [OTR₄₁₂₀] alone is able to modulate the vascular
25 tree to the same extent as hMSC but with a better organization. Modulation of angiogenesis by
26 GAG mimetics was previously observed in other lesion models [21] and was further validated by
27 its ability to potentiate VEGF activity on endothelial cells properties. Here, we hypothesized that
28 GAG mimetics are able to potentiate local VEGF or other angiogenic factors, secreted by resident
29 cells or by mobilized cells of hematopoietic, mesenchymal or endothelial origin.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Conclusion

46
47 Intelligent scaffolds are necessary to optimize bone repair and most current strategies are
48 based on specific growth factors induction of osteogenesis and angiogenesis. However, such
49 therapeutic use of growth factors is limited by their susceptibility to degradation, the need to
50 maintain prolonged local release at efficient levels, and the cost. Our results suggest that GAG
51 mimetic [OTR₄₁₂₀] could be an alternative since this stable compound, recognized to protect and
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

potentiate HBP, is able to modulate hMSC properties *in vitro*. We showed here that engrafted to a biphasic ceramic scaffold, this mimetic improved the efficiency of hMSC scaffold colonization, which is a key parameter for successful biomaterials engraftment. Moreover, *in vivo* data showed an increased bone remodeling activity associated to GAG-grafted scaffolds and highlighted a new mechanism of action of GAG mimetic on osteoclastogenesis and angiogenesis. Our results indicate that GAG mimetics could be of great interest for potential applications in bone therapy, since, in addition to constitute matrix scaffolds to restore an injured ECM and thus favor a proper cell environment, they can effectively modulate key properties of hMSC, angiogenesis and bone remodeling.

Acknowledgments

GF doctoral fellowship was financed by Region Ile de France. This work has been supported by the “Délégation Générale pour l’Armement” (grant PEA #07coV02).

We thank A. Llorens for helpful technical support. The authors are grateful to A. Destainville from Ceraver companies which kindly provided TCP/HA ceramics.

References

1. Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007 Mar;38 Suppl 1:S33-7.
2. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 2007 Mar;38 Suppl 1:S26-32.
3. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* Jan;31(2):270-8.
4. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A* 2005 Apr 1;73(1):63-72.
5. Niemeyer P, Krause U, Kasten P, Kreuz PC, Henle P, Sudkam NP, et al. Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006 Jan;1(1):21-7.
6. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006 Aug;12(8):2093-104.
7. Grellier M, Bordenave L, Amedee J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2009 Oct;27(10):562-71.
8. Roldan JC, Detsch R, Schaefer S, Chang E, Kelantan M, Waiss W, et al. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. *J Craniomaxillofac Surg* Sep;38(6):423-30.
9. Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* Aug;31(24):6279-308.
10. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* May;209(2):139-51.
11. Cool SM, Nurcombe V. Heparan sulfate regulation of progenitor cell fate. *J Cell Biochem* 2006 Nov 1;99(4):1040-51.
12. Dombrowski C, Song SJ, Chuan P, Lim X, Susanto E, Sawyer AA, et al. Heparan sulfate mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009 May;18(4):661-70.
13. Manton KJ, Leong DF, Cool SM, Nurcombe V. Disruption of heparan and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathways. *Stem Cells* 2007 Nov;25(11):2845-54.
14. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 2005;74:385-410.
15. Turnbull JE, Miller RL, Ahmed Y, Puvirajasinghe TM, Guimond SE. Glycomics profiling of heparan sulfate structure and activity. *Methods Enzymol*;480:65-85.
16. Papy-Garcia D, Barbier-Chassefiere V, Rouet V, Kerros M, Klochendler C, Tournaire M, et al. Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. *Macromolecules* 2005;38:4647-54.
17. Colombier ML, Lafont J, Blanquaert F, Caruelle JP, Barritault D, Saffar JL. A single low dose of RGTA, a new healing agent, hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cells Tissues Organs* 1999;164(3):131-40.
18. Barbier-Chassefiere V, Garcia-Filipe S, Yue XL, Kerros ME, Petit E, Kern P, et al. Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing. *J Biomed Mater Res A* 2008 Jun 18.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19. Chebbi CK, Kichenin K, Amar N, Nourry H, Warnet JM, Barritault D, et al. [Pilot study of a new matrix therapy agent (RGTA OTR4120) in treatment-resistant corneal ulcers and corneal dystrophy]. *J Fr Ophthalmol* 2008 May;31(5):465-71.
20. Ikeda Y, Charef S, Ouidja MO, Barbier-Chassefiere V, Sineriz F, Duchesnay A, et al. Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials* Jan;32(3):769-76.
21. Lafont J, Blanquaert F, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, Saffar JL. Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif Tissue Int* 2004 Dec;75(6):517-25.
22. Lafont J, Baroukh B, Berdal A, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, et al. RGTA11, a new healing agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats. *Growth Factors* 1998;16(1):23-38.
23. Desgranges P, Barritault D, Caruelle JP, Tardieu M. Transmural endothelialization of vascular prostheses is regulated in vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and heparan-like molecule. *Int J Artif Organs* 1997 Oct;20(10):589-98.
24. Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Gautron J. A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J* 1999 Apr;13(6):761-6.
25. Yamauchi H, Desgranges P, Lecerf L, Papy-Garcia D, Tournaire MC, Moczar M, et al. New agents for the treatment of infarcted myocardium. *FASEB J* 2000 Nov;14(14):2133-4.
26. Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem* 2005 Sep 23;280(38):32792-800.
27. Albanese P, Caruelle D, Frescaline G, Delbe J, Petit-Cocault L, Huet E, et al. Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights. *Exp Hematol* 2009 Sep;37(9):1072-83.
28. Nicoletti A, Bartoloni A, Sofia V, Mantella A, Nsengiyumva G, Frescaline G, et al. Epilepsy and toxocarasis: a case-control study in Burundi. *Epilepsia* 2007 May;48(5):894-9.
29. Martelly I, Singabrava D, Vandebrouck A, Papy-Garcia D, Cognard C, Raymond G, et al. Glycosaminoglycan mimetics trigger IP3-dependent intracellular calcium release in myoblasts. *Matrix Biol* May;29(4):317-29.
30. Courty J, Dauchel MC, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Oct 15;180(1):145-51.
31. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005 Nov;205(2):228-36.
32. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 2007 Jul;25(7):1737-45.
33. Chen PR, Chen MH, Lin FH, Su WY. Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. *Biomaterials* 2005 Nov;26(33):6579-87.
34. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefiere V, Caruelle JP, Martelly I, Papy-Garcia D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 2003 Sep;13(9):647-53.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
35. Baroukh B, Cherruau M, Dobigny C, Guez D, Saffar JL. Osteoclasts differentiate from resident precursors in an in vivo model of synchronized resorption: a temporal and spatial study in rats. *Bone* 2000 Nov;27(5):627-34.
36. W. Tsai, Moment-preserving thresholding: a new approach", *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(1985) 377-393.
37. G. Carpentier, Custom Tab Stat From Results, Available online: <http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/CustomTabStatFromResults.txt> (2007).
38. Luong-Van E, Grondahl L, Song S, Nurcombe V, Cool S. The in vivo assessment of a novel scaffold containing heparan sulfate for tissue engineering with human mesenchymal stem cells. *J Mol Histol* 2007 Oct;38(5):459-68.
39. Blanquaert F, Barritault D, Caruelle JP. Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression. *J Biomed Mater Res* 1999 Jan;44(1):63-72.
40. Mauney J, Volloch V. Collagen I matrix contributes to determination of adult human stem cell lineage via differential, structural conformation-specific elicitation of cellular stress response. *Matrix Biol* 2009 Jun;28(5):251-62.
41. Mestries P, Alexakis C, Papy-Garcia D, Duchesnay A, Barritault D, Caruelle JP, et al. Specific RGTA increases collagen V expression by cultured aortic smooth muscle cells via activation and protection of transforming growth factor-beta1. *Matrix Biol* 2001 Jun;20(3):171-81.
42. Alexakis C, Mestries P, Garcia S, Petit E, Barbier V, Papy-Garcia D, et al. Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor-beta1. *FASEB J* 2004 Jul;18(10):1147-9.
43. Escartin Q, Lallam-Laroye C, Baroukh B, Morvan FO, Caruelle JP, Godeau G, et al. A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J* 2003 Apr;17(6):644-51.
44. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, Veerkamp JH, et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* 2000 Aug;21(16):1689-99.
45. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008;3(4):e1886.
46. Saffar JL, Colombier ML, Detienville R. Bone formation in tricalcium phosphate-filled periodontal intrabony lesions. Histological observations in humans. *J Periodontol* 1990 Apr;61(4):209-16.
47. Baud'huin M, Ruiz-Velasco C, Jego G, Charrier C, Gasiunas N, Gallagher J, et al. Glycosaminoglycans inhibit the adherence and the spreading of osteoclasts and their precursors: Role in osteoclastogenesis and bone resorption. *Eur J Cell Biol* Oct 20.
48. Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Shinmyozu K, Takano H, et al. Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function. *J Cell Biochem* 2008 Apr 15;103(6):1707-17.
49. Ling L, Murali S, Stein GS, van Wijnen AJ, Cool SM. Glycosaminoglycans modulate RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* Apr 15;109(6):1222-31.
50. Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone* 2007 Aug;41(2):165-74.
51. Folwarczna J, Sliwinski L, Janiec W, Pikul M. Effects of standard heparin and low-molecular-weight heparins on the formation of murine osteoclasts in vitro. *Pharmacol Rep* 2005 Sep-Oct;57(5):635-45.
52. Viviano BL, Silverstein L, Pfleiderer C, Paine-Saunders S, Mills K, Saunders S. Altered hematopoiesis in glypican-3-deficient mice results in decreased osteoclast differentiation and a delay in endochondral ossification. *Dev Biol* 2005 Jun 1;282(1):152-62.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

53. Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG, Cool SM. The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. J Orthop Res 2006 Apr;24(4):636-44.

For Peer Review

Table 1. Semi-quantitative analysis of histological studies. The numbers of scaffolds exhibiting bone nodules and ALP positive areas have been reported. The inflammatory tissue responses developed around each biomaterial have been semi-quantitatively analyzed considering the cell layer thickness and the density of inflammatory cells on periphery and inner pores. Intensity was reported on an “Inflammation index” (scaled between 0 and 3). Osteoclastic activity was analyzed semi-quantitatively by counting the number of TRAP+ cells foci per device. Values are means \pm sd from n=12 samples (2 scaffolds x2 mice x3 independent experiments; *p<0.05; **p<0.01)

Device	TCP/HA	TCP/HA/OTR ₄₁₂₀	TCP/HA/hMSC	TCP/HA/hMSC/OTR ₄₁₂₀
Bone nodule + n = 12	0/12	0/12	9/12	0/12
ALP Areas + N = 12	0/12	0/12	12/12	2/12
Inflammation Index	1.91 +/- 0.15 *	1.28 +/- 0.18	2.46 +/- 0.17 *	1.96 +/- 0.26
TRAP+ areas per device	20 +/- 5	45 +/- 7 *	46 +/- 6 *	95 +/- 3 **

FIG. 1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

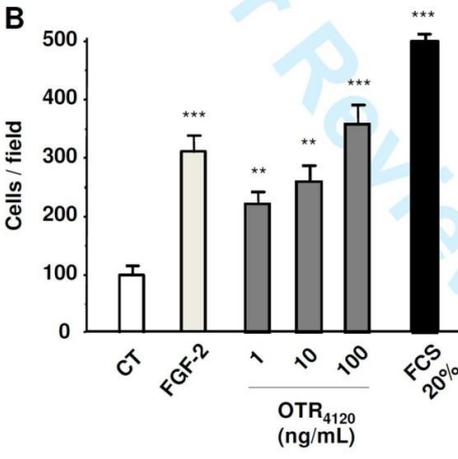
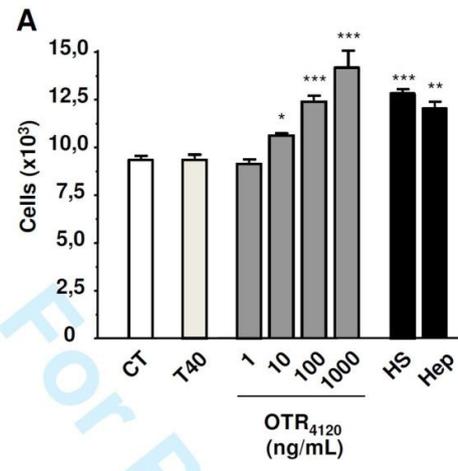


FIG. 2.

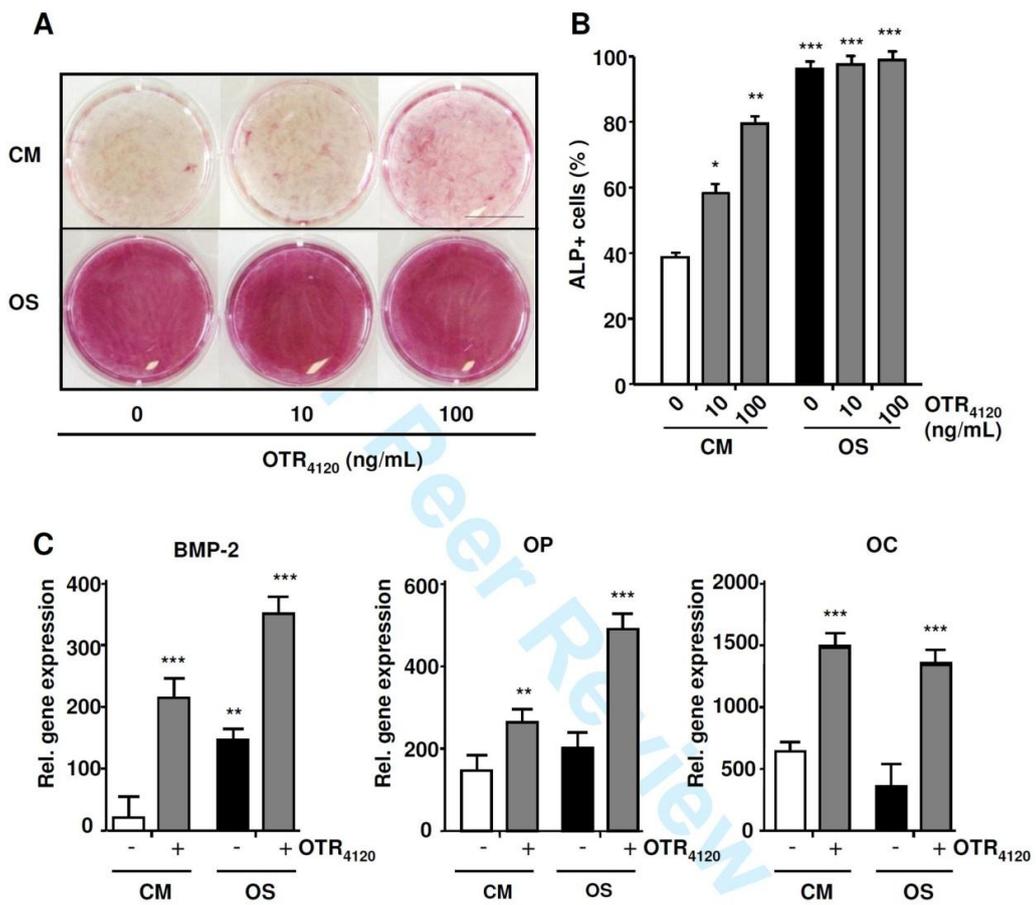


Fig. 3.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

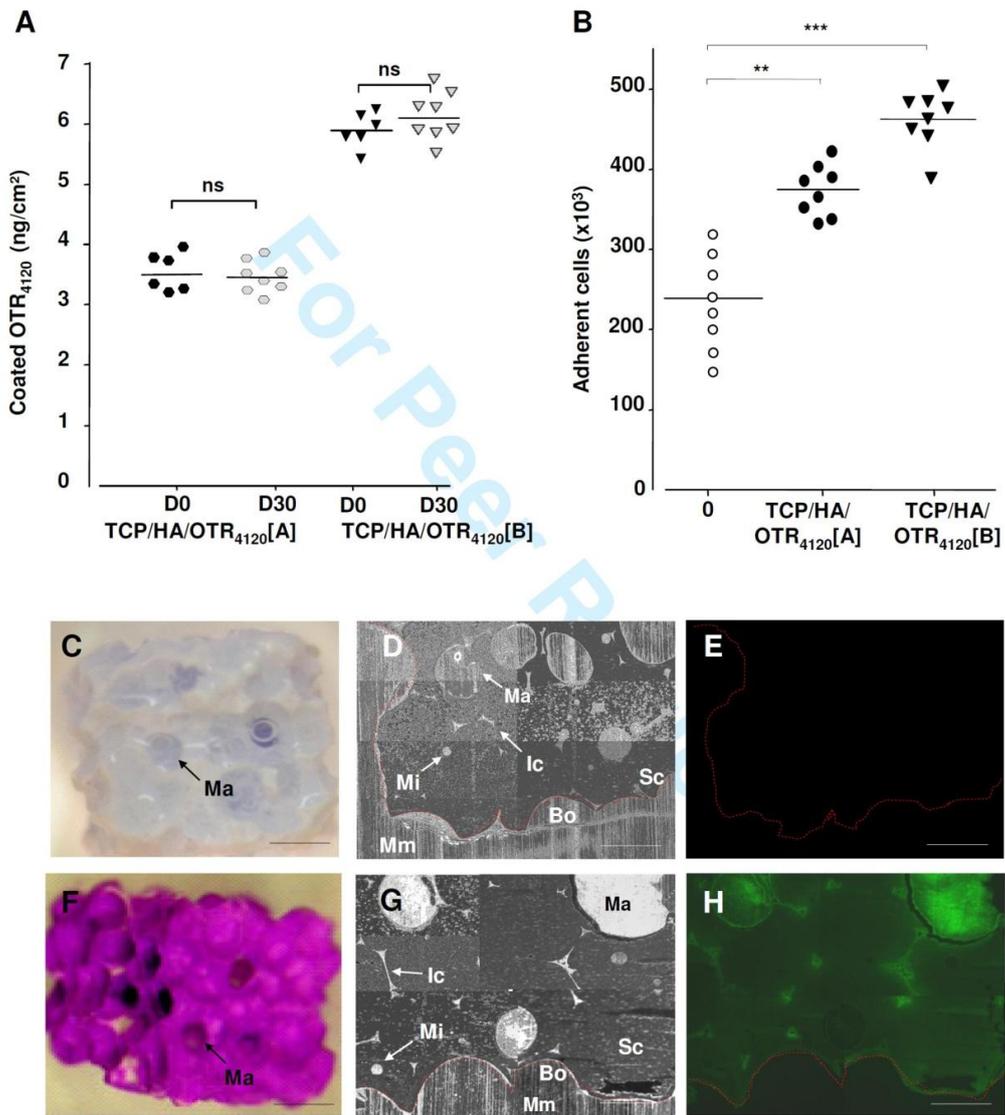
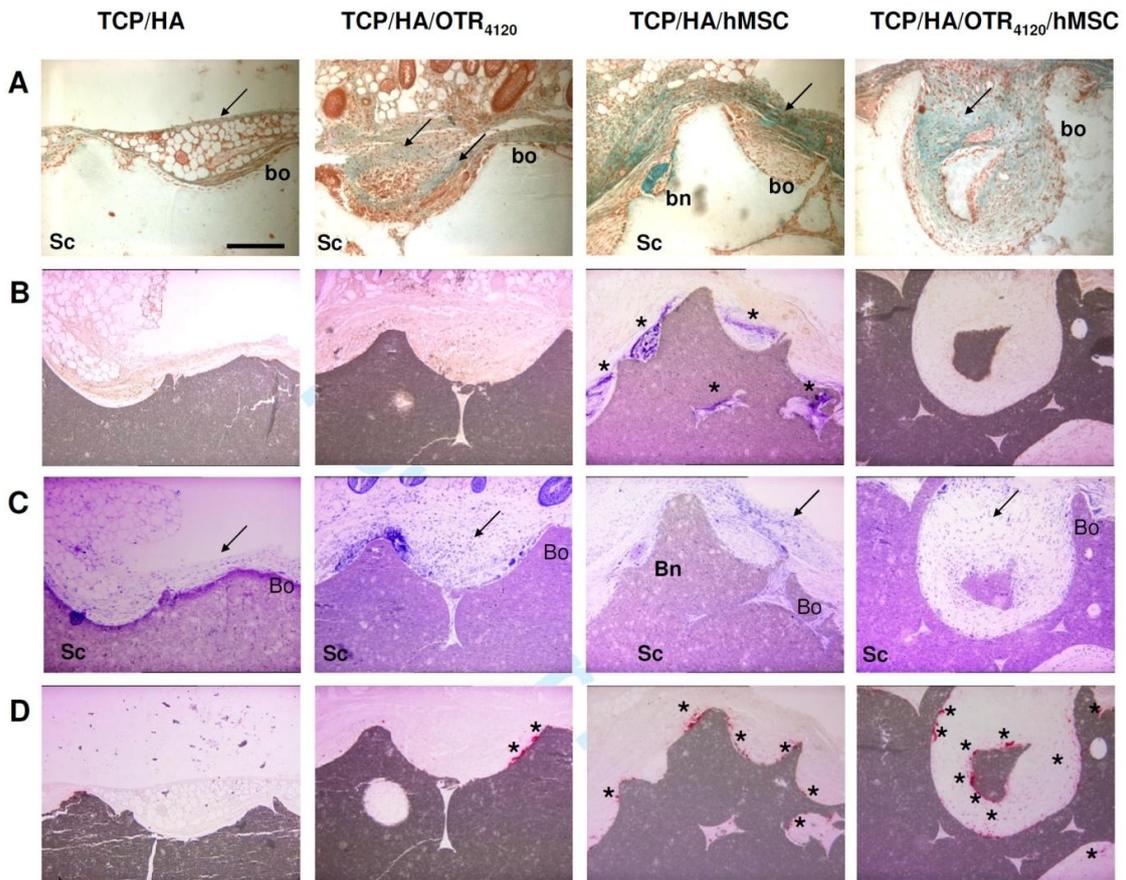


FIG. 4.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell based scaffolds modulate osteoblastic/osteoclastic balance and angiogenesis in vivo.

Guilhem Frescaline ^{a,b}, Thibault Boudierlique ^{a,b}, Leyya Mansoor ^{a,b}, Gilles Carpentier ^{a,b}, Brigitte Baroukh ^c, Fernando Sineriz ^d, Marina Trouillas ^e, Jean Louis Saffar ^c, José Courty ^{a,b}, Jean-Jacques Lataillade ^e, Dulce Papy-Garcia ^{a,b}, Patricia Albanese ^{a,b,*}

Figure legends

Fig. 1. The GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] potentiates the hMSC *in vitro* proliferation and migration properties. (A) hMSC proliferation was quantified using MTT assay after 5 days of treatment without (CT) or with increasing doses (ng/ml) of the GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] solubilized into culture medium and compared to 100 ng/ml of Dextran (T40), natural Heparan Sulfates (HS) and Heparin (Hep). (B) Migration capacity of hMSC towards soluble [OTR₄₁₂₀] were analyzed in Boyden chambers for 12 h. Controls were performed in absence of FCS as negative CT, and with 20% FCS and 5 ng/mL FGF-2 as positive CT. Values of mean +/- sd were obtained from triplicate per condition and per experiment, and from 3 independent experiments (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Fig. 2. The GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] potentiates the hMSC *in vitro* commitment to osteogenic lineage. hMSC were expanded in control (CM) or osteogenic (OS) media supplemented or not with [OTR₄₁₂₀] during 21 days. (A) Calcium deposits revealed by Alizarin Red staining. Bar: 1 mm. (B) Flow cytometry analysis of Phosphatase ALkaline (PAL)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

expression. (C) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of bone morphogenic protein-2 (BMP-2), osteocalcin (OC) and osteopontin (OP) after 7 days of treatment. Expression levels are reported to GAPDH and presented as $2^{-\Delta Ct}$. *In vitro* values are means \pm sd of triplicate per condition and per experiment, from 3 independent experiments (n=9; *p<0.05; **p<0.01).

Fig. 3. The GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] functionalizes TCP/HA bone substitutes. Scaffolds were engrafted with 4 or 20 μ g of [OTR₄₁₂₀] per cm² of TCP/HA developed surface, TCP/HA/OTR₄₁₂₀ [A] and [B] scaffolds respectively, or with PBS1x (negative control), and colonized by hMSC *in vitro* before implantation *in vivo*. 4 weeks after, scaffolds were harvested and treated enzymatically to eliminate proteins and endogenous glycans. (GAG mimetics are resistant to these treatments.) (A) Output of [OTR₄₁₂₀] amount (ng/cm²) covalently engrafted and quantified by DMMB assay at Day 0 before implantation (D0 black plots) and 30 days after *in vivo* implantation (D30 white plots) (n=6; ***p<0.001). (B) Colonization efficiency of scaffolds by hMSC (means of cell number \pm sd), remaining into the scaffolds after 3 h of *in vitro* incubation before *in vivo* implantation (D0), and quantified with the fluorescent DNA probe Picogreen according to a standard curve of cells (n=8; **p<0.01; ***p<0.001). (C, D, E, F, G, H) *In vivo* localization and stability of [OTR₄₁₂₀]^{Fluorescein} engrafted on bone substitutes (F, G, H) compared to control scaffolds without GAG mimetic (C, D, E). Scaffolds were treated for DMMB assay (C, F), embedded in methylmetacrylate for analysis by phase contrast microscopy (D, G) and fluorescence microscopy (E, H). Ma: macropores; Mi: micropore; Ic: interconnection; Sc: scaffold; MM: methylmetacrylate; Bo : border. Black bar: 1000 μ m, white bar: 500 μ m.

Fig. 4. The GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] immobilized on TCP/HA substitutes modulates the osteoblastic/osteoclastic balance in ectopic site. Controls and/or functionalized and/or cellularized scaffolds were implanted on mice and harvested after 8 weeks for histological study.

1
2
3 (A) Masson Trichrome staining revealed the collagenic fibrillar tissue (arrow). (B) ALP activity
4 staining showed violet areas with osteoblastic precursor cells (stars). (C) Toluidine blue staining
5 indicated the host inflammatory response (arrow). (D) TRAP staining highlighted the red foci of
6 osteoclastic cells (stars). Bn: Bone nodule; Sc: Scaffold; Bo: border. Bar: 200 μ m. Pictures are
7 representative of n=12 samples (2 substitutes per mice x2 mice x3 independent experiments).
8 Semi quantitative analysis of this histological study was reported in Table 1.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Fig. 5. The GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] immobilized on TCP/HA substitutes potentiates the *in***
23 ***vivo* vascularization of the devices.** (A) Macroscopic views of the capillaries network
24 surrounding each type of constructs. White bar: 5 mm. (B,C) Automatic computerized vessel tree
25 segmentation decomposed the capillaries areas in a sum of objects discriminating intermediary
26 (segments) and terminal (branches) degrees of ramification before (B) and after (C)
27 skeletonization. Black bar: 2 mm. (D) Automatic computerized quantification of the vascular
28 elements number. Data are mean values \pm sd from n=12 samples (4 cardinal areas per scaffold x2
29 scaffolds per mice x2 mice per conditions x2 independent experiments; *p<0.05; **p<0.01;
30 ***p<0.001).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4 Discussion

Ces travaux démontrent que les mimétiques potentialisent les propriétés de prolifération, de migration et de différenciation ostéoblastique des CSM de rat mais également celles des CSM humaines et ce de façon plus efficace. Ces résultats suggèrent l'intérêt de l'utilisation des mimétiques dans le cadre des thérapies de régénération osseuse passant par une formation osseuse de type membranaire. Cependant, aucun résultat n'existe actuellement sur les effets des mimétiques sur la différenciation chondrogénique des CSM humaines. Ces données permettraient de définir complètement les propriétés différenciatrices des mimétiques sur cette population cellulaire.

Les expériences de formation osseuse ectopique montrent que l'association de CSMh à des biomatériaux phosphocalciques permet la formation d'os en site sous-cutané. Étonnement, l'association des GAG mimétiques aux CSMh conduit à une absence de formation osseuse. Cependant, nous avons observé une augmentation du recrutement des ostéoclastes et de l'angiogénèse autour de l'implant. Ces résultats sont en apparence opposition avec les résultats obtenus par Lafont et al. qui avaient démontré que les mimétiques des GAG permettaient une formation osseuse efficace (Lafont et al., 2004).

Nos résultats obtenus *in vitro*, montrant que les mimétiques induisent la différenciation ostéoblastique des CSMh, et *in vivo*, montrant que les mimétiques sont associés à une absence de formation osseuse sont discordants. Pour expliquer ces différences, notre hypothèse est que dans ce de greffe en site ectopique sous cutané, site qui n'est pas favorable à l'ostéof ormation, le recrutement de progéniteurs ostéoblastiques endogènes capables de sécréter localement les facteurs ostéoinducteurs n'a pas été possible. Cependant, les capacités mobilisatrices des GAG mimétiques sur les cellules hématopoïétiques (Albanese et al., 2009) a put permettre le recrutement de progéniteurs macrophagiques qui ont pu se différencier en ostéoclastes et ainsi perturber la balance ostéoblastes/ostéoclastes sur ce site ectopique. Nous suggérons que des tests de formation osseuse en site orthotopique, comme ceux réalisés avec HARP, permettraient certainement de valider les effets ostéoinducteurs des mimétiques sur les progéniteurs ostéoblastiques résidents ou sur les produits de thérapie cellulaire co-implantées grâce à leurs capacités à potentialiser l'activité des facteurs de croissances endogènes. Enfin, l'effet des mimétiques n'a pas été complètement négatif, puisqu'il a clairement permis de stimuler la vascularisation de l'implant, certainement par une potentialisation des effets des facteurs de croissance angiogéniques présents.

PERSPECTIVES

Perspectives

1 HARP, le développement et la réparation osseuse

La croissance osseuse et la réparation des os longs passent par un processus nommé formation osseuse endochondrale. Ce processus implique la formation d'une esquisse cartilagineuse avant l'ossification proprement dite. Lors de la croissance osseuse, le cartilage s'organise en différentes zones où les chondrocytes ne présentent pas les mêmes propriétés. La zone distale contient des chondrocytes quiescents synthétisant une matrice principalement composée de collagène 2. La zone proliférative se trouve en position proximale et contient des chondrocytes en prolifération s'organisant en chapelet cellulaires. Enfin, les cellules entrent dans une phase qualifiée d'hypertrophique. Elles changent leur production matricielle en arrêtant la synthèse de collagène 2 au profit de celle de collagène 10, minéralisent leur matrice et synthétisent des protéases. Ces modifications matricielles permettent une invasion vasculaire, l'arrivée de chondroclastes qui dégradent la matrice avant l'arrivée des ostéoblastes qui formeront la matrice osseuse. La réparation osseuse suit les mêmes étapes que la croissance osseuse.

1.1 Développement osseux

HARP est surexprimé durant le développement du cartilage et des plaques de croissance, ainsi que dans le callus durant la régénération osseuse (Dreyfus et al., 1998b; Imai et al., 1998; Petersen and Rafii, 2001; Petersen et al., 2004). Cette expression a été associée à la migration des progéniteurs ostéoblastiques dans la zone d'ossification, ainsi qu'à la potentialisation des propriétés des ostéoblastes. Nos résultats suggèrent que HARP pourrait également avoir un rôle dans l'induction de l'hypertrophie chondrocytaire. Ils pourraient donc expliquer ceux obtenus par Imai et al. qui ont montré que les souris inactivées pour HARP présentaient un retard de croissance (Imai et al., 2009). En effet, l'absence de HARP dans les plaques de croissance peut résulter en un retard de l'hypertrophie et donc à un ralentissement de la croissance osseuse. Une analyse réalisée par Lehman et al. a montré que les plaques de croissances de ces animaux avaient une morphologie d'apparence normale. Cependant, ces résultats ne s'intéressent pas aux constituants matriciels du cartilage de conjugaison des souris KO. Il serait donc intéressant d'étudier les protéines et GAG matriciels spécifiques de l'hypertrophie ainsi que le statut de la minéralisation des plaques de croissance de ces animaux. En effet, si ces paramètres étaient également diminués, cela confirmerait notre hypothèse.

1.2 Fractures et thérapies ostéoréparatrices

Lors des fractures réfractaires aux traitements habituels, une des stratégies actuelles consiste à associer de la BMP2 aux greffes de tissus osseux (autologue ou allogénique). Ce traitement permet une formation osseuse de type membranaire efficace. Cependant, quelques cas de trop forte minéralisation ou d'ostéolyse de la zone réparée ont été observées (Balseiro and Nottmeier, 2010; Lewandrowski, Nanson, and Calderon, 2007; Owens et al., 2011). Il semble donc nécessaire d'obtenir un os fonctionnel présentant les mêmes caractéristiques que l'os préexistant. Pour cela, l'obtention d'une régénération basée sur une formation osseuse endochondrale, impliquant la présence de chondrocytes hypertrophiques qui réguleront cette réparation, est importante. D'après nos résultats l'association de HARP à des CSMh et à des biomatériaux, permettant une réparation osseuse de type endochondrale, semble être une alternative intéressante et novatrice par rapport à la BMP2.

Les GAG sont finement régulés durant la réparation osseuse (Song et al., 2006). Ils régulent les propriétés des facteurs de croissance et assurent le maintien de la MEC (Bramono et al., 2012; Choocheep et al., 2010). Les propriétés structurales et fonctionnelles des mimétiques des GAG en font des molécules d'intérêt dans les thérapies régénératrices. Nous avons montré que les mimétiques des GAG pouvaient être liés covalamment aux biomatériaux phosphocalcique. HARP étant un HBGF, son association à de telles constructions pourrait permettre un greffage plus efficace de ce facteur de croissance aux biomatériaux et une potentialisation de ses propriétés sur les cellules co-implantées ou résidentes. Nos résultats montrent que HARP potentialise la différenciation chondrocytaire des CSMh *in vitro* et permet une formation osseuse de type endochondral dans des modèles de défauts orthotopiques *in vivo*. L'association de HARP aux mimétiques pourrait donc être intéressante dans le cadre des thérapies régénératrices osseuses.

2 HARP et l'arthrose

L'arthrose est une des premières causes de handicap physique (McAlindon 2012). Cette pathologie dégénérative est associée à une dégradation du cartilage et une douleur de l'articulation amenant à une baisse de la mobilité du patient. La forte prévalence de l'arthrose, entre 19% et 28% des personnes âgées de plus de 45 ans (Suri, Morgenroth, and Hunter, 2012) en fait un problème de santé public majeur (Bertrand et al., 2010). Durant l'arthrose, les chondrocytes articulaires se différencient en chondrocytes hypertrophiques. Ces modifications cellulaires sont associées à une minéralisation de la matrice et à la pousse de spicules osseux sur le cartilage appelés ostéophytes, suivant un mécanisme ressemblant à l'ostéoformation endochondrale. Le cartilage, normalement avasculaire, subi également une invasion de vaisseaux sanguins. Au niveau tissulaire, l'arthrose est associée à une diminution du

contenu en glycosaminoglycannes sulfatés, une minéralisation de la matrice et à une baisse de la cellularité (Kawaguchi, 2008). Ces modifications tissulaires sont associées à une forte inflammation dans l'articulation.

HARP induit la production de molécule de la MEC par les chondrocytes (Tapp et al., 1999). De plus, HARP présente des propriétés angiogéniques (Christman et al., 2005; Souttou, Raulais, and Vigny, 2001). Durant l'arthrose, la synovie présente un fort taux de HARP par rapport à une articulation saine. Jusqu'à maintenant, cette observation a été interprétée comme

1) un effet protecteur de HARP permettant d'augmenter la synthèse de MEC pour compenser la dégradation cartilagineuse associée à cette pathologie

2) à une induction de l'angiogénèse, donc comme participant à un des symptômes de l'arthrose (Pufe et al., 2003a; Pufe et al., 2003b).

Certains travaux émettent l'hypothèse que les CSMh pourraient être impliquées dans la formation des ostéophytes (pour revue (van der Kraan and van den Berg, 2007)). Nos résultats sur la différenciation chondrocytaire hypertrophique des CSMh suggèrent également que HARP pourrait jouer un rôle important dans la pousse de ces excroissances osseuses.

Enfin, le traitement par HARP de lymphocyte B issus de sang périphérique humain induit la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL1- β , l'IL-6, et le TNF- α (Achour et al., 2008). Ces protéines sont également surexprimées dans la synovie lors de l'arthrose ((Madry, Luyten, and Facchini, 2011)). HARP pourrait donc également être impliqué dans la forte inflammation observée dans l'articulation durant l'arthrose. Afin d'évaluer l'influence de HARP dans la progression des pathologies arthrosiques, il serait intéressant d'étudier des modèles d'arthrose induite par menisectomie, technique n'impliquant pas une inflammation chimiquement induite, chez les souris KO ou surexprimant HARP. De la même façon, il serait intéressant d'évaluer les effets de HARP seul injecté dans la capsule articulaire sur une éventuelle émergence d'une pathologie arthritique chez l'animal.

Le laboratoire CRRET a développé des peptides dérivés de HARP codant pour les différents domaines fonctionnels de HARP, dont les applications font l'objet d'un brevet CNRS (Courty, FR 2 701 955-B1 PCT en cours 3530PCT/CA). Ces peptides rentrent en compétition avec la protéine complète pour la liaison aux récepteurs. Ainsi, le peptide correspondant à la partie C-terminale de HARP (p111-136) rentre en compétition avec HARP pour les récepteurs RPTPz, ALK et la nucléoline de surface. Le traitement de tumeurs induites chez la souris par ce peptide induit une diminution de l'angiogénèse de ces tumeurs (Hamma-Kourbali et al., 2011). L'utilisation de ce peptide durant l'arthrose pourrait ainsi permettre de diminuer l'angiogénèse anormale du cartilage durant cette pathologie.

Le peptide p65-97 entre lui en compétition avec HARP pour sa liaison à l'héparine (Hamma-Kourbali et al., 2008). La liaison de HARP aux GAG permet de potentialiser son action mais aussi de le concentrer localement. Durant l'arthrose, on observe une forte concentration de HARP dans la synovie, au contact direct du cartilage articulaire. Nos résultats ont montré que HARP induit la différenciation hypertrophique durant la chondroinduction. L'engagement dans la voie hypertrophique des chondrocytes articulaires est un des symptômes de l'arthrose et participe activement à la dégradation de la matrice (Bertrand et al., 2010). Le traitement de cartilage arthrosé avec p65-97 pourrait permettre de relarguer l'HARP accumulé dans la matrice cartilagineuse et ainsi diminuer les processus de différenciation hypertrophique.

Il serait donc intéressant, en premier lieu, de valider les effets d'induction de l'hypertrophie de HARP sur des chondrocytes articulaires *in vitro*. Une fois ces données obtenues, il serait nécessaire d'évaluer les propriétés de ces peptides sur les chondrocytes et tester leur capacité à inhiber ou ralentir le processus de différenciation. Enfin, des tests *in vivo* sur des modèles d'arthrose induite chez l'animal pourraient permettre de valider l'intérêt thérapeutique de ces peptides, que ce soit sur l'hypertrophie chondrocytaire, mais également sur la vascularisation se développant durant l'arthrose.

Ces données pourraient permettre l'émergence de nouveaux traitements pharmaceutiques dans le traitement de la progression de la dégénérescence arthrosique.

Lors de l'arthrose, on observe un fort taux de HARP dans la synovie (Pufe et al., 2003a; Pufe et al., 2007; Pullig et al., 2000), associé à une diminution de la quantité de GAG sulfatés dans la matrice cartilagineuse (Kawaguchi, 2008). Cela suggère d'une part qu'il y a moins de GAG sulfatés dans la MEC du cartilage arthrosé, mais également que les GAG du cartilage arthrosé ne présentent pas les mêmes propriétés que ceux retrouvés en condition normale. Il a été montré que le traitement par HARP de chondrocyte induisait la production de GAG (Tapp et al., 1999). Cependant, les propriétés biochimiques et biologiques de ces GAG n'ont pas été évaluées. Il serait donc intéressant d'étudier quantitativement la répartition des différents types de GAG et qualitativement, la longueur des chaînes, les taux de sulfatation et d'acétylation, leur affinité pour les HBGF, et leurs propriétés biologiques sur les chondrocytes. Ces modulations du contenu glycanique de la MEC pourront être évalués lors de la culture de chondrocytes normaux ou arthrosiques *in vitro*, en présence de HARP, mais également lors de la dégénérescence arthrosique chez l'homme. Ces résultats pourraient fournir des données fondamentales utiles dans la compréhension de la progression des maladies arthrosiques.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Achour, A., M'Bika J, P., Baudouin, F., Caruelle, D., and Courty, J. (2008). Pleiotrophin induces expression of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *Biochimie* **90**(11-12), 1791-5.
- Adams, S. L., Cohen, A. J., and Lassoova, L. (2007). Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol* **213**(3), 635-41.
- Albanese, P., Caruelle, D., Frescaline, G., Delbe, J., Petit-Cocault, L., Huet, E., Charnaux, N., Uzan, G., Papy-Garcia, D., and Courty, J. (2009). Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights. *Exp Hematol* **37**(9), 1072-83.
- Alexakis, C., Mestries, P., Garcia, S., Petit, E., Barbier, V., Papy-Garcia, D., Sagot, M. A., Barritault, D., Caruelle, J. P., and Kern, P. (2004). Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor-beta1. *FASEB J* **18**(10), 1147-9.
- Amet, L. E., Lauri, S. E., Hienola, A., Croll, S. D., Lu, Y., Levorse, J. M., Prabhakaran, B., Taira, T., Rauvala, H., and Vogt, T. F. (2001). Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol Cell Neurosci* **17**(6), 1014-24.
- Anastasov, N., Bonzheim, I., Rudelius, M., Klier, M., Dau, T., Angermeier, D., Duyster, J., Pittaluga, S., Fend, F., Raffeld, M., and Quintanilla-Martinez, L. (2010). C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica* **95**(5), 760-7.
- Antoine, M., Tag, C. G., Wirz, W., Borkham-Kamphorst, E., Sawitza, I., Gressner, A. M., and Kiefer, P. (2005). Upregulation of pleiotrophin expression in rat hepatic stellate cells by PDGF and hypoxia: implications for its role in experimental biliary liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **337**(4), 1153-64.
- Attia, M., Scott, A., Duchesnay, A., Carpentier, G., Soslowsky, L. J., Huynh, M. B., Van Kuppevelt, T. H., Gossard, C., Courty, J., Tassoni, M. C., and Martelly, I. (2011). Alterations of overused supraspinatus tendon: a possible role of glycosaminoglycans and HARP/pleiotrophin in early tendon pathology. *J Orthop Res* **30**(1), 61-71.
- Azizan, A., Gaw, J. U., Govindraj, P., Tapp, H., and Neame, P. J. (2000). Chondromodulin I and pleiotrophin gene expression in bovine cartilage and epiphysis. *Matrix Biol* **19**(6), 521-31.
- Bai, R. Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S. W., and Duyster, J. (1998). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol* **18**(12), 6951-61.
- Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C., and Duyster, J. (2000). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic

- large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* **96**(13), 4319-27.
- Balseiro, S., and Nottmeier, E. W. (2010). Vertebral osteolysis originating from subchondral cyst end plate defects in transforaminal lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Report of two cases. *Spine J* **10**(7), e6-e10.
- Bao, X., Muramatsu, T., and Sugahara, K. (2005). Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J Biol Chem* **280**(42), 35318-28.
- Barel, M., Le Romancer, M., and Frade, R. (2001). Activation of the EBV/C3d receptor (CR2, CD21) on human B lymphocyte surface triggers tyrosine phosphorylation of the 95-kDa nucleolin and its interaction with phosphatidylinositol 3 kinase. *J Immunol* **166**(5), 3167-73.
- Barritault, D., and Caruelle, J. P. (2006). [Regenerating agents (RGTAs): a new therapeutic approach]. *Ann Pharm Fr* **64**(2), 135-44.
- Bernard-Pierrot, I., Delbe, J., Caruelle, D., Barritault, D., Courty, J., and Milhiet, P. E. (2001). The lysine-rich C-terminal tail of heparin affin regulatory peptide is required for mitogenic and tumor formation activities. *J Biol Chem* **276**(15), 12228-34.
- Bernard-Pierrot, I., Delbe, J., Rouet, V., Vigny, M., Kerros, M. E., Caruelle, D., Raulais, D., Barritault, D., Courty, J., and Milhiet, P. E. (2002). Dominant negative effectors of heparin affin regulatory peptide (HARP) angiogenic and transforming activities. *J Biol Chem* **277**(35), 32071-7.
- Bernard-Pierrot, I., Heroult, M., Lemaitre, G., Barritault, D., Courty, J., and Milhiet, P. E. (1999). Glycosaminoglycans promote HARP/PTN dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **266**(2), 437-42.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-77.
- Bertrand, J., Cromme, C., Umlauf, D., Frank, S., and Pap, T. (2010). Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(10), 1594-601.
- Bi, Y., Stuelten, C. H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R. V., Robey, P. G., Chen, X. D., and Young, M. F. (2005). Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* **280**(34), 30481-9.
- Bianco, P. (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* **117**(20), 5281-8.
- Bielby, R., Jones, E., and McGonagle, D. (2007). The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* **38 Suppl 1**, S26-32.
- Blanquaert, F., Barritault, D., and Caruelle, J. P. (1999). Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression. *J Biomed Mater Res* **44**(1), 63-72.
- Blundell, C. D., Deangelis, P. L., and Almond, A. (2006). Hyaluronan: the absence of amide-carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models. *Biochem J* **396**(3), 487-98.

- Bowden, E. T., Stoica, G. E., and Wellstein, A. (2002). Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase. *J Biol Chem* **277**(39), 35862-8.
- Bragulla, H. H., and Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* **214**(4), 516-59.
- Bramono, D. S., Murali, S., Rai, B., Ling, L., Poh, W. T., Lim, Z. X., Stein, G. S., Nurcombe, V., van Wijnen, A. J., and Cool, S. M. (2012). Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Bone* **50**(4), 954-64.
- Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* **327** (Pt 1), 1-16.
- Carey, D. J., Conner, K., Asundi, V. K., O'Mahony, D. J., Stahl, R. C., Showalter, L., Cizmeci-Smith, G., Hartman, J., and Rothblum, L. I. (1997). cDNA cloning, genomic organization, and in vivo expression of rat N-syndecan. *J Biol Chem* **272**(5), 2873-9.
- Carson, J. S., and Bostrom, M. P. (2007). Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* **38** Suppl 1, S33-7.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**(11), 2739-49.
- Chauhan, A. K., Li, Y. S., and Deuel, T. F. (1993). Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2), 679-82.
- Chebbi, C. K., Kichenin, K., Amar, N., Nourry, H., Warnet, J. M., Barritault, D., and Baudouin, C. (2008). [Pilot study of a new matrix therapy agent (RGTA OTR4120) in treatment-resistant corneal ulcers and corneal dystrophy]. *J Fr Ophthalmol* **31**(5), 465-71.
- Chen, H., Rubin, E., Zhang, H., Chung, S., Jie, C. C., Garrett, E., Biswal, S., and Sukumar, S. (2005). Identification of transcriptional targets of HOXA5. *J Biol Chem* **280**(19), 19373-80.
- Chen, M., Zhu, M., Awad, H., Li, T. F., Sheu, T. J., Boyce, B. F., Chen, D., and O'Keefe, R. J. (2008). Inhibition of beta-catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. *J Cell Sci* **121**(Pt 9), 1455-65.
- Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., Bierling, P., Hernigou, P., Layrolle, P., and Rouard, H. (2009). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* **31**(2), 270-8.
- Choocheep, K., Hatano, S., Takagi, H., Watanabe, H., Kimata, K., and Kongtawelert, P. (2010). Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J Biol Chem* **285**(27), 21114-25.
- Christman, K. L., Fang, Q., Kim, A. J., Sievers, R. E., Fok, H. H., Candia, A. F., Colley, K. J., Herradon, G., Ezquerra, L., Deuel, T. F., and Lee, R. J. (2005). Pleiotrophin induces formation of functional neovasculature in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **332**(4), 1146-52.

- Clark, D. E., Lord, E. A., and Suttie, J. M. (2006). Expression of VEGF and pleiotrophin in deer antler. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **288**(12), 1281-93.
- Colombier, M. L., Lafont, J., Blanquaert, F., Caruelle, J. P., Barritault, D., and Saffar, J. L. (1999). A single low dose of RGTA, a new healing agent, hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cells Tissues Organs* **164**(3), 131-40.
- Coquelin, L., Fialaire-Legendre, A., Roux, S., Poignard, A., Bierling, P., Hernigou, P., Chevallier, N., and Rouard, H. (2012). In Vivo and In Vitro Comparison of Three Different Allografts Vitalized with Human Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*.
- Couchman, J. R. (2010). Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 89-114.
- Courty, J., Dauchel, M. C., Caruelle, D., Perderiset, M., and Barritault, D. (1991). Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* **180**(1), 145-51.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**(Pt 11), 2204-13.
- Dejean, E., Foisseau, M., Lagarrigue, F., Lamant, L., Prade, N., Marfak, A., Delsol, G., Giuriato, S., Gaits-Iacovoni, F., and Meggetto, F. (2012). ALK+ALCLs induce cutaneous, HMGB-1-dependent IL-8/CXCL8 production by keratinocytes through NF-kappaB activation. *Blood* **119**(20), 4698-707.
- del Olmo, N., Gramage, E., Alguacil, L. F., Perez-Pinera, P., Deuel, T. F., and Herradon, G. (2009). Pleiotrophin inhibits hippocampal long-term potentiation: a role of pleiotrophin in learning and memory. *Growth Factors* **27**(3), 189-94.
- Demers, C., Hamdy, C. R., Corsi, K., Chellat, F., Tabrizian, M., and Yahia, L. (2002). Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng* **12**(1), 15-35.
- Desgranges, P., Barbaud, C., Caruelle, J. P., Barritault, D., and Gautron, J. (1999). A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J* **13**(6), 761-6.
- Doblare, M., and Garcia, J. M. (2003). On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. *Acta Cient Venez* **54**(1), 58-75.
- Dombrowski, C., Song, S. J., Chuan, P., Lim, X., Susanto, E., Sawyer, A. A., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2009). Heparan sulfate mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **18**(4), 661-70.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J. R., Begot, L., Holy, X., and Lataillade, J. J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* **205**(2), 228-36.
- Dreyfus, J., Brunet-de Carvalho, N., Duprez, D., Raulais, D., and Vigny, M. (1998a). HB-GAM/pleiotrophin but not RIHB/midkine enhances chondrogenesis in micromass culture. *Exp Cell Res* **241**(1), 171-80.

- Dreyfus, J., Brunet-de Carvalho, N., Duprez, D., Raulais, D., and Vigny, M. (1998b). HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg. *Int J Dev Biol* **42**(2), 189-98.
- Escartin, Q., Lallam-Laroye, C., Baroukh, B., Morvan, F. O., Caruelle, J. P., Godeau, G., Barritault, D., and Saffar, J. L. (2003). A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J* **17**(6), 644-51.
- Esko, J., Kimata, K., Lindhal, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In "Essentials of Glycobiology 2nd Edition" (T. C. o. Glycobiology, Ed.), Vol. 16, La Jolla, California.
- Espinos, E., Duplantier, M. M., Giuriato, S., Allouche, M., Sabourdy, F., Delsol, G., Lamant, L. (2005). Anaplastic lymphoma kinase et lymphomes: aspects physiopathologiques et cliniques. *Hematologie* **11**(4), 265-76.
- Fisher, L. W., Termine, J. D., and Young, M. F. (1989). Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* **264**(8), 4571-6.
- Fishman, J. A., Greenwald, M. A., and Grossi, P. A. (2012). Transmission of Infection With Human Allografts: Essential Considerations in Donor Screening. *Clin Infect Dis*.
- Fukada, M., Fujikawa, A., Chow, J. P., Ikematsu, S., Sakuma, S., and Noda, M. (2006). Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization. *FEBS Lett* **580**(17), 4051-6.
- Fukai, A., Kawamura, N., Saito, T., Oshima, Y., Ikeda, T., Kugimiya, F., Higashikawa, A., Yano, F., Ogata, N., Nakamura, K., Chung, U. I., and Kawaguchi, H. (2010). Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum* **62**(3), 826-36.
- Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., and Tsuji, K. (2004). Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* **22**(5), 649-58.
- Gallagher, J. T. (2001). Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest* **108**(3), 357-61.
- Gao, S. B., Feng, Z. J., Xu, B., Wu, Y., Yin, P., Yang, Y., Hua, X., and Jin, G. H. (2009). Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin. *Oncogene* **28**(46), 4095-104.
- Garcia-Filipe, S., Barbier-Chassefiere, V., Alexakis, C., Huet, E., Ledoux, D., Kerros, M. E., Petit, E., Barritault, D., Caruelle, J. P., and Kern, P. (2007). RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, is a possible long-term active agent to heal burned skin. *J Biomed Mater Res A* **80**(1), 75-84.
- Garwood, J., Heck, N., Reichardt, F., and Faissner, A. (2003). Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* **278**(26), 24164-73.

- Ge, Z., Hu, Y., Heng, B. C., Yang, Z., Ouyang, H., Lee, E. H., and Cao, T. (2006). Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* **55**(3), 493-500.
- Geng, Y., McQuillan, D., and Roughley, P. J. (2006). SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol* **25**(8), 484-91.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., and Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury* **36 Suppl 3**, S20-7.
- Granero-Molto, F., Weis, J. A., Miga, M. I., Landis, B., Myers, T. J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E. D., Mortlock, D. P., and Spagnoli, A. (2009). Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* **27**(8), 1887-98.
- Gruber, R., Karreth, F., Kandler, B., Fuerst, G., Rot, A., Fischer, M. B., and Watzek, G. (2004). Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* **15**(1), 29-35.
- Gu, D., Yu, B., Zhao, C., Ye, W., Lv, Q., Hua, Z., Ma, J., and Zhang, Y. (2007). The effect of pleiotrophin signaling on adipogenesis. *FEBS Lett* **581**(3), 382-8.
- Hamma-Kourbali, Y., Bermek, O., Bernard-Pierrot, I., Karaky, R., Martel-Renoir, D., Frechault, S., Courty, J., and Delbe, J. (2011). The synthetic peptide P111-136 derived from the C-terminal domain of heparin affin regulatory peptide inhibits tumour growth of prostate cancer PC-3 cells. *BMC Cancer* **11**, 212.
- Hamma-Kourbali, Y., Bernard-Pierrot, I., Heroult, M., Dalle, S., Caruelle, D., Milhiet, P. E., Fernig, D. G., Delbe, J., and Courty, J. (2008). Inhibition of the mitogenic, angiogenic and tumorigenic activities of pleiotrophin by a synthetic peptide corresponding to its C-thrombospondin repeat-I domain. *J Cell Physiol* **214**(1), 250-9.
- Hanada, K., Dennis, J. E., and Caplan, A. I. (1997). Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* **12**(10), 1606-14.
- Hashimoto-Gotoh, T., Ohnishi, H., Tsujimura, A., Tsunozuka, H., Imai, K., Masuda, H., and Nakamura, T. (2004). Bone mass increase specific to the female in a line of transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1. *J Bone Miner Metab* **22**(3), 278-82.
- Haupt, L. M., Murali, S., Mun, F. K., Teplyuk, N., Mei, L. F., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2009). The heparan sulfate proteoglycan (HSPG) glypican-3 mediates commitment of MC3T3-E1 cells toward osteogenesis. *J Cell Physiol* **220**(3), 780-91.
- Hausser, H. J., Ruegg, M. A., Brenner, R. E., and Ksiazek, I. (2007). Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth. *Histochem Cell Biol* **127**(4), 363-74.
- Heiss, C., Wong, M. L., Block, V. I., Lao, D., Real, W. M., Yeghiazarians, Y., Lee, R. J., and Springer, M. L. (2008). Pleiotrophin induces nitric oxide dependent migration of endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol* **215**(2), 366-73.
- Heroult, M., Bernard-Pierrot, I., Delbe, J., Hamma-Kourbali, Y., Katsoris, P., Barritault, D., Papadimitriou, E., Plouet, J., and Courty, J. (2004). Heparin affin

- regulatory peptide binds to vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene* **23**(9), 1745-53.
- Hida, H., Jung, C. G., Wu, C. Z., Kim, H. J., Kodama, Y., Masuda, T., and Nishino, H. (2003). Pleiotrophin exhibits a trophic effect on survival of dopaminergic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **17**(10), 2127-34.
- Hienola, A., Pekkanen, M., Raulo, E., Vanttola, P., and Rauvala, H. (2004). HB-GAM inhibits proliferation and enhances differentiation of neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **26**(1), 75-88.
- Hienola, A., Tumova, S., Kuleskiy, E., and Rauvala, H. (2006). N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J Cell Biol* **174**(4), 569-80.
- Himburg, H. A., Muramoto, G. G., Daher, P., Meadows, S. K., Russell, J. L., Doan, P., Chi, J. T., Salter, A. B., Lento, W. E., Reya, T., Chao, N. J., and Chute, J. P. (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **16**(4), 475-82.
- Hocking, A. M., Shinomura, T., and McQuillan, D. J. (1998). Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* **17**(1), 1-19.
- Hyun, S. J., Han, D. K., Choi, S. H., Chai, J. K., Cho, K. S., Kim, C. K., and Kim, C. S. (2005). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* **76**(10), 1667-74.
- Imai, S., Heino, T. J., Hienola, A., Kurata, K., Buki, K., Matsusue, Y., Vaananen, H. K., and Rauvala, H. (2009). Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone* **44**(5), 785-94.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M., and Rauvala, H. (1998). Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol* **143**(4), 1113-28.
- Inder, K. L., Lau, C., Loo, D., Chaudhary, N., Goodall, A., Martin, S., Jones, A., van der Hoeven, D., Parton, R. G., Hill, M. M., and Hancock, J. F. (2009). Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J Biol Chem* **284**(41), 28410-9.
- Iozzo, R. V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* **274**(27), 18843-6.
- Ishijima, M., Suzuki, N., Hozumi, K., Matsunobu, T., Kosaki, K., Kaneko, H., Hassell, J. R., Arikawa-Hirasawa, E., and Yamada, Y. (2012). Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation. *Matrix Biol* **31**(4), 234-45.
- Istvanffy, R., Kroger, M., Eckl, C., Gitzelmann, S., Vilne, B., Bock, F., Graf, S., Schiemann, M., Keller, U. B., Peschel, C., and Oostendorp, R. A. (2011). Stromal pleiotrophin regulates repopulation behavior of hematopoietic stem cells. *Blood* **118**(10), 2712-22.
- Jackson, R. A., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2006). Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of osteogenesis. *Gene* **379**, 79-91.
- Jaklenec, A., Stamp, A., Deweerd, E., Sherwin, A., and Langer, R. (2012). Progress in the tissue engineering and stem cell industry "are we there yet?" *Tissue Eng Part B Rev* **18**(3), 155-66.

- Kaksonen, M., Pavlov, I., Voikar, V., Lauri, S. E., Hienola, A., Riekkii, R., Lakso, M., Taira, T., and Rauvala, H. (2002). Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. *Mol Cell Neurosci* **21**(1), 158-72.
- Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* **29**(4), 248-53.
- Kanczler, J. M., Ginty, P. J., White, L., Clarke, N. M., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M., and Oreffo, R. O. (2009). The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* **31**(6), 1242-50.
- Karageorgiou, V., and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**(27), 5474-91.
- Kasten, P., Beyen, I., Niemeyer, P., Luginbuhl, R., Bohner, M., and Richter, W. (2008). Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* **4**(6), 1904-15.
- Kawaguchi, H. (2008). Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* **25**(1), 1-6.
- Kemmis, C. M., Vahdati, A., Weiss, H. E., and Wagner, D. R. (2010). Bone morphogenetic protein 6 drives both osteogenesis and chondrogenesis in murine adipose-derived mesenchymal cells depending on culture conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **401**(1), 20-5.
- Kempen, D. H., Lu, L., Heijink, A., Hefferan, T. E., Creemers, L. B., Maran, A., Yaszemski, M. J., and Dhert, W. J. (2009). Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* **30**(14), 2816-25.
- Kilpelainen, I., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Avikainen, H., Fath, M., Linhardt, R. J., Raulo, E., and Rauvala, H. (2000). Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding beta -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat. *J Biol Chem* **275**(18), 13564-70.
- Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., Hubbard, S. R., Dustin, M. L., and Burden, S. J. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* **135**(2), 334-42.
- Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H. B., and Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem* **273**(17), 10702-8.
- Knudson, C. B., and Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* **12**(2), 69-78.
- Kokolakis, G., Mikelis, C., Papadimitriou, E., Courty, J., Karetsoy, E., and Katsoris, P. (2006). Effect of heparin affinity regulatory peptide on the expression of vascular endothelial growth factor receptors in endothelial cells. *In Vivo* **20**(5), 629-35.
- Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Kretschmer, P. J., and Bohlen, P. (1990). Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous,

- developmentally regulated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **172**(2), 850-4.
- Kretschmer, P. J., Fairhurst, J. L., Hulmes, J. D., Popjes, M. L., Bohlen, P., and Kovessi, I. (1993). Genomic organization of the human HBNF gene and characterization of an HBNF variant protein as a splice mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **192**(2), 420-9.
- Krueger, N. X., and Saito, H. (1992). A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16), 7417-21.
- Laaroubi, K., Delbe, J., Vacherot, F., Desgranges, P., Tardieu, M., Jaye, M., Barritault, D., and Courty, J. (1994). Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affini regulatory peptide. *Growth Factors* **10**(2), 89-98.
- Lafont, J., Blanquaert, F., Colombier, M. L., Barritault, D., Carueelle, J. P., and Saffar, J. L. (2004). Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif Tissue Int* **75**(6), 517-25.
- Lai, S., Czubyko, F., Riegel, A. T., and Wellstein, A. (1992). Structure of the human heparin-binding growth factor gene pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* **187**(2), 1113-22.
- Lee, J. Y., Jeong, W., Lim, W., Kim, J., Bazer, F. W., Han, J. Y., and Song, G. (2012). Chicken pleiotrophin: regulation of tissue specific expression by estrogen in the oviduct and distinct expression pattern in the ovarian carcinomas. *PLoS One* **7**(4), e34215.
- LeGeros, R. Z., Lin, S., Rohanizadeh, R., Mijares, D., and LeGeros, J. P. (2003). Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* **14**(3), 201-9.
- Lehmann, W., Schinke, T., Schilling, A. F., Catala-Lehnen, P., Gebauer, M., Pogoda, P., Gerstenfeld, L. C., Rueger, J. M., Einhorn, T. A., and Amling, M. (2004). Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone* **35**(6), 1247-55.
- Lewandrowski, K. U., Nanson, C., and Calderon, R. (2007). Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases. *Spine J* **7**(5), 609-14.
- Li, G., Bunn, J. R., Mushipe, M. T., He, Q., and Chen, X. (2005a). Effects of pleiotrophin (PTN) over-expression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair. *Calcif Tissue Int* **76**(4), 299-306.
- Li, G., Cui, Y., McIlmurray, L., Allen, W. E., and Wang, H. (2005b). rhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* **23**(3), 680-5.
- Li, G., Hu, Y., Huo, Y., Liu, M., Freeman, D., Gao, J., Liu, X., Wu, D. C., and Wu, H. (2006). PTEN deletion leads to up-regulation of a secreted growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* **281**(16), 10663-8.
- Li, Y. S., Hoffman, R. M., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., and Deuel, T. F. (1992). Characterization of the human

- pleiotrophin gene. Promoter region and chromosomal localization. *J Biol Chem* **267**(36), 26011-6.
- Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J., and Deuel, T. F. (1990). Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* **250**(4988), 1690-4.
- Liang, G., Yang, Y., Oh, S., Ong, J. L., Zheng, C., Ran, J., Yin, G., and Zhou, D. (2005). Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* **26**(20), 4265-71.
- Liedert, A., Augat, P., Ignatius, A., Hausser, H. J., and Claes, L. (2004). Mechanical regulation of HB-GAM expression in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(3), 951-8.
- Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L., and Ignatius, A. (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1), 1-5.
- Liedert, A., Kassem, M., Claes, L., and Ignatius, A. (2009). Mechanosensitive promoter region in the human HB-GAM gene. *Biochem Biophys Res Commun* **387**(2), 289-93.
- Ling, L., Murali, S., Dombrowski, C., Haupt, L. M., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2006). Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells. *J Cell Physiol* **209**(3), 811-25.
- Lyon, M., and Gallagher, J. T. (1998). Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. *Matrix Biol* **17**(7), 485-93.
- M'Bika, J. P., Baudouin, F., Courty, J., and Achour, A. (2010). Host factor pleiotrophin induces human immunodeficiency virus type 1 replication associated with inflammatory cytokine expression. *J Gen Virol* **91**(Pt 5), 1346-53.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., and Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* **4**(4), 415-28.
- Madry, H., Luyten, F. P., and Facchini, A. (2011). Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **20**(3), 407-22.
- Maeda, N., He, J., Yajima, Y., Mikami, T., Sugahara, K., and Yabe, T. (2003). Heterogeneity of the chondroitin sulfate portion of phosphacan/6B4 proteoglycan regulates its binding affinity for pleiotrophin/heparin binding growth-associated molecule. *J Biol Chem* **278**(37), 35805-11.
- Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H., and Noda, M. (1996). 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* **271**(35), 21446-52.
- Mailleux, P., Preud'homme, X., Albala, N., Vanderwinden, J. M., and Vanderhaeghen, J. J. (1994). delta-9-Tetrahydrocannabinol regulates gene expression of the growth factor pleiotrophin in the forebrain. *Neurosci Lett* **175**(1-2), 25-7.

- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., and Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* **10**(2), 228-41.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., and Gerson, S. L. (2000). Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* **9**(6), 841-8.
- Manton, K. J., Leong, D. F., Cool, S. M., and Nurcombe, V. (2007). Disruption of heparan and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathways. *Stem Cells* **25**(11), 2845-54.
- Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Medecine Sciences*(17), 1252-1259.
- Mazzon, C., Anselmo, A., Cibella, J., Soldani, C., Destro, A., Kim, N., Roncalli, M., Burden, S. J., Dustin, M. L., Sarukhan, A., and Viola, A. (2012). The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche. *Blood* **118**(10), 2733-42.
- Mencej-Bedrac, S., Prezelj, J., Komadina, R., Vindisar, F., and Marc, J. (2011). -1227C>T polymorphism in the pleiotrophin gene promoter influences bone mineral density in postmenopausal women. *Mol Genet Metab* **103**(1), 76-80.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., and Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**(7308), 829-34.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., and Deuel, T. F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6), 2603-8.
- Merenmies, J., and Rauvala, H. (1990). Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* **265**(28), 16721-4.
- Milner, P. G., Li, Y. S., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Siegel, N. R., and Deuel, T. F. (1989). A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **165**(3), 1096-103.
- Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J. D., and Hurley, M. M. (2000). Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* **105**(8), 1085-93.
- Moog-Lutz, C., Degoutin, J., Gouzi, J. Y., Frobert, Y., Brunet-de Carvalho, N., Bureau, J., Creminon, C., and Vigny, M. (2005). Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* **280**(28), 26039-48.
- Moore, R., Ferretti, P., Copp, A., and Thorogood, P. (2002). Blocking endogenous FGF-2 activity prevents cranial osteogenesis. *Dev Biol* **243**(1), 99-114.

- Multhaupt, H. A., Yoneda, A., Whiteford, J. R., Oh, E. S., Lee, W., and Couchman, J. R. (2009). Syndecan signaling: when, where and why? *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 4**, 31-8.
- Muramatsu, T. (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem* **132**(3), 359-71.
- Nathan, S., Das De, S., Thambyah, A., Fen, C., Goh, J., and Lee, E. H. (2003). Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* **9**(4), 733-44.
- Neame, P. J., Young, C. N., Brock, C. W., Treep, J. T., Ganey, T. M., Sasse, J., and Rosenberg, L. C. (1993). Pleiotrophin is an abundant protein in dissociative extracts of bovine fetal epiphyseal cartilage and nasal cartilage from newborns. *J Orthop Res* **11**(4), 479-91.
- Nolo, R., Kaksonen, M., Raulo, E., and Rauvala, H. (1995). Co-expression of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) and N-syndecan (syndecan-3) in developing rat brain. *Neurosci Lett* **191**(1-2), 39-42.
- Nurcombe, V., Goh, F. J., Haupt, L. M., Murali, S., and Cool, S. M. (2007). Temporal and functional changes in glycosaminoglycan expression during osteogenesis. *J Mol Histol* **38**(5), 469-81.
- O'Brien, E. J., Frank, C. B., Shrive, N. G., Hallgrímsson, B., and Hart, D. A. (2012). Heterotopic mineralization (ossification or calcification) in tendinopathy or following surgical tendon trauma. *Int J Exp Pathol* **93**(5), 319-31.
- Obert, L., Couesmes, A., Lepage, D., Pauchot, J., Garbuio, P., Tropet Y. (2007). Consolidation osseuse et pseudarthrose des os longs : l'apport des BMP. *e-memoires de l'Académie Natioanale de Chirurgie* **6**(2), 24-30.
- Olsen, B. R., Reginato, A. M., and Wang, W. (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 191-220.
- Owens, K., Glassman, S. D., Howard, J. M., Djurasovic, M., Witten, J. L., and Carreon, L. Y. (2011). Perioperative complications with rhBMP-2 in transforaminal lumbar interbody fusion. *Eur Spine J* **20**(4), 612-7.
- Pacifici, M., Shimo, T., Gentili, C., Kirsch, T., Freeman, T. A., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., and Koyama, E. (2005). Syndecan-3: a cell-surface heparan sulfate proteoglycan important for chondrocyte proliferation and function during limb skeletogenesis. *J Bone Miner Metab* **23**(3), 191-9.
- Papadimitriou, E., Mikelis, C., Lampropoulou, E., Koutsoumpa, M., Theochari, K., Tsirmoula, S., Theodoropoulou, C., Lamprou, M., Sfaelou, E., Vourtsis, D., and Boudouris, P. (2009). Roles of pleiotrophin in tumor growth and angiogenesis. *Eur Cytokine Netw* **20**(4), 180-90.
- Papy-Garcia D., B.-C. V., Rouet V., Kerros M-E., Klochendler C., Tournaire M-C., Barritault D., Caruelle J-P., Petit E. (2005). Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. *Macromolecules*(38), 4647-4654.
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* **55**(3), 273-86.

- Pariser, H., Ezquerra, L., Herradon, G., Perez-Pinera, P., and Deuel, T. F. (2005a). Fyn is a downstream target of the pleiotrophin/receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta-signaling pathway: regulation of tyrosine phosphorylation of Fyn by pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* **332**(3), 664-9.
- Pariser, H., Perez-Pinera, P., Ezquerra, L., Herradon, G., and Deuel, T. F. (2005b). Pleiotrophin stimulates tyrosine phosphorylation of beta-adducin through inactivation of the transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Biochem Biophys Res Commun* **335**(1), 232-9.
- Pelttari, K., Steck, E., and Richter, W. (2008). The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* **39 Suppl 1**, S58-65.
- Perez-Pinera, P., Berenson, J. R., and Deuel, T. F. (2008). Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* **15**(3), 210-4.
- Perrimon, N., and Bernfield, M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**(6779), 725-8.
- Petersen, W., and Rafii, M. (2001). Immunolocalization of the angiogenetic factor pleiotrophin (PTN) in the growth plate of mice. *Arch Orthop Trauma Surg* **121**(7), 414-6.
- Petersen, W., Wildemann, B., Pufe, T., Raschke, M., and Schmidmaier, G. (2004). The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* **124**(9), 603-7.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., and Guillemain, G. (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* **18**(9), 959-63.
- Pfander, D., Swoboda, B., and Kirsch, T. (2001). Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* **159**(5), 1777-83.
- Pitaru, S., Kotev-Emeth, S., Noff, D., Kaffuler, S., and Savion, N. (1993). Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res* **8**(8), 919-29.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**(5411), 143-7.
- Poimenidi, E., Hatziapostolou, M., and Papadimitriou, E. (2009). Serum stimulates Pleiotrophin gene expression in an AP-1-dependent manner in human endothelial and glioblastoma cells. *Anticancer Res* **29**(1), 349-54.
- Polykratis, A., Katsoris, P., Courty, J., and Papadimitriou, E. (2005). Characterization of heparin affin regulatory peptide signaling in human endothelial cells. *J Biol Chem* **280**(23), 22454-61.
- Polytarchou, C., Hatziapostolou, M., and Papadimitriou, E. (2005). Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through

- activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene. *J Biol Chem* **280**(49), 40428-35.
- Polytarchou, C., Hatziapostolou, M., Poimenidi, E., Mikelis, C., Papadopoulou, A., Parthymou, A., and Papadimitriou, E. (2009). Nitric oxide stimulates migration of human endothelial and prostate cancer cells through up-regulation of pleiotrophin expression and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Int J Cancer* **124**(8), 1785-93.
- Prestayko, A. W., Lewis, B. C., and Busch, H. (1973). Purification and properties of a nucleolar endoribonuclease from Novikoff hepatoma. *Biochim Biophys Acta* **319**(3), 323-35.
- Pufe, T., Bartscher, M., Petersen, W., Tillmann, B., and Mentlein, R. (2003a). Expression of pleiotrophin, an embryonic growth and differentiation factor, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**(3), 660-7.
- Pufe, T., Bartscher, M., Petersen, W., Tillmann, B., and Mentlein, R. (2003b). Pleiotrophin, an embryonic differentiation and growth factor, is expressed in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **11**(4), 260-4.
- Pufe, T., Groth, G., Goldring, M. B., Tillmann, B., and Mentlein, R. (2007). Effects of pleiotrophin, a heparin-binding growth factor, on human primary and immortalized chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **15**(2), 155-62.
- Pullig, O., Weseloh, G., Ronneberger, D., Kakonen, S., and Swoboda, B. (2000). Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int* **67**(3), 230-40.
- Quarto, N., and Longaker, M. T. (2006). FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* **12**(6), 1405-18.
- Raulo, E., Chernousov, M. A., Carey, D. J., Nolo, R., and Rauvala, H. (1994). Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem* **269**(17), 12999-3004.
- Raulo, E., Tumova, S., Pavlov, I., Hienola, A., Lauri, S., Taira, T., and Rauvala, H. (2006). The two thrombospondin type I repeat domains of HB-GAM display a cooperative function in N-syndecan binding and regulation of synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal* **6**, 406-9.
- Rauvala, H. (1989). An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* **8**(10), 2933-41.
- Roger, J., Brajeul, V., Thomasseau, S., Hienola, A., Sahel, J. A., Guillonnet, X., and Goureau, O. (2006). Involvement of Pleiotrophin in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitor cells. *Dev Biol* **298**(2), 527-39.
- Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Caruelle, J. P., and Courty, J. (2005). A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem* **280**(38), 32792-800.
- Said, E. A., Courty, J., Svab, J., Delbe, J., Krust, B., and Hovanessian, A. G. (2005). Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *FEBS J* **272**(18), 4646-59.

- Said, E. A., Krust, B., Nisole, S., Svab, J., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. (2002). The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J Biol Chem* **277**(40), 37492-502.
- Saldana, L., Sanchez-Salcedo, S., Izquierdo-Barba, I., Bensiamar, F., Munuera, L., Vallet-Regi, M., and Vilaboa, N. (2009). Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* **5**(4), 1294-305.
- Sato, Y., Takita, H., Ohata, N., Tamura, M., and Kuboki, Y. (2002). Pleiotrophin regulates bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic osteogenesis. *J Biochem* **131**(6), 877-86.
- Sawyer, A. A., Song, S. J., Susanto, E., Chuan, P., Lam, C. X., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., and Cool, S. M. (2009). The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* **30**(13), 2479-88.
- Schaefer, L., Grone, H. J., Raslik, I., Robenek, H., Ugorcakova, J., Budny, S., Schaefer, R. M., and Kresse, H. (2000). Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney Int* **58**(4), 1557-68.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., and Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* **19**(5), 459-66.
- Schofield, K. P., Gallagher, J. T., and David, G. (1999). Expression of proteoglycan core proteins in human bone marrow stroma. *Biochem J* **343 Pt 3**, 663-8.
- Schonherr, C., Yang, H. L., Vigny, M., Palmer, R. H., and Hallberg, B. (2010). Anaplastic lymphoma kinase activates the small GTPase Rap1 via the Rap1-specific GEF C3G in both neuroblastoma and PC12 cells. *Oncogene* **29**(19), 2817-30.
- Seddon, A. P., Hulmes, J. D., Decker, M. M., Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Backer, J., Dougher-Vermazen, M., and Bohlen, P. (1994). Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor. *Protein Expr Purif* **5**(1), 14-21.
- Seghatoleslami, M. R., and Kosher, R. A. (1996). Inhibition of in vitro limb cartilage differentiation by syndecan-3 antibodies. *Dev Dyn* **207**(1), 114-9.
- Sharifi, B. G., Zeng, Z., Wang, L., Song, L., Chen, H., Qin, M., Sierra-Honigmann, M. R., Wachsmann-Hogiu, S., and Shah, P. K. (2006). Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(6), 1273-80.
- Soh, B. S., Song, C. M., Vallier, L., Li, P., Choong, C., Yeo, B. H., Lim, E. H., Pedersen, R. A., Yang, H. H., Rao, M., and Lim, B. (2007). Pleiotrophin enhances clonal growth and long-term expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**(12), 3029-37.
- Song, S. J., Hutmacher, D., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2006). Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing. *Gene* **379**, 92-100.
- Souttou, B., Carvalho, N. B., Raulais, D., and Vigny, M. (2001). Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal

- differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **276**(12), 9526-31.
- Souttou, B., Raulais, D., and Vigny, M. (2001). Pleiotrophin induces angiogenesis: involvement of the phosphoinositide-3 kinase but not the nitric oxide synthase pathways. *J Cell Physiol* **187**(1), 59-64.
- Srivastava, M., and Pollard, H. B. (1999). Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* **13**(14), 1911-22.
- Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D. J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A. T., and Wellstein, A. (2001). Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* **276**(20), 16772-9.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol* **13**(5), 612-20.
- Suri, P., Morgenroth, D. C., and Hunter, D. J. (2012). Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities. *PM R* **4**(5 Suppl), S10-9.
- Svensson, S. L., Pasupuleti, M., Walse, B., Malmsten, M., Morgelin, M., Sjogren, C., Olin, A. I., Collin, M., Schmidtchen, A., Palmer, R., and Egesten, A. (2010). Midkine and pleiotrophin have bactericidal properties: preserved antibacterial activity in a family of heparin-binding growth factors during evolution. *J Biol Chem* **285**(21), 16105-15.
- Taguchi, A., Emoto, M., Okuya, S., Fukuda, N., Nakamori, Y., Miyazaki, M., Miyamoto, S., Tanabe, K., Aburatani, H., Oka, Y., and Tanizawa, Y. (2008). Identification of Glypican3 as a novel GLUT4-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **369**(4), 1204-8.
- Take, M., Tsutsui, J., Obama, H., Ozawa, M., Nakayama, T., Maruyama, I., Arima, T., and Muramatsu, T. (1994). Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). *J Biochem* **116**(5), 1063-8.
- Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A., and Noda, M. (2006). Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci Lett* **399**(1-2), 33-8.
- Tapp, H., Hernandez, D. J., Neame, P. J., and Koob, T. J. (1999). Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage. *Matrix Biol* **18**(6), 543-56.
- Tare, R. S., Oreffo, R. O., Clarke, N. M., and Roach, H. I. (2002a). Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res* **17**(11), 2009-20.
- Tare, R. S., Oreffo, R. O., Sato, K., Rauvala, H., Clarke, N. M., and Roach, H. I. (2002b). Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochem Biophys Res Commun* **298**(3), 324-32.
- Tavella, S., Ruggiu, A., Giuliani, A., Brun, F., Canciani, B., Manescu, A., Marozzi, K., Cilli, M., Costa, D., Liu, Y., Piccardi, F., Tasso, R., Tromba, G., Rustichelli, F., and Cancedda, R. (2012). Bone turnover in wild type and pleiotrophin-

- transgenic mice housed for three months in the International Space Station (ISS). *PLoS One* **7**(3), e33179.
- Tazaki, J., Murata, M., Akazawa, T., Yamamoto, M., Ito, K., Arisue, M., Shibata, T., and Tabata, Y. (2009). BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater Eng* **19**(2-3), 141-6.
- Tezuka, K., Takeshita, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., Kikuno, R., Hashimoto-Gotoh, T. (1990). Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **173**(1), 246-251.
- Tiainen, J., Leinonen, S., Ilomaki, J., Suokas, E., Tormala, P., Waris, T., and Ashammakhi, N. (2002). Comparison of the pull-out forces of bioabsorbable polylactide/glycolide screws (Biosorb and Lactosorb) and tacks: a study on the stability of fixation in human cadaver parietal bones. *J Craniofac Surg* **13**(4), 538-43.
- Towler, D. A. (2009). Bone morphogenetic proteins. *Blood* **114**(10), 2012-3.
- Trost, Z., Trebse, R., Prezelj, J., Komadina, R., Logar, D. B., and Marc, J. (2010). A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* **46**(1), 72-80.
- Trowbridge, J. M., and Gallo, R. L. (2002). Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* **12**(9), 117R-25R.
- Tumova, S., Woods, A., and Couchman, J. R. (2000). Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem* **275**(13), 9410-7.
- Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Gillespie, J. R., and Beier, F. (2008). The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC Dev Biol* **8**, 40.
- Vacanti, J. P., and Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354** Suppl 1, S132-4.
- Vacherot, F., Delbe, J., Heroult, M., Barritault, D., Fernig, D. G., and Courty, J. (1999). Glycosaminoglycans differentially bind HARP and modulate its biological activity. *J Biol Chem* **274**(12), 7741-7.
- Vacherot, F., Laaroubi, K., Caruelle, D., Delbe, J., Barritault, D., Caruelle, J. P., and Courty, J. (1995). Upregulation of heparin-affin regulatory peptide by androgen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**(9), 647-8.
- van der Kraan, P. M., and van den Berg, W. B. (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* **15**(3), 237-44.
- Vanderwinden, J. M., Mailleux, P., Schiffmann, S. N., and Vanderhaeghen, J. J. (1992). Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol (Berl)* **186**(4), 387-406.
- Vazin, T., Becker, K. G., Chen, J., Spivak, C. E., Lupica, C. R., Zhang, Y., Worden, L., and Freed, W. J. (2009). A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* **4**(8), e6606.

- Wagner, W., Saffrich, R., and Ho, A. D. (2008). The Stromal Activity of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother* **35**(3), 185-193.
- Walters, D. K., Steinmann, P., Langsam, B., Schmutz, S., Born, W., and Fuchs, B. (2008). Identification of potential chemoresistance genes in osteosarcoma. *Anticancer Res* **28**(2A), 673-9.
- Weiss, S., Zimmermann, G., Pufe, T., Varoga, D., and Henle, P. (2009). The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* **129**(7), 989-97.
- Wessler, S., and Gitel, S. N. (1986). Pharmacology of heparin and warfarin. *J Am Coll Cardiol* **8**(6 Suppl B), 10B-20B.
- Whiteford, J. R., Behrends, V., Kirby, H., Kusche-Gullberg, M., Muramatsu, T., and Couchman, J. R. (2007). Syndecans promote integrin-mediated adhesion of mesenchymal cells in two distinct pathways. *Exp Cell Res* **313**(18), 3902-13.
- Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F., Iwabuchi, T., Saoncella, S., Calautti, E., and Goetinck, P. F. (2002). Syndecan-4: dispensable or indispensable? *Glycoconj J* **19**(4-5), 305-13.
- Yanagisawa, H., Komuta, Y., Kawano, H., Toyoda, M., and Sango, K. (2010). Pleiotrophin induces neurite outgrowth and up-regulates growth-associated protein (GAP)-43 mRNA through the ALK/GSK3beta/beta-catenin signaling in developing mouse neurons. *Neurosci Res* **66**(1), 111-6.
- Yang, X., Tare, R. S., Partridge, K. A., Roach, H. I., Clarke, N. M., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M., and Oreffo, R. O. (2003). Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res* **18**(1), 47-57.
- Yerges, L. M., Klei, L., Cauley, J. A., Roeder, K., Kammerer, C. M., Moffett, S. P., Ensrud, K. E., Nestlerode, C. S., Marshall, L. M., Hoffman, A. R., Lewis, C., Lang, T. F., Barrett-Connor, E., Ferrell, R. E., Orwoll, E. S., and Zmuda, J. M. (2009). High-density association study of 383 candidate genes for volumetric BMD at the femoral neck and lumbar spine among older men. *J Bone Miner Res* **24**(12), 2039-49.
- Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Ogawa, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Kato, Y., Mori, K. P., Toda, N., Ohno, S., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Sugawara, A., Mukoyama, M., and Nakao, K. (2012). Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* **81**(2), 160-9.
- Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D. E., and Inghirami, G. (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* **21**(7), 1038-47.
- Zizola, C. F., Julianelli, V., Bertolesi, G., Yanagishita, M., and Calvo, J. C. (2007). Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes. *Matrix Biol* **26**(6), 419-30.

Résumé

La régénération osseuse est un processus impliquant de nombreux types cellulaires comme les ostéoblastes, les chondrocytes ou les cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Les CSM possèdent des capacités de différenciation suggérant leur implication dans ce processus de réparation. La régénération osseuse est le fruit de la coordination complexe de l'activité de nombreux facteurs de croissance. Parmi eux, l'« Heparin affinis regulatory peptide » (HARP) est fortement exprimé dans le callus durant la régénération mais son rôle n'est pas clairement établi. Le but de ce travail de thèse a été (1) d'évaluer les effets de HARP sur les propriétés de migration, de prolifération et de différenciation des CSM in vitro ; (2) évaluer la capacité de HARP à induire une formation osseuse ou une régénération osseuse in vivo.

Nos résultats démontrent que HARP est chémoattractant pour les CSM et potentialise leur prolifération. De plus, nous montrons pour la première fois que le traitement de CSM par HARP durant leur chondroinduction conduit à une différenciation chondrocytaire de type hypertrophique. Ce type cellulaire est primordial dans les derniers stades de la formation osseuse endochondrale qui se met en place durant la croissance osseuse, mais également durant la réparation. L'implantation de biomatériaux associés à HARP dans un défaut osseux de condyle fémoral a conduit à la formation de cartilage et d'os dans l'implant, reproduisant le mécanisme physiologique de formation osseuse endochondrale. Le biomatériau seul n'a été envahi que par du tissu fibreux.

Durant les processus de réparation tissulaire, les glycosaminoglycannes (GAG), des chaînes polysaccharidiques sulfatées, composants majeurs de la matrice extracellulaire, participent à la modulation des effets des facteurs de croissance durant la réparation. Récemment, des mimétiques structuraux et fonctionnels des GAG ont été développés. Durant ma thèse, j'ai été associé au travail d'un doctorant de l'équipe de P. Albanese, qui a montré que des mimétiques de GAG induisent une différenciation ostéoblastique des CSM en l'absence de traitement ostéoinducteur. L'implantation sous-cutanée de biomatériaux covalamment associés aux mimétiques ont également été menées, et ont permis d'observer des potentialisations des processus de vascularisation de l'implant et de l'activité ostéoclastique. Ces résultats ont permis de valider l'intérêt des GAG mimétiques dans le cadre des thérapies de régénération osseuse.

Cette étude démontre pour la première fois les effets chondroinducteurs directs de HARP sur la production de molécules de la matrice cartilagineuse par les CSM in vitro, mais également sur la synthèse de tissu cartilagineux in vivo. Les effets de HARP observés sur la régénération osseuse confirment qu'il pourrait être un bon candidat en chirurgie orthopédique en permettant une régénération de type endochondrale typique de la réparation physiologique. De plus les nouvelles stratégies développées dans le laboratoire sur la fonctionnalisation covalente de biomatériaux par des GAG mimétiques, mériteraient d'être testées en association avec HARP, afin d'augmenter sa demi-vie et de contrôler son relargage et ses activités biologiques in vivo.

Mots clefs : « heparin affinis regulatory peptide », mimétiques des glycosaminoglycannes, régénération osseuse, endochondral, cellule stromale mésenchymateuse, ostéoblaste, chondrocyte.

Abstract

Bone regeneration is a complicated process which involved many cellular types such as osteoblasts, chondrocytes and mesenchymal stromal cells (MSC). MSC can differentiate toward chondrocytes and osteoblasts, suggesting their implication in bone regeneration processes. Bone repairment involved a complex coordination of growth factors. Among them, heparin affinis regulatory peptide (HARP) is found in callus during regeneration. However, its role is poorly understood. The aim of this thesis was (1) to evaluate HARP effects on proliferation, migration and differentiation of MSC in vitro, (2) to evaluate HARP ability to promote bone regeneration or bone formation.

Our results demonstrate that HARP has chemoattractive and proliferative properties on human MSC. Moreover, we show for the first time that HARP commits human MSC toward hypertrophy during chondrogenesis. This is of great interest since hypertrophic chondrocytes are of primary importance in the late stage of endochondral bone formation. We further tested the association of HARP to scaffolds in a model of bone regeneration in femoral defect in rat. HARP associated scaffolds showed an invasion of cartilage and bony tissues, mimicking endochondral bone formation, whereas scaffold alone was just filled with fibrous tissue.

During regenerative processes glycosaminoglycans, polysaccharides sulfated chains, are known as major components of the extracellular matrix and modulate the effects of growth factors during regenerative processes. Recently, structurally and functionally mimetics of GAG had been developed. During my PhD thesis, I was associated to the work of a doctoral student of P. Albanese who showed that GAG mimetics induce osteoblastic differentiation of MSC without any other osteoinductive treatment. The ectopic implantation of mimetic associated scaffolds didn't show effects on osteoformation but induced an enhancement of vascularization and of osteoclastic activity, both related to tissue remodeling. These results validate that GAG mimetics are of great interest in bone regenerative field.

This study demonstrates for the first time the chondroinductive potential of HARP through its ability to induce cartilage specific matrix production by MSC in vitro but also by inducing cartilage tissue synthesis in vivo. The effects of HARP observed on bone regeneration, by inducing an endochondral bone formation similar to that observed in normal bone regeneration, confirm that HARP could be a good candidate in orthopedic surgery. Moreover, scaffold covalently linked with GAG mimetics should be tested in association with HARP. This strategy could increase the half life, control the release and potentiate HARP properties in vivo.

Keywords: heparin affinis regulatory peptide, glycosaminoglycans mimetics, bone regeneration, endochondral, mesenchymal stromal cell, osteoblast, chondrocyte.

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé, Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Ecole Doctorale : ED402, Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire sur la Croissance Cellulaire, la Réparation et la Régénération Tissulaire (CRRET)
CNRS EAC 7149, Université Paris Est Créteil-Val de Marne (UPEC)
61 avenue du général de Gaulle, 94010 Créteil cedex.

Laboratoire de Bioingénierie cellulaire, tissulaire et sanguine à visée thérapeutique, EFS UITC
EA3952, Université Paris Est Créteil-Val de Marne (UPEC)
5 rue Gustave Eiffel, 94017, Créteil cedex